

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 576.5:633.72

doi: 10.31360/2225-3068-2019-69-110-117

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА СТАБИЛЬНОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН МИКРОПОБЕГОВ ЧАЯ *IN VITRO* ПРИ ХОЛОДОВОМ СТРЕССЕ

Самарина Л. С., Гвасалия М. В., Малюкова Л. С., Маляровская В. И.,
Рахмангулов Р. С., Конинская Н. Г., Буртовой А. М., Великий А. В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур»,
г. Сочи, Россия, e-mail: q1111w2006@yandex.ru

Холодовой стресс является важным фактором, лимитирующим рост и урожайность субтропических культур в мире, в том числе и в Предгорьях Краснодарского края и Республике Адыгее. Салициловая кислота участвует в регуляции многих физиологических процессов в растениях, играя важную роль в регуляции водного потенциала в условиях абиотического стресса, в том числе холодого. В данной работе изучено влияние экзогенной салициловой кислоты на стабильность клеточных мембран и степень повреждения листьев микропобегов чая при индукции холодого стресса *in vitro*. Установлено, что низкие положительные температуры (+2 °С) достоверно повышают выход электролитов, снижают стабильность клеточных мембран листьев чая. Выявлена положительная роль салициловой кислоты (50 мг/л) при введении её в питательную среду в сохранении структурно-функциональной стабильности мембран. Отмечено деструктивное действие салициловой кислоты в более высокой концентрации (100 мг/л) на состояние мембранных компонентов.

Ключевые слова: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, холодого стресс, выход электролитов, электропроводность, салициловая кислота.

Холодовой стресс (воздействие на растения низких положительных температур) является индуктором механизмов акклиматизации и компенсационной перестройки метаболизма субтропических культур, в том числе и чайного растения [22]. Эти реакции обеспечивают приспособление растений к дальнейшим возможным снижениям температуры в течение зимнего периода. Для многих субтропических культур, в том числе и чайного растения, холодого стресс и заморозки являются существенными факторами, лимитирующими их рост и урожайность в

ряде регионов мира [20], и особенно в Предгорьях Краснодарского края и Республике Адыгее [1–5]. Известно, что низкие температуры вызывают снижение водного потенциала в клетках и выработку свободных радикалов, которые в свою очередь нарушают целостность клеточных мембран, приводя к выходу электролитов из клеток [8]. Изучение механизмов ответа (сигнальных путей и каскадов биохимических реакций) растений чая на холодовой стресс, предотвращающих повреждение клеток и тканей свободными радикалами, широко проводится за рубежом [6]. Показано, что во многие пути регуляции роста и развития растений и их ответ на экологические стрессы вовлечена салициловая кислота (СК) – фенольное соединение, которое некоторые исследователи относят к фитогормонам [11, 14]. СК участвует в регуляции многих физиологических процессов в растениях, в частности в фотосинтезе, метаболизме азота, метаболизме пролина, синтезе глицинбетаина, антиоксидантной системе защиты и регуляции водного потенциала в условиях стресса [15]. Кроме того, отмечается её существенная роль в индукции генов защиты и устойчивости к биотическим [13] и абиотическим стрессам, в частности, вызванным загрязнением тяжёлыми металлами [21], засолением [17] и засухой [9]. Недавние молекулярные исследования детализировали, что СК индуцирует экспрессию генов шаперонов (HSP), антиоксидантов, вторичных метаболитов [10], семейств генов MAPK (митоген-активируемых протеинкиназ) [11] и экспрессию генов ответа на патогены [7].

Для индукции устойчивости растений к стрессам их обрабатывали экзогенной СК различными способами и концентрациями – фолиарные обработки растений, добавление в питательные растворы, выдерживание растений в растворе (перед высадкой) [18]. Было установлено ингибирование роста растений высокими концентрациями экзогенной СК [12]. Так, для бобовых растений было показано, что 0,1–0,5 мМ СК улучшала интенсивность фотосинтеза и ростовые процессы, а 1,0 мМ СК ингибировала эти процессы [16]. Было показано, что 0,55 мМ СК в питательной среде оказывала положительное влияние на рост нескольких видов гибискуса *in vitro* [19], а также повышала их устойчивость к засолению. Однако исследования роли салициловой кислоты при индукции холодового стресса у чайного растения отсутствуют.

В связи с этим, **цель данных исследований** заключалась в изучении влияния различных концентраций экзогенной салициловой кислоты на стабильность клеточных мембран и степень повреждения тканей микропобегов чая при индукции холодового стресса *in vitro*.

Материалы и методы. Объектом исследований служили размноженные *in vitro* микропобеги чая *Camellia sinensis* (L.) Kuntze местной популяции (рис. 1). Закладка опыта по индукции холодового стресса проводилась на базовой питательной среде $\frac{1}{2}$ МС, с добавлением 8 г/л агара, салициловой кислоты (СК) 50 и 100 мг/л, контроль – среда без СК, pH 5,6–5,8. Растения культивировали в течение 20 дней при фотопериоде 16/8, освещении 3 000 люкс в двух вариантах температурного режима (табл. 1).

Для анализа электропроводности и стабильности клеточных мембран навеску листьев 50 мг помещали в стакан с 50 мл деионизированной воды. Электропроводность измеряли портативным кондуктометром ST300С, датчик STCON3, с поверкой (Ohaus). Проводили 4 замера показаний через 0, 60, 120 минут после погружения листьев, а также после кипячения растительной пробы в течение 60 минут.



Рис. 1. Микропобеги чая на экспериментальных питательных средах

Таблица 1

Схема опыта индукции холодового стресса

Вариант	Расшифровка	Условия эксперимента
Кт	Контроль тепло – $\frac{1}{2}$ МС без салициловой кислоты	Температура 22 \pm 2 °С
Кх	Контроль холод – $\frac{1}{2}$ МС без салициловой кислоты	Температура 2 \pm 2 °С
СК50	$\frac{1}{2}$ МС с 50 мг/л салициловой кислоты	Температура 2 \pm 2 °С
СК100	$\frac{1}{2}$ МС с 100 мг/л салициловой кислоты	Температура 2 \pm 2 °С

Относительную электропроводность раствора рассчитывали по формуле:

$$REC = L1/L2 * 100 \%,$$

где:

L1 – электропроводность через 0 мин,

L2 – электропроводность в остывшем растворе после кипячения на водяной бане 1 час при 100 °С.

Стабильность клеточных мембран рассчитывали по формуле:

$$СКМ \% = (1-(L1/L2)) / (1-(C1/C2))*100,$$

где:

L1 и L2 – значения проводимости до и после кипячения,

C1 и C2 – относительная проводимость контроля до и после кипячения (усредненные значения по 5 повторностям).

Степень повреждения тканей листа рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ повреждения} = 100 - СКМ.$$

Каждый вариант анализировали в 5-кратной повторности, по которым рассчитывали средние значения и стандартные отклонения от среднего.

Результаты и обсуждение. Начальные этапы реакции клеток на действие различных стрессоров связывают с изменением состояния мембран и деградацией липидов. В целом мембранная регуляция клетки, являясь частью всего комплекса систем регуляции организма, может рассматриваться как важнейший адаптационный механизм, определяющий сохранение жизнеспособности и нормальный рост растения, а проницаемость мембран растительных клеток – показателем устойчивости растений при разработке экспресс-методов диагностики, например, путём определения интенсивности выхода из тканей электролитов [8].

Моделирование холодового стресса в лабораторных условиях позволяет исключить влияние комплекса других факторов на растения и выявить ответ растения на конкретный, отдельно взятый фактор. Однако, при этом следует учитывать особенности микрополюсов, на которых проводился эксперимент, в данном случае – отсутствие корневой системы и разный размер листьев, что может оказывать влияние на результаты экспериментов: слабое понижение температуры оказывает большее негативное воздействие, чем на взрослые растения в полевых коллекциях.

В ходе проведённой работы было выявлено, что холодовое воздействие (Кх в сравнении с Кт) достоверно снижало стабильность клеточных мембран, приводя к росту степени повреждения тканей (рис. 2), что в целом демонстрировало информативность этих показателей в оценке их выносливости к этому стресс-фактору.

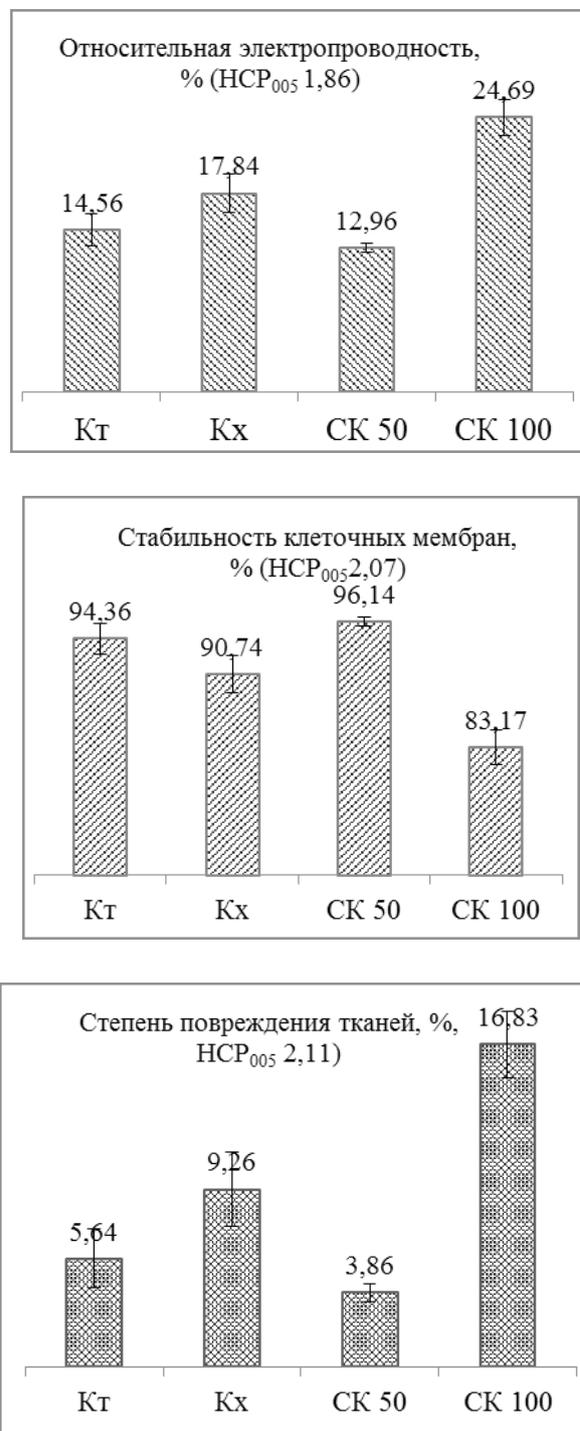


Рис. 2. Показатели стабильности клеточных мембран микропобегов чая при холодовом воздействии

На фоне добавления в питательную среду 50 мг/л салициловой кислоты (вариант СК50) при холодовом воздействии отмечалось сохранение структурно-функциональной стабильности мембран на уровне контроля (Кт), что свидетельствовало о повышении выносливости растений к неблагоприятным условиям. Повышение концентрации салициловой кислоты (100 мг/л) в питательной среде на фоне холодового воздействия (вариант СК100) приводило к 5-кратному увеличению степени повреждения тканей холодом.

Выводы. Таким образом, выявлена положительная роль экзогенной салициловой кислоты (50 мг/л) при введении её в питательную среду в сохранении структурно-функциональной стабильности мембран при холодовом стрессе микропобегов чая. Отмечено негативное действие салициловой кислоты в более высокой концентрации (100 мг/л) на стабильность мембранного комплекса тканей листа. Установлено влияние фактора «холод» на стабильность клеточных мембран у микропобегов чая местной популяции.

Благодарности: исследования проведены в рамках госзадания по теме НИР № 0683-2018-0005-02 и при поддержке РФФ проект № 18-76-10001.

Библиографический список

1. Лошкарёва С.В. Изучение генофонда чая для использования в селекции на повышение зимостойкости и продуктивности в условиях влажных субтропиков России // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2018. – № 13. – С. 412-414.
2. Рындин А.В., Туов М.Т. Культивирование чая в субтропиках России // Наука Кубани. – 2006. – № 4. – С. 28-32. – ISSN 1562-9856.
3. Рындин А.В., Пчихачев Э.К. История, современное состояние и перспективы развития чаеводства в республике Адыгея // Современное состояние и перспективы развития садоводства и культуры чая в Республике Адыгея: материалы научно-практической конференции, посвященной 70-летию развития чаеводства и 40-летию образования научного учреждения по чаю в Республике Адыгея. Российская Академия сельскохозяйственных наук, Министерство образования и науки Республики Адыгея, ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт цветоводства и субтропических культур, Адыгейский филиал. – Майкоп: Адыгейское республиканское книжное изд-во, 2008. – С. 12-15. – ISBN 978-5-7608-0523-2.
4. Рындин А.В., Белоус О.Г., Маляровская В.И. Притула З.В. Абиляфазова Ю.С., Кожевникова А.М. Использование физиолого-биохимических методов для выявления механизмов адаптации субтропических, южных плодовых и декоративных культур в условиях субтропиков России // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 3. – С. 40-48. – ISSN 0131-6397.
5. Рындин А.В., Горшков В.М. Понятие о субтропиках и субтропическом климате // Субтропическое и декоративное садоводство. – 2016. – № 58. – С. 9-15. – ISSN 2225-3068.

6. Ban Q., Wang X., Pan C., Wang Y., Kong L., Jiang H., Xu Y., Wang W., Pan Y., Li Y., Jiang Ch. Comparative analysis of the response and gene regulation in cold resistant and susceptible tea plants // PLoS ONE., 2017. – Vol. 12. – № 12. – doi.org/10.1371/journal.pone.0188514.
7. Chai J., Liu J., Zhou J., Xing D. Mitogen-activated protein kinase 6 regulates NPR1 gene expression and activation during leaf senescence induced by salicylic acid // J. Exp. Bot., 2014. – Vol. 65. – № 5. – P. 6513-6528. – doi: 10.1093/jxb/eru369.
8. Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S.S., Pozhvanov G.A, Sokolik A., Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment // Journal of Experimental Botany. – 2014. – Vol. 65. – № 5. – P. 1259-1270. – doi.org/10.1093/jxb/eru004
9. Fayez K.A., Bazaid S.A. Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate // J. Saudi Soc. Agri. Sci., 2014. – № 13. – P. 45-55. – doi: 10.1016/j.jssas.2013.01.001.
10. Jumali S.S., Said I.M., Ismail I., Zainal Z. Genes induced by high concentration of salicylic acid in *Mitragyna speciosa* Aust // J. Crop Sci., 2011. – № 5. – P. 296-303. – ISSN 1835-2707.
11. Khan M.I.R, Fatma M., Per T.S., Anjum N.A., Khan N.A. Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants // Front. Plant Sci. – 2015. – № 6. – P. 462. – doi: 10.3389/fpls.2015.00462.
12. Kovacic J., Gruz J., Baekor M., Strnad M., Repcak M. Salicylic acid-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants // Plant Cell Rep., 2009. – № 28. – P. 135-143. – doi: 10.1007/s00299-008-0627-5.
13. Kumar D. Salicylic acid signaling in disease resistance // Plant Sci. – 2014. – № 228. – P. 127-124. – doi: 10.1016/j.plantsci.2014.04.014.
14. Liu S.C., Jin J.Q., Ma J.Q., Yao M.Z., Ma C.L., Li C.F., Ding Z.T., Chen L. Transcriptomic analysis of tea plant responding to drought stress and recovery // PLoS One., 2016. – Vol. 11. – № 1. – doi: 10.1371/journal.pone.0147306.
15. Miura K., Tada Y. Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid // Front. Plant Sci. – 2014. – № 5. – doi: 10.3389/fpls.2014.00004.
16. Nazar R., Iqbal N., Syeed S., Khan N.A. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars // J. Plant Physiol., 2011. – № 168. – P. 807-815. – doi: 10.1016/j.jplph.2010.11.001.
17. Nazar R., Umar S., Khan N. A. Exogenous salicylic acid improves photosynthesis and growth through increase in ascorbate-glutathione metabolism and S assimilation in mustard under salt stress // Plant Signal. Behav. – 2015. – Vol. 3. – doi: 10.1080/15592324.2014.1003751.
18. Palma F., López-Gómez M., Tejera N.A., Lluch C. Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition // Plant Sci. – 2013. – № 208. – P. 75-82. – doi: 10.1016/j.plantsci.2013.03.015.
19. Sakhanokho H.F., Kelley R.Y. Influence of salicylic acid on in vitro propagation and salt tolerance in *Hibiscus acetosella* and *Hibiscus moscheutos* (cv *Luna Red*) // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8. – № 8. – P. 1474-1481. – doi.org/10.5897/AJB2009.000-9226.
20. Yue C., Cao H.L., Wang L., Zhou Y.H., Huang Y.T., Hao X.Y., Wang Y.C., Wang B., Yang Y.J., Wang X.C. Effects of CA on sugar metabolism and sugar-related gene expression

in tea plant during the winter season // Plant Mol Biol. – 2015. – № 88. – P. 591-608. – doi.org/10.1007/s11103-015-0345-7.

21. Zhang Y., Xu S., Yang S., Chen Y. Salicylic acid alleviates cadmium-induced inhibition of growth and photosynthesis through upregulating antioxidant defense system in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) // Protoplasma. – 2015. – № 252. – P. 911–924. – doi: 10.1007/s00709-014-0732-y

22. Zheng C., Zhao L., Wang Y., Shen J., Zhang Y., Jia S., Li Y., Ding Z. Integrated RNA-Seq and sRNASeq Analysis Identifies Chilling and Freezing Responsive Key Molecular Players and Pathways in Tea Plant (*Camellia sinensis*) // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 4. –doi:10.1371/journal.pone.0125031.

THE EFFECT OF SALICYLIC ACID ON CELL MEMBRANE STABILITY IN *IN VITRO* MICROPROPAGATED TEA PLANTS UNDER COLD STRESS

**Samarina L. S., Gvasaliya M. V., Malyukova L. S., Malyarovskaya V. I.,
Rakhmangulov R. S., Koninskaya N. G., Burtovoy A. M., Velikiy A. V.**

*Federal State Budgetary Scientific Institution
“Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops”,
c. Sochi, Russia, e-mail: q1111w2006@yandex.ru*

Cold stress is an important factor limiting growth and yield of subtropical crops in the world, especially in the Foothills of Krasnodar region and in the Republic of Adygea. Salicylic acid is involved in the regulation of many physiological processes in plants, playing an important role in the regulation of water potential under abiotic stress, including cold. This paper studied the effect of exogenous salicylic acid on cell membrane stability and damage degree of tea leaf microshoots during the induction of cold stress *in vitro*. It was found that low positive temperatures (+2 °C) significantly increased the yield of electrolytes, reducing the stability of cell membranes in tea leaves. The positive role of salicylic acid (50 mg/l) was revealed in maintaining the structural and functional membrane stability while its introduction into the nutrient medium. Also it was noted that salicylic acid applied in a higher concentration (100 mg/g) had a destructive effect on the membrane components state.

Key words: *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, cold stress, electrolyte output, electrical conductivity, salicylic acid.