

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГБОУ ВПО «КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Факультет защиты растений
Кафедра физиологии и биохимии растений

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

Курс лекций

По направлениям подготовки
06.06.01– Биологические науки

Краснодар
КубГАУ
2014

Составители: Федулов Ю.П.

Методы определения устойчивости растений: курс лекций / сост. Ю.П.Федулов
– Краснодар : КубГАУ, 2015. – 39 с.

Курс лекций предназначен для аспирантов по направлению подготовки 06.06.01–
Биологические науки; 35.06.01 – Сельское хозяйство

Рассмотрено и одобрено методической комиссией факультета защиты рас-
тений 29.11.2015г., протокол №3.

Председатель
методической комиссии

В. И. Терпелец

© Федулов Ю.П., 2015
© ФГБОУ ВПО «Кубанский
государственный аграрный универси-
тет», 2015

ЛЕКЦИЯ 1

Вопросы:

- 1. Понятие устойчивости растений и общая методология оценки устойчивости.**
- 2. Биологическая и агрономическая устойчивость растений.**
- 3. Понятие сорта-индикатора и провокационного фона. Прямая и косвенная оценка устойчивости.**
- 4. Цели определения устойчивости. Методы оценки и методы отбора. Количественная оценка объективности метода.**

Устойчивость растений к стрессам характеризует способность растительных организмов полноценно осуществлять свои основные жизненные функции в неблагоприятных условиях внешней среды, а мера устойчивости («высокая», «слабая» и т. д.) отражает количественную сторону этой способности.

Различают устойчивость биологическую и агрономическую.

Биологическая устойчивость характеризует тот предел стрессовой нагрузки, при которой растения еще способны образовывать жизнеспособные семена (функция сохранения вида как биологической единицы); количественно она выражается в единицах измерения действующего на растения экстремального фактора (температуры, концентрации вещества в среде, водного потенциала и т. д.).

Агрономическая устойчивость отражает степень снижения урожая полезного продукта растений под влиянием стрессового воздействия среды; она выражается в долях изменения урожая растений под влиянием действующего на них стресса (проценты или иные единицы, характеризующие отношение продуктивности растений при стрессе к урожайности их же в отсутствие стрессового давления). Поскольку при разной напряженности одного и того же экстремального фактора и продуктивность растений меняется также в разной, то при сравнении агрономической устойчивости разных сортов или видов растений между собой оценка их должна проводиться при одинаковой стрессовой нагрузке.

Четко установлено, что абсолютная величина устойчивости (как биологической, так и агрономической) одного и того же сорта существенно меняется под влиянием разнообразных условий внешней среды, при которых развиваются растения. Поэтому для сопоставления устойчивости разных видов или сортов растений следует ориентироваться не на абсолютную (изменяющуюся в разных циклах оценки), а на их относительную устойчивость (различия уровня устойчивости сортов относительно друг друга, принадлежность их к определенным группам устойчивости; эти различия обычно сохраняются в разных циклах и условиях оценки). При оценке же устойчивости большого количества сортов и для сравнения результатов разных циклов оценки между собой необходимо использовать для ориентировки сорта-классификаторы (иногда их называют сорта-индикаторы), в качестве которых можно брать 2-3 районированных, четко различающихся между

собой по устойчивости к данному типу стресса сорта (обычно - высокоустойчивый, среднеустойчивый и неустойчивый).

Хотя присущий каждому сорту, виду или даже отдельному растению уровень устойчивости к стрессам является генетически контролируемым и наследуемым признаком, однако этот признак - потенциальный. В оптимальных условиях он скрыт и проявляется лишь тогда, когда растения оказываются под влиянием экстремального фактора. Поэтому для диагностики устойчивости одним из необходимых условий является создание определенного воздействия на изучаемые растения тем стрессом, устойчивость к которому определяется. Эти стрессовые условия называются провокационным фоном. В случае оценки засухоустойчивости растения помещают в условия водного дефицита, при оценке морозоустойчивости их выдерживают при экстремально низкой температуре, при оценке устойчивости к болезням - создают благоприятные условия для заражения растений - инфекционный фон. В ряде случаев эта стрессовая нагрузка производится непосредственно в процессе самой оценочной работы как элемент метода диагностики.

Важным для диагностики моментом является и то обстоятельство, что устойчивость любого растительного организма количественно изменяется в онтогенезе - она наиболее низка в молодом возрасте (проростки, всходы), затем постепенно и существенно повышается до созревания семян, но в период формирования гаметофита устойчивость растения ненадолго резко снижается. Из этой общебиологической закономерности вытекает, что при сравнении устойчивости к стрессам разных растительных объектов (организмов, сортов, видов) необходимо проводить оценку на материале одинакового возраста.

На организменном уровне биологической организации механизмы адаптации растений дополняются новыми - взаимодействиями органов между собой, проявляющимися в изменениях транспорта и распределения потоков воды, пластических веществ, гормонов и т. д. по разным органам растения при стрессах. Действием этого механизма обусловлены такие явления, как существенные различия уровня устойчивости между соседствующими с плодом и удаленными от плода листьями одного побега, между плодоносящими и бесплодными растениями одного возраста или даже побегами одного растения, между побегами разного порядка на одном растении; в последнем случае сказывается и биологическая разновозрастность побегов. Для того чтобы избежать существенных ошибок при оценке устойчивости растений, обусловленных действием названного механизма адаптации, при диагностике необходимо также тщательно подбирать однородный по положению на растении материал (равная удаленность от плода листьев, побеги одного порядка и т. д.), обращать внимание на выровненность оцениваемых растений по плодонагрузке.

Наряду с этим необходимо учитывать наличие внутривидовой вариативности растений и характера изменения амплитуды этого варьирования по мере возрастания стрессовой нагрузки.

Во-первых, при проведении оценки устойчивости сортов любыми методами «клеточного» уровня должна быть достаточно большая биологическая повторяемость при отборе проб, чтобы по возможности точнее отразить всю популяцию

(сорт), а не какой-либо ее «краевой участок». Обычно повторность должна быть не менее чем 3-5-кратной, а в каждую повторность, кроме того, берутся части растения (листья или др.) с нескольких растений. Результаты оценки при этом следует подвергать статистической обработке.

Во-вторых, для оценки сравнительной устойчивости любыми методами надо подбирать такие режимы стрессового воздействия, при которых различия в устойчивости оцениваемых объектов между собой имеют наибольшую амплитуду (дифференцирующие условия). Нередко для сортов разных групп устойчивости они бывают неодинаковыми, что вызывает необходимость проводить оценку параллельно на двух-трех режимах. Большое значение в этих случаях имеет включение в оцениваемый набор также сортов-классификаторов.

Наиболее полное и точное представление об устойчивости сорта может дать **прямой метод оценки устойчивости** - оценка устойчивости в полевых опытах. При этом методе учитывается депрессия урожая (или степень выживаемости растений) под влиянием проявления стресса в естественных условиях. Однако в природной обстановке стрессовая нагрузка меняется из года в год, что затягивает оценку надолго. Подчас бывает затруднительно или даже невозможно создать два фона выращивания (оптимальный и экстремальный), что необходимо для диагностики устойчивости.

В значительной мере все эти трудности и недостатки можно устранить, применяя для оценки устойчивости растений вегетационные опыты, особенно с использованием уже широко доступной фитотронной техники. Однако вегетационный метод весьма трудоемок и громоздок и обладает из-за этого малой пропускной способностью, что ограничивает рамки его применимости оценкой устойчивости к стрессам лишь небольшого числа сортов.

Поэтому для массовой диагностики устойчивости растений широко используются **косвенные методы оценки устойчивости** - разнообразные лабораторные методы оценки, основанные на учете действия рассмотренных выше механизмов адаптации растений к стрессам. Практическая ценность и рамки использования того или иного лабораторного метода диагностики определяются тем, в какой мере он отвечает нескольким общим требованиям. Наиболее существенными из них являются следующие:

1) дифференцирующая способность метода определяется тем, насколько достоверно и четко удастся при оценке разделить по уровню устойчивости близкородственные объекты (сорта одной культуры или даже одного экотипа, растения из одной сортовой популяции). Нередко тот или иной прием оценки, хорошо разделяющий по устойчивости контрастные виды растений, бывает не в состоянии дифференцировать по группам устойчивости разные сорта одной культуры, что снижает его пригодность для селекционных и растениеводческих работ;

2) достоверность оценки с помощью выбранного метода зависит от того, насколько сильно коррелирует с истинной устойчивостью растений физиологический признак, лежащий в основе данного диагностического способа. От достоверности метода зависит степень совпадения результатов оценки одного и того же набора сортов в повторных циклах диагностики;

3) присутствие в методике количественного критерия учёта, пригодного для точного инструментального измерения. Это придает методу объективность в отличие от глазомерной, даже балловой, оценки, содержащей элемент субъективизма.

4) техническая (инструментальная) база метода, от которой порой зависит даже сама возможность его применения в том или ином учреждении.

4) степень трудоемкости, длительность оценки и пропускная способность метода в значительной мере влияют на применимость того или иного способа либо для массовой диагностики больших наборов сортов, либо только для характеристики небольшого числа оцениваемых объектов.

Методы оценки устойчивости могут быть разделены на собственно **методы оценки** и на **методы отбора**.

Цель методов первой группы - дать сравнительную количественную оценку устойчивости растений. Методы второй группы предназначены для отбора из популяции образцов с устойчивостью не ниже определённого уровня.

Кроме этого существует ряд методов, цель которых определить, насколько популяция повреждена тем или иным неблагоприятным экологическим фактором.

При необходимости оценивать по признаку устойчивости к стрессам большие количества сортов целесообразно применять принцип поэтапной оценки. Согласно этому принципу на первом этапе работы с помощью одного из наиболее производительных и простых методов (обычно основанного на механизме отбора в популяции) дают первичную оценку устойчивости всего количества изучаемых сортов. При этом выделяют группу устойчивых образцов (обычно около 7—10% от общего числа оцениваемых).

На втором этапе оценке подвергаются только сорта этой устойчивой группы, причем в работе используют уже комплекс нескольких методов, основанных на разных принципах. Таким образом, выделившиеся сорта с повышенной устойчивостью к стрессу получают углубленную оценку, уточняющую результаты их первичной диагностики.

Наконец, наиболее перспективные высокоустойчивые сорта этой группы проходят третий этап оценки с помощью вегетационного метода (с учетом в нем депрессии урожая от стресса): На всех этапах диагностики участвуют сорта-классификаторы.

Такая поэтапность работы дает возможность сравнительно быстро и достаточно точно выявить наиболее устойчивые к стрессам образцы из большого числа, оцениваемых сортов растений.

При выборе метода оценки устойчивости необходим критерий для их объективного сравнения. С другой стороны, при внедрении выбранного метода встает задача поиска таких экспериментальных условий, в которых бы генотипы различались по интересующему признаку с максимальной достоверностью, а сам критерий разделения генотипов был бы функцией отклика при подборе оптимальных дифференцирующих условий.

Чаще всего в качестве основного количественного критерия сравнения методов используется коэффициент корреляции данных косвенного и стандарт-

ного (контрольного, как правило, прямого) метода. Недостатки сравнения по коэффициенту корреляции заключается, во-первых, в необходимости анализировать достаточно большой ряд сортов для получения достоверных коэффициентов корреляции, во-вторых, в том, что коэффициент корреляции рассчитывается по средним значениям, при этом не учитывается точность измерения косвенного признака.

Идеальным случаем для практической работы является наличие линейной связи вида $y = ax + b$ (или некоторой другой функциональной зависимости, допускающей преобразование к линейному виду), между количественными выражениями косвенного и анализируемого хозяйственно-ценного признака, где y и x - величины хозяйственно-ценного признака и косвенного параметра.

Однако в большинстве случаев такой связи нет, поскольку как y так и x оцениваются с некоторой неопределенностью, обусловленной как биологическим варьированием в количественном выражении параметров, так и ошибками в их измерении.

В связи с этим, искомый критерий должен отвечать следующим требованиям:

- 1) иметь количественное выражение ;
- 2) учитывать степень точности измерения величины косвенного параметра;
- 3) учитывать степень линейности связи между косвенным параметром и исследуемым хозяйственно-ценным признаком;
- 4) достаточно быстро и просто рассчитываться в лабораторных условиях.

Для количественного сравнения различных методов оценки необходимо использовать базовую шкалу признака. Базовая шкала признака - это набор сортов-стандартов по признакам, на которые ведется селекция. Для каждой зоны это будут свои сорта-стандарты, поскольку селекция ведется для определенных регионов с их характерными климатическими условиями. Например, для Краснодарского края в качестве такой базовой шкалы выбраны три сорта озимой пшеницы селекции КНИИСХ: морозоустойчивый сорт Краснодарская 39, среднеморозоустойчивый - Безостая 1 и слабоморозоустойчивый сорт Ранняя 12.

Для количественного сравнения сортов используется коэффициент дифференциации K_d :

$$K_d = k (S_{\phi}/S_{сл}),$$

где S_{ϕ} - факториальная дисперсии, где фактором служит генотип (чем выше S_{ϕ} тем сильнее различаются измеряемые параметры сортов-стандартов);

$S_{сл}$ - случайная дисперсии (чем она выше, тем больше разброс данных измерений у отдельных генотипов, т.е. тем менее надёжна оценка используемого параметра);

k - поправочный коэффициент, зависящий от степени линейности связи оценок устойчивости прямым (стандартным) и косвенным методом.

Чем выше K_d , тем большую разрешающую способность имеет метод.

Кроме этого, при выборе метода для оценки больших массивов материала следует учитывать его технологические характеристики: производительность, требуемое оборудование, штат сотрудников и др.

ЛЕКЦИЯ 2

Вопросы:

- 1. Механизмы развития повреждения растений. Физиологические параметры как основа критериев устойчивости к повреждающим факторам различной природы.**
- 2. Мембраны как первичные мишени действия повреждающих факторов.**
- 3. Способы регистрации физико-химических изменений в мембранах при действии повреждающих факторов.**

Многие условия, соблюдение которых требуется при проведении любых приемов диагностики, базируются на общих принципах адаптации растений к экстремальным условиям среды. Эти механизмы адаптации, протекают на разных уровнях биологической организации - клеточном, организменном, популяционном.

При любых экстремальных воздействиях в клетках растений происходят изменения (интенсивности или содержания продуктов реакции и т. п.) практически всех физиолого-биохимических процессов.

Однако лишь немногие из этих изменений обусловлены непосредственно действием стресса, а большинство является уже следствием этих (первичных) нарушений в силу взаимосвязанности отдельных реакций метаболизма между собой и саморегулируемости всего обмена веществ растительного организма. Это говорит о том, что адаптивные возможности растения, определяющие уровень его устойчивости, могут оцениваться по многим физиологическим параметрам. Однако далеко не все такие параметры четко отражают устойчивость, так как описываемые ими процессы дают неодинаковый вклад в образование биомассы растения в экстремальных условиях. Более того, одним из механизмов' адаптации на клеточном уровне является активизация компенсаторных реакций, вследствие чего нарушения некоторых звеньев метаболизма, обусловленные стрессом, слабо отражаются на конечном результате жизнедеятельности растения (его биологической или хозяйственной продуктивности). Поэтому следует для диагностических целей использовать оценку изменения таких характеристик организма, которые играют существенную роль именно в реализации потенциала его устойчивости. Среди всего многообразия физиологических критериев наиболее тесно' связанными с общей устойчивостью растений к стрессам и представляющими, кроме того, методическую доступность для определения являются изменения состояния (проницаемости) клеточных мембран, водно-осмотического режима клетки,

уровня образования энергии в клетке, а также интенсивности ростовых реакций как интегрального показателя активности метаболизма растения. Методические приемы, к основе которых лежит оценка изменений иных, кроме перечисленных выше, характеристик физиологического состояния клеток, обычно дают менее надежное представление об устойчивости растений. Однако и они в той или иной мере отражают уровень адаптационных возможностей организма и также могут быть использованы для диагностики устойчивости. Но поскольку адаптация представляет собой сложную совокупность многих перестроек в организме, а каждый конкретный методический прием основан на оценке какого-либо одного звена этой совокупности, то более точную оценку устойчивости растений можно получить при использовании в работе комплекса различных методов диагностики.

Качественно изменения в метаболизме растений под влиянием стрессов однотипны у сортов и видов с разным уровнем устойчивости. Различия же между ними носят лишь количественный характер, отражающий скорость и амплитуду отклонения физиологических параметров от нормы под влиянием стресса. В общем плане у более устойчивых сортов при экстремальных воздействиях больше скорость, но значительно меньше амплитуда изменений в метаболизме, чем у сортов слабоустойчивых. Этот принцип используется для измерений в большинстве лабораторных методов диагностики устойчивости растений.

Поскольку обусловленные стрессом внутриклеточные физиологические изменения протекают однотипно в каждой клетке, то на основе измерения параметров адаптации этого уровня биологической организации можно оценивать устойчивость не только сортов или видов растений, но и единичных растений (индивидуальная устойчивость), что весьма важно для генетических исследований и для работы на первых этапах селекции.

Первичное действие абсолютного большинства абиотических факторов (температуры, света, солевого и газового состава среды и т.д.) на растение осуществляется на физико-химическом уровне и главным образом на уровне клеточных мембран.

Второй особенностью является то, что физико-химические изменения в клетке можно зарегистрировать спустя очень короткий промежуток времени после воздействия стрессового фактора (через несколько секунд), а иногда и в момент его действия.

Мембранные системы занимают особое место в теории устойчивости живых организмов, поскольку, согласно современным представлениям, являются ключевыми структурами как в процессах адаптации растений, так и развития повреждений при действии неблагоприятных факторов.

Во-первых, это связано с особой ролью мембранных систем в общем метаболизме, как органелл, регулирующих потоки вещества и энергии в клетке, и генерализующих внешние воздействия на всю клетку.

Во-вторых, многие исследователи указывают, что с мембранами тесно связаны молекулярные механизмы как адаптации, так и повреждения растений экстремальными факторами внешней среды. В последние годы в значительной сте-

пени прояснились механизмы функционирования мембран как первичных сенсоров изменений во внешней среде.

При действии повреждающих низких температур первым шагом в деструктивных изменениях липидов мембран является их фазовое разделение и фазовый переход из жидкокристаллического состояния в гель. В новом состоянии липидная фаза имеет повышенную вязкость. Это приводит к ухудшению условий работы мембраносвязанных ферментов, и, в первую очередь, энергопреобразующих систем, следствием чего является общее ухудшение метаболизма.

После первичного повреждения мембран начинается их лизис, при котором происходит расщепление и уменьшение содержания фосфолипидов и накопление свободных жирных кислот, которые вступают в реакции перекисного окисления с участием свободных радикалов. Закаливание растений существенно снижает степень расщепления фосфолипидов, повышает их устойчивость к свободным радикалам кислорода, возможно, за счет увеличения уровня растворимых в липидах антиоксидантов. С другой стороны, обнаружена связь между морозоустойчивостью сортов озимой пшеницы, ржи и степенью расщепления фосфатидилхолина и накопления фосфатидной кислоты.

Охлаждение ниже температуры кристаллизации воды приводит в процессе льдообразования к обезвоживанию мембран и повышению концентрации электролитов на поверхности раздела фаз мембранараствор. Последнее может изменить характер фазовых переходов в мембранах, так как насыщенные растворы электролитов экранируют заряды на кислотных липидах, которые, как полагают, играют весьма важную роль в фазовом поведении мембран.

Согласно данным, полученным с помощью электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) термотропные фазовые переходы могут наблюдаться в митохондриях, хлоропластах, глиоксисомах и пропластидах. Они обратимы и происходят не при точно определенной температуре, а в некоторой температурной зоне, иногда довольно широкой, причем положение температурной зоны зависит как от длины цепи, так и от степени ненасыщенности жирных кислот, входящих в состав липидов мембран.

При действии пониженных температур в зоне холодого закаливания основные изменения, происходящие в липидной фазе мембран состоят в увеличении содержания фосфолипидов и числа двойных связей в их жирных кислотах. Особенно отчетливо это явление выражено у зимующих растений и связано с новообразованием мембранных систем в осенне-зимний период при гетеротрофном питании.

Фосфолипиды накапливаются в процессе закаливания к морозу в проростках озимой и яровой пшеницы, ржи, ячменя, узлах кущения, листьях и хлоропластах озимой пшеницы.

Среди фосфолипидов при акклиматизации наиболее сильно увеличивается концентрация фосфатидилхолина, который играет важную роль в процессе закаливания к морозу, потому, что у него температура фазового перехода (при одинаковом с фосфатидилэтаноламином жирнокислотном составе) ниже, чем

фосфатидилэтаноламина. Кроме того, скорость биосинтеза фосфатидилхолина коррелирует с холодоустойчивостью видов.

При холодной адаптации растений изменение химического состава мембран сопровождается изменением их физико-химических свойств. Для клеток клубней картофеля показано, что чем выше индекс двойных связей в жирных кислотах полярных липидов, тем меньше усиливается выход электролитов под действием холодových температур, т.е. тем больше устойчивость ткани.

Показано, что в процессе закалки к холоду пшениц различной морозоустойчивости у них уменьшается микровязкость липидов плазматической мембраны пропорционально степени их морозоустойчивости. Аналогичное уменьшение микровязкости плазматических мембран клеток коры обнаружено и у древесных растений (Yoshida, 1984).

На 5-ти генотипах ячменя различной морозоустойчивости показано, что выращенные в поле растения имели величину проницаемости плазмалеммы для электролитов обратно пропорциональную степени морозоустойчивости.

Во время дегидратации клеток вследствие внеклеточного льдообразования и последующего оттаивания происходит изменение объема клеток и, соответственно, площади плазматической мембраны. Эти изменения происходят за счет везикуляции мембран, причем этот процесс протекает по-разному в клетках закаленных и незакаленных растений. Это может говорить о существовании еще одного уровня защиты растений от низких температур.

Таким образом, в процессе низкотемпературной адаптации растений происходят изменения в молекулярном составе мембран, для которых в ряде случаев удается проследить закономерную связь с повышением уровня морозоустойчивости.

Изменения молекулярного состава мембран могут приводить к изменению их физико-химических параметров, таких как электропроводность, проницаемость, критические температуры фазовых переходов - т.е. параметров, имеющих экологическую значимость и поэтому представляющих практический интерес.

Наиболее распространенными способами регистрации физико-химических изменений в мембранах при действии повреждающих факторов являются способы, связанные с регистрацией изменений их электрических параметров, проницаемости.

О степени целостности мембран могут дать информацию методы регистрации флуоресценции.

ЛЕКЦИЯ 3

Вопросы:

- 1. Оценка морозоустойчивости растений методом прямого промораживания.**
- 2. Оценка морозоустойчивости растений методами электропроводности.**
- 3. Оценка морозоустойчивости по изменению проницаемости мембран.**

4. Оценка морозоустойчивости по изменению электропроводности: а) при естественном закаливании; б) при искусственном промораживании; в) при действии импульса тока.

Наиболее адекватной оценкой морозоустойчивости является определение степени выживаемости растений после воздействия критическими температурами. Несмотря на то, что в настоящее время создана аппаратура для промораживания растений в полевых, практически во всех селекционных центрах страны и за рубежом в качестве официального метода оценки морозоустойчивости в той или иной модификации используется метод прямого промораживания растений при определенных температурах в морозильных камерах.

Растения высевают в оптимальные сроки посева для данной зоны в ящики с почвой, доставленной с поля. Общепринятая схема размещения: в одном ящике 7 рядков по 20-25 зёрен в ряду. Один ряд представляет одну повторность одного варианта. Каждый вариант высевают в 4-х - 6-ти повторностях, при этом каждая повторность высевается в другом ящике. Ящики выставляют на открытой площадке, где они проходят закалывание в естественных условиях.

Растения начинают промораживать через 2-3 дня после того, как минимальная суточная температура упадет ниже -2°C . Ящики с растениями переносят в морозильные камеры и начинают промораживать строго соблюдали условия стандартизации промораживания:

- охлаждение и повышение температуры проводят со стандартной скоростью, $1^{\circ}\text{C}/\text{час}$;
- во всех опытах применяют однократное промораживание при выбранной минимальной температуре одинаковой длительности - 24 часа;
- во всех опытах соблюдают одинаковыми условия после оттаивания и во время отрастания растений.

После окончания низкотемпературной экспозиции температуру в камере повышают до $+5^{\circ}\text{C}$, при которой растения выдерживали для оттаивания сутки в темноте, после чего ящики переносят в теплицу с температурой $+18+22^{\circ}\text{C}$ для отращивания.

На 10-й день, когда пораженные листья теряют зеленую окраску, проводят визуальную оценку степени подмерзания листьев по 10-балльной системе, а на 21 день подсчитывают число живых и мертвых растений и рассчитывали процент выживания.

При каждой температуре промораживают не менее 100 растений одного сорта, чтобы получить достоверную оценку степени выживаемости. Для большей объективности прямой оценки морозоустойчивости каждый сорт промораживают при 2-3-х температурах.

В связи с тем, что температурные условия закалывания, как в течение каждого сезона, так и от года к году сильно различаются, то и критическую температуру промораживания необходимо выбирать заново для каждого цикла промораживания. Основой для выбора температуры промораживания служат данные по наблюдению за динамикой изменения температуры в ходе закалывания растений.

Оптимальной температурой промораживания является температура, при которой среднеморозоустойчивый сохраняется на 40-50%, более жёсткие режимы промораживания позволяют выявить разницу между сортами с повышенной морозоустойчивостью.

Известно, что действие стрессового фактора, не приводя к гибели растения может существенно подавить рост и развитие растений. В связи с этим в качестве дополнительного параметра, характеризующего реакцию растений на промораживание, используют оценку интенсивности отрастания растений после промораживания.

Для этого после подсчета живых растений на 30-й день отрастания срезают надземную часть растений и высушивали, после чего определяли вес, который и служил мерой интенсивности отрастания.

Один из наиболее распространенных способов оценки состояния и повреждения плазмалеммы - регистрация выхода электролитов из тканей, подвергнутых стрессовому воздействию.

При этом методе с поля в зимний период отбирают растения, подвергнувшиеся действию низких температур в естественных условиях.

В лаборатории растения очищают от почвы, отрезают ближайшую к узлу кущения часть стебля длиной 3-4 см, споласкивают дистиллированной водой и помещают в бюксы с дистиллированной водой по 4-6 отрезков. Каждый вариант анализируют не менее чем в 4-х повторностях. Через 3-4 часа измеряют электропроводность водных вытяжек.

По степени электропроводности вытяжки судят о количестве вышедшего электролита - чем выше электропроводность, тем сильнее повреждены клеточные мембраны, значит тем ниже морозоустойчивость данного образца. Поскольку масса отрезков может быть разной в разных повторностях одного варианта, то применяют оценку количества вышедшего электролита. Для этого через 4 часа, после последнего измерения электропроводности, бюксы с растительными тканями помещают в термостат и выдерживают при температуре +95°С в течение 2-х часов. При этом клеточные мембраны полностью разрушаются и все электролиты полностью выходят из клетки. После остывания бюксов снова измеряют электропроводность вытяжек и по степени изменения электропроводности судят о доле вышедшего электролита. Чем больше электролита вышло, тем меньшую морозоустойчивость имеет образец.

Повреждение клеточных мембран приводит к уменьшению электропроводности растительных тканей. Эта закономерность, учитывая простоту измерения электропроводности, легла в основу нескольких методов оценки морозоустойчивости.

Определение морозоустойчивости по электропроводности тканей растений, подвергнутым действию низких температур в естественных условиях.

Образцы для измерения отбирают в поле во второй половине зимы, после того как растения подверглись действию минимальных зимних температур и началось повышение температуры воздуха. Растения доставляют в лабораторию, где

они оттаивают при температуре 10 -15° С. Очищенные от остатков почвы растения закладывают в электроды из легко окисляющегося металла, причем в каждую пару электродов — одинаковое число растений. Концы растений, находящиеся в электродах, раздавливают специальным прессом, при этом вытекающий из раздавленных клеток сок обеспечивает электрохимический контакт между растениями и металлом электрода. После закладки образцов во все электроды проводят измерение проходящего через образцы тока при комнатной температуре. Величина тока прямо пропорциональна электропроводности, а значит и степени повреждения растительной ткани. При этом у тканей более морозоустойчивых сортов степень вызванных низкой температурой повреждений будет меньше, и ток через ткани будет слабее.

Недостаток этого метода в том, результаты будут зависеть от того насколько сильно повреждены ткани растений в полевых условиях. В один год повреждения будут незначительны, и варианты не будут различаться, и только в отдельные годы низкотемпературный стресс будет оптимальной силы, позволяющий дифференцировать образцы по признаку морозоустойчивости.

Этого недостатка можно избежать если использовать промораживание растений в контролируемых условиях.

Определение морозоустойчивости по электропроводности тканей растений, подвергнутым действию низких температур в контролируемых условиях.

Образцы для измерения отбирают в поле после прохождения второй фазы закаливания. Монолиты с вырубленными растениями доставляют в лабораторию, где они оттаивают при температуре 10 -15°С. Очищенные от остатков почвы растения так же закладывают в электроды.

Блоки электродов с пробами помещают в климатическую камеру, где их охлаждают со скоростью 0,2-0,4°С/мин до критической температуры промораживания. Значение критической температуры выбирают в предварительных опытах на трех сортах-индикаторах таким образом, чтобы разница между контрастными сортами была максимальной. Как правило, эта температура бывает в пределах -18 ...-20°С. При критической температуре растения промораживают 3-6 ч, затем электроды выносят из камеры в помещение с комнатной температурой, где происходит оттаивание образцов. Через 50-70 мин после начала оттаивания регистрируют проходящий через образцы ток. Чем меньше изменился ток по сравнению с его величиной до промораживания, тем морозоустойчивее образец.

Определение морозоустойчивости озимых культур методом удара током. Согласно современным представлениям, повреждение тканей растений морозом происходит вследствие разрушения клеточных мембран. Одной из причин их разрушения является значительное повышение концентрации ионов вблизи мембран вследствие образования льда. Известно, что повышение примембранной концентрации ионов до определенного уровня вызывает возрастание концентрации ионов внутри мембраны, что приводит к ее переходу в новое конформационное состояние с повышенной проницаемостью, после чего могут наступить необратимые изменения и гибель клетки.

Таким образом, согласно этой гипотезе, непосредственной причиной повреждения мембран при замораживании является повышение внутримембранной концентрации ионов. Тогда наряду с другими факторами устойчивость растений к промораживанию будет обуславливаться и способностью мембран выдерживать повышение активности солей. В этом случае, найдя способ быстрого усиления воздействия ионов на мембрану и выбрав метод регистрации реакции тканей на это воздействие, мы могли бы дифференцировать сорта по признаку морозоустойчивости без их промораживания. Одним из таких способов является приложение к мембране импульса напряжения. В этом случае усиление воздействия ионов соли на мембрану достигается не повышением их концентрации в примембранном слое, а воздействием на них электрического поля.

Растения доставляются с поля лабораторию, очищаются от почвы и закладываются в электроды. Измеряют электропроводность растительных тканей, после чего на электроды с растительными тканями последовательно подаётся импульс постоянного тока напряжением 40-60 в длительностью 2-3 сек и сразу измеряется сопротивление ткани. О степени морозостойкости судят по величине сопротивления растительной ткани после пропускания тока.

Данный метод может быть использован для быстрой и достоверной оценки морозоустойчивости. Преимущество его, по сравнению с другими методами, в том, что нет необходимости использовать дорогостоящие морозильные камеры как при оценке методом прямого промораживания (ящики с растениями) или при оценке другими методами электропроводности.

Другим преимуществом этого метода является то, что растения с поля можно брать достаточно длительное время, даже во время выхода из вынужденного зимнего покоя,

Методы, связанные с измерением электропроводности легко автоматизируются, что позволяет создать на их базе производительные технологии оценки морозоустойчивости селекционного материала.

Определение морозоустойчивости озимой пшеницы по электропроводности проростков. В описанных выше методах для оценки морозоустойчивости используют растения, вегетирующие в поле, работа с которыми в определенных условиях неудобна. От этого недостатка свободен метод оценки морозоустойчивости пшеницы на проростках

При оценке этим методом по электросопротивлению определяют относительную морозостойкость отдельных растений озимой пшеницы, не повреждая их. Датчиком служат игольчатые электроды, расстояние между которыми 3 мм. Главной особенностью метода является специальный строгий режим выращивания и подготовки образцов к анализу.. Эту операцию проводят в камерах искусственного климата, она обеспечивает прохождение первой фазы закаливания (при температуре 0°C). Выращивание в одинаковых контролируемых условиях обеспечивает высокую однородность материала, а высокая производительность позволяет оценить достаточно много растений. Этот метод дает хорошую дифференциацию сортов-индикаторов морозостойкости, и может быть использован для изучения наследования признака морозостойкости. Сложность широкого распространения

этого метода состоит в необходимости иметь специально оборудованные точно работающие климатические камеры, в которых: надо одновременно поддерживать низкую температуру и достаточно высокую освещенность.

ЛЕКЦИЯ 4

Вопросы:

- 1. Механизмы флуоресценции хлорофилла листьев, быстрая и замедленная флуоресценция. Аппаратура для измерения флуоресценции.**
- 2. Изменение замедленной флуоресценции при понижении температуры листьев.**
- 3. Оценка морозоустойчивости растений по флуоресценции листьев.**
- 4. Критерии устойчивости к низким температурам, основанные на параметрах флуоресценции, их эффективность.**

Молекула хлорофилла, поглощая квант света, переходит в возбуждённое состояние, в котором один из электронов занимает более высокий энергетический уровень. Переход молекулы в основное состояние, или дезактивация возбуждённого состояния может идти тремя путями:

1) электрон возвращается на основной уровень, а энергия возбуждения растрачивается в виде тепла;

2) энергия возбуждения мигрирует: передаётся соседней молекуле, пока не попадает на реакционный центр фотосинтеза и запасается в химической форме;

3) электрон переходит на основной уровень, а его энергия излучается в виде кванта света, который в этом случае называется квантом флуоресценции. Флуоресценция, обусловленная таким механизмом называется быстрой флуоресценцией.

Хлорофилл способен испускать кванты быстрой флуоресценции как в нативном состоянии, функционируя в составе фотосинтетического аппарата листьев, так и в растворах. В листе процессы миграции энергии кванта света и флуоресценции конкурируют - чем интенсивнее миграция энергии в фотосинтетическом аппарате, тем слабее флуоресценция и наоборот.

Запасание энергии квантов света в химической форме возможно только и интактном фотосинтетическом аппарате. В этом случае в фотосистемах 1 и 2 мо-

лекула реакционного центра, получая в результате миграции от светособирающего комплекса энергию кванта света переходит в возбуждённое состояние. Потеря энергии реакционным центром происходит в результате его окисления - он отдаёт электрон первичному акцептору, который в результате этого переходит в восстановленное состояние и способен передать полученный электрон дальше по фотосинтетической электронно-транспортной цепи.(ЭТЦ). Электрон будет двигаться дальше по ЭТЦ, пока его энергия не будет окончательно запасена в виде АТФ и НАДФ. Однако, согласно общехимическим закономерностям, наряду с прямой реакцией, идёт и обратная реакция. В случае ЭТЦ это означает, что какая-то часть электронов движется в противоположном направлении. Оценки показывают, что на электронов, переходящих в прямом направлении один электрон возвращается назад.

Если этот электрон возвращается на реакционный центр, то последний переходит в возбуждённое состояние и его дезактивация может идти тремя вышеперечисленными путями, в том числе с испусканием кванта флуоресценции. Эта флуоресценция называется фотосинтетической индуцированной хемолуминесценцией, фотосинтетической флуоресценцией, замедленной флуоресценцией или послевсечение. Её интенсивность в 10^6 - 10^7 раз слабее, чем интенсивность быстрой флуоресценции. Если квант быстрой флуоресценции испускается молекулой хлорофилла через 10^{-9} сек после возбуждения, то замедленная флуоресценция наблюдается в виде постепенно затухающего свечения в течение нескольких часов. Важной особенностью замедленной флуоресценции является то, что её источником является только неповреждённый фотосинтетический аппарат, все компоненты которого пространственно строго организованы во внутренней мембране хлоропласта. Изменения состояния мембраны, её повреждение, однозначно вызывают изменения и нарушения пространственного расположения компонентов ЭТЦ, реакционных центров, комплекса выделения кислорода. Это приводит к изменениям интенсивности замедленной флуоресценции вплоть до её полного затухания при разрушении мембраны.

Принцип регистрации быстрой флуоресценции основан на спектральном разделении возбуждающего и регистрируемого потока света. Лист освещают синим светом, а поскольку энергия квантов флуоресценции соответствует красной части спектра, её регистрируют через красный светофильтр. Приёмником излучения быстрой флуоресценции могут быть фотоэлементы или фотоэлектронные умножители невысокой чувствительности.

Принцип регистрации замедленной флуоресценции основан на временном разделении возбуждающего и регистрируемого потоков света. Одним из приборов, который позволяет это осуществить, является фосфороскоп. Его главной частью является один или два соосных диска с отверстиями, расположенных таким образом, что при вращении в один момент они открывают доступ возбуждающего света к объекту (листу, суспензии хлоропластов, водорослей), затем возбуждающий поток света перекрывается, и через некоторое время открывается окно, через которое поток замедленной флуоресценции поступает на фотоприёмник. В качестве фотоприёмника используют высочувствительные фотоэлектронные умножители.

В современных приборах в качестве источника возбуждающего света используют мощные светодиоды, а фотоприёмниками служат высоко чувствительные фотоэлементы.

Если регистрировать замедленную флуоресценцию при постепенном понижении температуры листа, то её интенсивность будет изменяться. Сначала, начиная от температуры $+20^{\circ}\text{C}$, интенсивность замедленной флуоресценции уменьшается, а затем, при снижении температуры ниже $+10^{\circ}\text{C}..+12^{\circ}\text{C}$ интенсивность флуоресценции начинает нарастать, достигая максимума при $-10^{\circ}\text{C}..-15^{\circ}\text{C}$. При дальнейшем понижении температуры замедленная флуоресценция начинает затухать. Полученная кривая зависимости интенсивности флуоресценции от температуры называется термограммой послесвечения.

Определение морозоустойчивости растений по параметрам фотоиндуцированной хемилюминесценции.

Принципиальная возможность использования фотоиндуцированной флуоресценции зеленых тканей растений для определения их морозоустойчивости была показана сотрудниками кафедры биофизики Биологического факультета МГУ

Было выявлено, что термограммы замедленной флуоресценции листьев различных по морозоустойчивости различались по расположению температурного максимума - у морозостойких сортов он наступал при более низкой температуре. У морозостойких вариантов растений после прохождения максимума флуоресценция затухала медленнее.

Температурная разность между максимумами послесвечения контрастных по устойчивости сортов составляет от $1,5-3$ до $5-7^{\circ}\text{C}$. Такой температурный интервал требует, чтобы для дифференциации десятков сортов положение максимума на температурной шкале определялось с точностью не менее $0,1^{\circ}\text{C}$.

Это очень трудно сделать практически из-за внутрисортовой вариабельности данного признака. Поэтому попытки использовать указанный параметр для массовой оценки селекционного материала на морозоустойчивость не увенчались успехом.

С другой стороны, абсолютные значения интенсивности замедленной флуоресценции в температурной зоне затухания свечения в интервале $-16^{\circ}\text{C}..-20^{\circ}\text{C}$ у контрастных по морозоустойчивости сортов различаются в $3-5$ раз. Этот факт положен в основу модифицированного метода определения морозоустойчивости по фотоиндуцированному послесвечению,

Анализ проводится на специальной установке. Для обеспечения массовости определений за основу взят принцип последовательного прохождения кассет с листьями перед фотоприёмником.

Все кассеты обеспечивают одинаковую излучающую поверхность листьев, это нормирует интенсивность свечения и позволяет непосредственно сравнивать интенсивности свечения от разных образцов. В разработанной установке можно проводить анализ сразу 34 образцов.

Охлаждение камеры осуществляют двумя холодильными агрегатами, скорость охлаждения — $0,3\text{ч}—0,5^\circ\text{C}/\text{мин}$, максимальная температура охлаждения -30°C . Уровень интенсивности свечения регистрируют фотоумножителем и записывают на самописце и с помощью цифропечатающего устройства.

Параметром, по которому оценивают морозоустойчивость, служит интенсивность свечения при выбранной температуре $T_{\text{диф}}$, при которой сорта-индикаторы дают наилучшую дифференциацию. Как правило, эти температуры были в пределах $-17..-19^\circ\text{C}$.

При $T_{\text{диф}}$ более морозоустойчивые сорта имеют более интенсивное свечение.

Отбор образцов для анализов на морозостойкость этим методом можно производить, как описано выше, однако при отборе особое внимание необходимо обращать на то, чтобы листья отбираемых растений были чистыми и неповрежденными. Можно срезать только листья и помещать их на влажную фильтровальную бумагу в чашки Петри.

Отобранные для анализа листья кладут в специальные кассеты. В одну кассету входит от 2 до 5 листьев одного образца в зависимости от ширины листьев (чтобы полностью закрыть рабочую поверхность кассеты). При анализе одна кассета является одной повторностью, каждый образец анализируют в 4—6 повторностях.

В каждом опыте вместе с исследуемыми образцами в установку берут два сорта-индикатора — среднеустойчивый и высокоморозоустойчивый. После помещения кассет с листьями в охлаждаемую камеру фосфороскопа включают холодильник и при достижении в камере температуры 0°C начинают непрерывную регистрацию послесвечения (при продолжающемся охлаждении образцов). Измерения заканчивают, когда исчезает свечение у самых морозостойких форм. Для анализа отбирают данные, полученные при температуре, при которой максимально различаются по интенсивности свечения сорта-индикаторы.

Оценка морозоустойчивости данным методом требует дорогостоящего оборудования и квалифицированного технического персонала. Кроме того, анализ возможно проводить только в зимнее время, на растениях прошедших закаливание в естественных условиях.

Другим вариантом оценки морозоустойчивости является регистрация замедленной флуоресценции на проростках, выращенных в строго контролируемых условиях в климатических камерах до до 8-10-дневного возраста.

Перед анализом растения выдерживают в темноте, затем помещают в камеру фосфороскопа на термоэлемент с температурой около -3°C , по истечении 1-1,5 мин освещают импульсным светом и регистрируют кинетику индукции послесвечения - изменения послесвечения во времени до установления его стационарного значения. После включения света происходит характерный двухступенчатый подъем послесвечения до максимума, а затем его медленное снижение до стационарного уровня.

Поскольку параметры индукционной кривой связаны с морозоустойчивостью не всегда линейно (например, иногда среднеустойчивый сорт имеет больший максимум свечения, чем устойчивый сорт Альбидум 114 и слабоустойчивый сорт

Безостая 1, то авторы предлагают для определения степени морозоустойчивости использовать ДР-подъем, интенсивность в максимуме (РМ) и полуширину индукционной кривой.

Анализ одного образца занимает 5—7 мин, за рабочий день можно оценить морозоустойчивость 60-70 сортообразцов (в однократной повторности). Большое достоинство метода - возможность вести анализы круглогодично. За год, по мнению авторов метода, можно оценить до 2000—3000 образцов.

ЛЕКЦИЯ 5

Вопросы:

- 1. Способы оценки жаро- и засухоустойчивости растений. Физиолого-биохимические изменения в растении при нарастании дефицита влаги и при повышении температуры.**
- 2. Оценка засухоустойчивости растений по содержанию пролина.**
- 3. Оценка засухоустойчивости растений по водоудерживающей способности листьев.**
- 4. Оценка жароустойчивости растений по параметрам замедленной флуоресценции.**

В настоящее время считается, что для оценки засухоустойчивости необходимо использовать комплекс физиологических параметров. Эти параметры зависят от биологических особенностей культуры и экологических условий зоны её возделывания -тип засухи, время её наступления, интенсивность проявления.

Среди множества физиологических методов оценки засухоустойчивости полевых культур наиболее простые косвенные методы для массовой оценки относительной засухоустойчивости основаны на определении прорастания семян и роста проростков в растворах осмотиков, имитирующих недостаток влаги, поскольку давно известна положительная корреляция между засухоустойчивостью и способностью семян прорасти в растворах осмотиков.

В настоящее время считается, что для оценки засухоустойчивости необходимо использовать комплекс физиологических параметров. Эти параметры зависят от биологических особенностей культуры и экологических условий зоны её возделывания -тип засухи, время её наступления, интенсивность проявления.

Среди множества физиологических методов оценки засухоустойчивости полевых культур наиболее простые косвенные методы для массовой оценки относительной засухоустойчивости основаны на определении прорастания семян и роста проростков в растворах осмотиков, имитирующих недостаток влаги, поскольку давно известна положительная корреляция между засухоустойчивостью и способностью семян прорасти в растворах осмотиков.

Семена каждого сорта представляют собой популяцию, в которой одни семена способны прорасти при более высоком осмотическом давлении, другие -

при более низком, поэтому чем больше в популяции первых семян, тем выше процент их прорастания при какой-то одной средней концентрации осмотика.

Для оценки засухоустойчивости полевых культур методом проращивания семян в растворах осмотиков отбирают здоровые, нормально выполненные семена, имеющие всхожесть не менее 75—85% (с понижением всхожести точность оценки устойчивости резко падает). Перед проращиванием семена протравливают в формалине (3 мл 40%-ного раствора формалина на 1 л воды) в течение 3—5 мин (для зерновых, кукурузы) или в маргапцовокислем калии (1%-ный раствор KMnO_4) в течение 10 мин (для бобовых). Для этого семена каждого образца помещают в марлевые мешочки с этикеткой внутри и опускают в раствор антисептика. После этого их промывают водой и слегка обсушивают на фильтровальной бумаге.

Проращивание семян (зерновые, кукуруза) проводят в чашках Петри, а бобовых - в специальных коробках-растильнях из винипласта размером 24X16X8 см с крышками. Предварительно в хорошо вымытые чашки раскладывают фильтровальную бумагу, нарезанную по внутреннему диаметру нижней чашки. Затем их для стерилизации в течение 1—2 ч прокалывают в термостате при 105°C. Коробки стерилизуют гидролизным спиртом спиртом, а фильтровальную бумагу разрезают на листы (23x15 см), из которых делают складчатый фильтр (высота складки 2 см). В каждую коробку можно поместить до шести таких фильтров.

Приготовленные семена зерновых и кукурузы раскладывают на фильтровальную бумагу в чашки Петри, по 25—50 штук в каждую. В опытном варианте повторность 3-4-кратная, в контрольном 2-кратная, т. е. для первичной оценки нужно не менее 250-300 семян каждого сорта. В каждую чашку наливают по 5 мл раствора сахарозы (опыт) или воды (контроль) для зерновых и по 25 мл - для кукурузы. Семена бобовых культур можно заложить до 150 штук в растильню (6 образцов по 25 семян в повторность). Для каждого образца необходимо 4-6 повторностей. В растильню наливают до 50 мл раствора сахарозы.

Концентрация используемого раствора сахарозы различна для разных культур. Для оценки прорастания твёрдой пшеницы используют концентрацию сахарозы с осмотическим давлением 10-12 атм, для мягкой пшеницы - 16-18, для бобовых - 7-9, а для кукурузы 10-14 атм.

Чашки помещают на пять суток в термостат при температуре 20—21° (для зерновых и бобовых) и при 30° (для кукурузы), а затем проводят подсчет проросших семян. Процент прорастания определяется количеством семян, давших корешок самой минимальной длины.

Процент проросших семян (Р) определяют следующим образом: среднее на чашку число проросших в контроле семян принимают за 100%, среднее число семян, проросших в растворе сахарозы (а), выражают в процентах от числа семян, проросших в контроле (б). Таким образом,

$$P = (a/b)100\%$$

Чем выше процент прорастания семян в растворе сахарозы, тем более засухоустойчив образец.

Параллельно для каждой партии изучаемых образцов необходимо дать оценку сортам-классификаторам, хотя бы одному — высокоустойчивому по полевым испытаниям. Наличие сортов-классификаторов позволяет правильно распределить образцы по относительной устойчивости на группы.

Наиболее четкие результаты получают в том случае, когда в одной серии опытов используют семена одного времени и места репродукции. При этом семена сортов-классификаторов должны быть той же репродукции.

Для определения депрессии ростовых процессов на 5-е сутки в каждой из чашек в контроле и опыте срезают все появившиеся корешки сростки и помещают их в небольших бюксах в термостат на 3 ч при температуре 105°. Затем материал остужают в эксикаторах и взвешивают. По полученным данным оценивают степень депрессии в накоплении сухой массы проростками при повышенном осмотическом давлении.

У более засухоустойчивых образцов накопление проростками биомассы тормозится в меньшей степени.

Главное достоинство такой методики состоит в простоте и высокой производительности. Она не требует сложного оборудования. Это одни из очень немногих способов, позволяющих проводить массовую оценку засухоустойчивости исходного и селекционного материала в лабораторных условиях. Они дают возможность диагностировать устойчивость к засухе, проявляющуюся на самых ранних этапах развития растения- вития, т. е. в период использования эндосперма, что важно при селекции устойчивых сортов в зонах, для которых характерны весенние засухи, губительно действующие на семена и проростки яровых культур, а также в зонах, где встречаются осенние засухи, задерживающие прорастание озимых культур.

Эти методы дают возможность судить и об общем исходном уровне физиолого-биохимических процессов в прорастающем семени в стрессовых условиях, что позволяет в какой-то мере получить представление и об устойчивости взрослых растений. Такая первичная оценка дает основание выделить образцы, перспективные для более глубокого изучения их устойчивости.

Существуют и другие прямые методы оценки на более поздних фазах развития проростков. Проростки выращивают, как правило, на песке в специальных камерах с контролируемой температурой и влажностью воздуха. Прекращая на определенный срок полив растений (на 4-14 дней в зависимости от культуры и возраста сеянцев), а затем возобновляя его, определяют процент выживания растений или степень их повреждения по балльной шкале. Такие методики существуют для пшеницы, кукурузы, сорго и др.

Существуют методики изучения засухоустойчивости по характеристикам корневой системы на протяжении всего вегетационного периода для разных культур — пшеницы, ячменя, ржи, овса, кукурузы, сорго. По ним предлагается оценивать следующие показатели: число зародышевых корней и максимальное их углубление, число узловых корней, габитус корневой системы, ее длину, насыщенность почвы корнями в слое 10—20 см, общий объем почвы, охваченный корнями, поглотительную и синтетическую деятельность корневой системы. Эти

методики разработаны для условий Краснодарского края и предлагают шкалы по различным показателям для определения засухоустойчивости.

Среди многочисленных лабораторно-аналитических методы, с помощью которых можно судить об отдельных механизмах засухоустойчивости следует выделить **метод оценки водоудерживающей способности листьев**.

При этом методе в анализ берут здоровые, интенсивно функционирующие, но закончившие рост листья или другие органы. Листья (или колосья 10-12 штук для каждого образца) срезают утром и в полиэтиленовых пакетах переносят в лабораторию. Там на торсионных или электрических весах взвешивают 3—4 повторности по 3—4 листа или колоса в каждой и помещают их на специальные сетки для завядания в термошкафы, где поддерживают постоянную температуру воздуха (от 20 до 30°) и относительно стабильную влажность воздуха за счет кюветы с насыщенным раствором хлористого кальция. Время завядания должно быть определено заранее, исходя из того, что листья должны потерять не менее 40—50% воды от общего ее содержания. Скорость потери воды зависит от культуры и условий выращивания растений. Экспериментально установлено, что листья мягкой пшеницы должны завядать 3-4 ч, твердой - 4-5 ч, ячменя - 5-6 ч. После завядания материал снова взвешивают, по разности определяют количество потерянной воды, затем высушивают при 105° для определения сухой массы и подсчитывают общее содержание воды в исходной навеске. По разности между общим исходным содержанием воды и количеством потерянной воды можно определить содержание оставшейся в растении воды. Водоудерживающую способность можно характеризовать как по относительному количеству потерянной воды (в случае, если растения выращивали при достаточной влагообеспеченности или в условиях слабой засухи), так и по относительному содержанию оставшейся после завядания воды (в случае, если удобнее, по условиям работы, давать растениям более длительное завядание или когда растения, в силу жесткой засухи, уже до завядания значительно обезвожены).

Расчет водоудерживающей способности можно производить как в процентах от общего содержания воды, так и в процентах от сухой массы.

Устойчивые сорта отличаются тем, что в процессе засухи механизмы водоудержания у них действуют более длительное время. В связи с этим информативность данного показателя резко возрастает, если определить его в динамике, в ходе углубления засухи. При этом важно знать, насколько сравниваемые сорта различаются по относительному содержанию воды в тканях, так как существует прямо пропорциональная зависимость между потерей воды при завядании и ее исходным содержанием.

В начале засухи водоудерживающая способность может возрастать быстрее у неустойчивого сорта, однако при значительной выраженности засухи она становится больше у устойчивого сорта.

Некоторые авторы особую роль в устойчивости отводят водоудерживающей способности колоса.

Параллельно с определением водоудерживающей способности можно легко оценить водопоглощающую способность (ВС), которая характеризует в какой-то

мере способность переносить обезвоживание. Для этого срезанные листья предварительно насыщают влагой с целью устранения водного дефицита и взвешивают, затем их подвергают глубокому завяданию, а потом снова насыщают и взвешивают. По разности массы после первого и второго насыщения определяют то количество воды, которое растения не смогли поглотить из-за необратимых повреждений, вызванных завяданием.

Неустойчивый сорт, как правило, после завядания не может восстановить полностью исходную массу листьев.

Для правильной оценки образцов по показателям водного режима; необходимо, чтобы они были близки в полевых условиях по продолжительности фаз развития. Кроме того, в опыт должен быть включен высокоустойчивый сорт-классификатор.

Учет соотношения отнятой и оставшейся в каждом отдельном случае воды позволяет построить кривую, характеризующую соотношение- фракций воды при различном значении водоотнимающих сил раствора. Это дает возможность характеризовать состояние воды у разных по засухоустойчивости и жаростойкости растений.

По нашему мнению, включение водоудерживающей способности в комплекс критериев для диагностики засухоустойчивости должно быть- обязательным, так как она характеризует один из основных механизмов этого сложного свойства, а именно, способность противостоять обезвоживанию.

Поскольку водоудерживающая способность растений обуславливается многими факторами (в том числе и проницаемостью мембран), оценить устойчивость мембран протоплазмы более объективно можно, сравнивая сорта с близкой водоудерживающей способностью или доводя листья до примерно одного уровня обезвоживания (с помощью разного времени завядания), или определяя выход электролитов после насыщения листьев, подвергнутых длительному завяданию.

Широко используются для оценки засухоустойчивости различные ростовые параметры (накопление сухой массы, скорость линейного роста, площадь листовой поверхности и др.).

Все используемые на взрослых растениях методы, как правило, довольно трудоемки, особенно биохимические. Преимущество же их состоит в том, что их можно использовать при оценке устойчивости на разных этапах развития, в динамике, что значительно углубляет представление о засухоустойчивости. Для массовой браковки материала на ранних этапах селекционного процесса они негодны, но могут использоваться в комплексе при углубленной оценке исходного материала и селекционного — на последнем этапе селекции.

Выбор комплекса физиологических критериев для оценки засухоустойчивости будет зависеть от биологических особенностей той или иной культуры и от конкретных климатических условий той зоны (типа засухи), для которой отбираются устойчивые формы.

В Краснодарском НИИ сельского хозяйства предложенная для оценки устойчивости озимой пшеницы в условиях Краснодарского края система включает следующие физиологические показатели: способность семян прорасти в усло-

виях водного и теплового стрессов, устойчивость листьев к совместному действию перегрева и обезвоживания на VI этапе органогенеза, масса листьев на 1 м² посева на X этапе органогенеза, эффективность работы листьев на X этапе органогенеза (по массе зерна на 1 г массы листьев).

Методика определения пролинообразующей способности листьев пшеницы сводится к следующему. В фазу колошения отбирают здоровые, закончившие рост листья, нарезают их на отрезки 8—10 см и сразу же помещают в кювету (или чашку Петри), закрывая стеклянными пластинами. В каждую кювету помещают 10—15 листьев; повторность - 4-кратная. Листья приносят в лабораторию и взвешивают. Через 3 суток после медленного завядания в замкнутой камере в условиях высокой влажности воздуха подвявшие листья вновь взвешивают.

Подвядаание листьев должно осуществляться в условиях освещения {лучше при ярком, но не прямом солнечном свете).

Подвявшие листья тщательно измельчают ножницами, затем из них отбирают навеску массой 2 г в пробирку (лучше мерную) диаметром 20 мм и заливают 10 мл 80%-ного этилового спирта. Пробирки плотно закрывают ватными пробками и прогревают на водяной бане в течение 10 мин (при температуре +80°C). После остывания содержимое пробирок доводят 80%-ным спиртом до первоначального уровня и настаивают в течение суток в комнатных условиях.

Через сутки 1-2 капли экстракта из каждой пробирки наносят на два диска (две повторности) изатиновой бумаги диаметром 20 мм, лежащих на стеклянных пластинах (или в крышках от чашек Петри). Стекла с дисками помещают в термостат и прогревают при температуре 90° С в течение 10 мин.

В зависимости от содержания пролина в листьях диски изатиновой бумаги приобретают окраску от бледно-голубой до синей различной интенсивности. Более чистые синие тона можно получить, если удалить непрореагировавший изатин 10-минутным промыванием в холодной водопроводной воде.

Кроме пролина, спиртом экстрагируют различные пигменты, маскирующие окраску дисков. Их влияние можно ослабить, если выдержать эти диски в течение нескольких часов на свету. В такие же условия помещают и стандартные диски.

Окраску полученных дисков визуально сравнивают с окраской стандартных дисков (шкалой) с известным содержанием пролина в растворах, используемых для их приготовления. На основании этого делают вывод о содержании пролина в подвявших листьях и путем расчета определяют количество пролина, которое может синтезировать 1 г тургерсцентных листьев в условиях стресса, т. е. определяют их пролинообразующую способность. Для приготовления изатин-бумажного индикатора к 200 мл этанола приливают 5 мл концентрированной уксусной кислоты, добавляют 2 г изатина и растворяют его при нагревании. Этим раствором пропитывают хроматографическую бумагу, высушивают ее при температуре +80°C и хранят в темноте. Чувствительность такой индикаторной бумаги к пролину сохраняется годами.

Расчет степени обезвоживания растительного образца проводят по формуле:

$$C = [(A - B) 100] / A$$

где: C — степень обезвоживания, %;

A — масса растительного образца до подвядания, г; B — масса растительного образца после подвядания, г.

Пролинообразующую способность листьев находят по формуле:

$$X = (y.z)/f$$

где: X - пролинообразующая способность листа, мг/г сырой массы листьев;

y - количество мг пролина, соответствующее 1 г сырой массы листьев;

z - средняя степень обезвоживания листьев по опыту;

f - фактическая степень обезвоживания листьев сорта.

Более засухоустойчивые сорта обладают и большей пролинообразующей способностью.

Одним из признаков, связанных с засухоустойчивостью, является **показатель ксероморфности растений**, который может быть оценен числом устьиц на единицу площади листа. Для определения этого показателя отбирают флаговые листья с 20 растений каждого сортообразца пшеницы (листья срезают и погружают в этиловый спирт, где хранят их до непосредственного анализа). При анализе листья извлекают из этанола, высушивают осторожным промоканием фильтровальной бумагой, затем на верхнюю сторону каждого листа наносят по два мазка (0,5—0,8 см²) клея «Суперцемент» по обе стороны от центральной жилки. В течение 15—20 мин при температуре 30-35°С клей подсушивают, и он превращается в прозрачную пленку-матрицу, на которой отпечатался рельеф поверхности листа и устьиц в том числе. После этого пленку-матрицу снимают с листа пинцетом и рассматривают под микроскопом при 80-кратном увеличении. На каждой матрице число устьиц подсчитывают в двух полях зрения. Чем больше число устьиц на единице площади листа, тем выше ксероморфность сорта.

Для **оценки жаростойчивости** используют целый ряд физиолого-биохимических параметров, изменения которых регистрируют при действии экстремальных положительных температур.

Среди биофизических методов оценки жаростойкости особое место занимает метод регистрации спонтанной сверхслабой хемилюминесценции растений.

Спонтанная сверхслабая хемилюминесценция (ССХ) живых растительных организмов представляет собой излучение в видимой области спектра с максимумом в сине-зеленой его части.

. Для определения термоустойчивости используют 5—7-дневные этиолированные проростки или корни растений, произрастающих на свету.

. Семена злаковых и бобовых предварительно замачивают в воде в течение 5 ч. Затем помещают их на стеклянные пластинки, куда влага поступает по фильтровальной бумаге. Семена проращивают при постоянной температуре (23°С) в термостате без освещения. В день появления coleoptily проросшие семена переносят в чашки Петри, в которых злаковые выращивают в течение 4 сут, а остальные растения - 5 сут. По истечении этого срока проводят измерение ССХ на 50 примерно одинаковых проростках. Спонтанная сверхслабая хемилюминесценция растений регистрируется на установке, фотоприёмников в которой служит высокочувствительный фитоэлектронный умножитель.

Проросшие семена помещают в термостатированную камеру напротив фотокатода ФЭУ. Температуру в камере меняют с постоянной скоростью. Скорость изменения температуры зависит от длительности определения термостойкости.

Для каждого вида растения и отдельного сорта существует некоторая критическая температура, при которой свечение максимально.

Устойчивость сорта характеризуется двумя температурными точками: высокотемпературным максимумом (ВТМ) и тепловым летальным пределом (ТЛП). Чем более жаростоек сорт, тем выше на температурной шкале расположены у него ВТМ и ТЛП.

Использование **длительного послесвечения для определения жаростойкости растений** основано на оценке повреждения листового аппарата или хлорофиллсодержащих тканей высокими положительными температурами.

В основу метода положено наблюдение температурной зависимости послесвечения, которая имеет максимум в области высоких денатурирующих температур.

Для опытов используют отдельные листья или высежки из них. Перед началом регистрации послесвечения высежку листа в течение 10-15 мин выдерживают в темноте. Включение света сопровождается быстрым возрастанием и последующим медленным затуханием свечения. Форма индукционной кривой зависит от времени темповой адаптации и интенсивности возбуждающего света. После установления стационарного уровня проводят нагревание объекта.

При снятии термограмм длительного послесвечения листьев растений необходимо соблюдение следующих условий: скорость изменения температуры 0,5-0,8 град/мин; частота светоимпульсного облучения растения 600-1200 имп/мин; длительность импульса $8-10^{-2}$ с; время жизни регистрирующих компонент $10^{-1} - 5-10^{-1}$ с; освещенность объекта $7 \cdot 10^4$ лк; спектр светового импульса, близкий к солнечному; регистрация послесвечения должна производиться в режиме счета квантов.

Степень жаростойкости растений оценивают по температуре, при которой наблюдается высокотемпературный максимум послесвечения, сигнализирующий о деструкции клеточных структур. Чем выше интенсивность максимума высокой температурной вспышки и чем выше температура, на которой он регистрируется, тем выше жаростойкость сорта

ЛЕКЦИЯ 6

Вопросы:

- 1. Способы оценки солеустойчивости**
- 2. Способы оценки устойчивости растений к закислению почв.**
- 3. Способы оценки устойчивости растений к аноксии, токсическим газам.**

Для диагностики устойчивости растений к засолению почвы применяют целый ряд методов и все они имеют в своей основе одно необходимое условие — создание провокационного фона засоления. Это связано с тем, что уровень солеустойчивости растений закреплен генетически и проявляется лишь при действии этого экстремального фактора. С экспериментального установления солевых концентраций, при вторых происходит дифференциация сортов или образцов по уровню их солеустойчивости, начинается разработка любого из методов определения устойчивости растений к засолению.

Существующие методы и способы диагностики солеустойчивости делятся на две большие группы - прямые и косвенные методы.

Прямые методы имеют в своей основе определения изменения биометрических показателей - урожая, продуктивности, морфофизиологических признаков. Эти изменения могут быть достоверны после проведения определенного периода солевого воздействия, при проявлении заметной реакции растений. В связи с этим прямые методы, обладая большей точностью, являются в то же время более длительными и трудоемкими.

В отличие от прямых косвенные методы основаны на учете реакции растений на засоление, определяемой по изменению ряда физиологических и биохимических процессов, регистрируемых соответствующими приборами. Достоинством этих методов является возможность установления изменений за малый промежуток времени и при техническом совершенстве приборов - более высокая производительность по сравнению с прямыми методами оценки солеустойчивости.

Прямые методы оценки солеустойчивости. В основе сравнительной оценки солеустойчивости культур, сортов или набора образцов (на разных этапах селекции) лежит критерий - изменение отношения урожая (продуктивности) при засолении к урожаю тех же образцов в нормальных условиях выращивания. По этому показателю, наиболее достоверному для всех методов оценки, следует периодически сверять результаты оценочной работы, полученные другими прямыми и косвенными методами.

Вегетационно-полевой метод диагностики солеустойчивости. При оценке этим методом растения выращивают до урожая хозяйственно-ценных органов на засоленном участке (выравненном по показателям механического состава почвы и её солевому режиму) и на участке без засоления (контроль). Процентное отношение урожая растений при засолении к урожаю в нормальных условиях выращивания будет характеризовать их солеустойчивость.

Определение солеустойчивости полевым методом наиболее длительный и тяжелый способ диагностики. При его выполнении на результаты оценки часто оказывают влияние резко меняющиеся температурные и другие абиотические неуправляемые факторы среды. Это, вместе с влиянием специфических почвенно-солевых условий региона, способствует получению результатов сравнительной оценки сортов, имеющих зональное значение. Для иных условий выращивания и засоления такие результаты могут являться ориентировочными.

Достоинствами вегетационно-полевого метода обладает широко распространенный вегетационный метод. Большая точность оценки этим методом достигается тем, что основной фактор - засоление субстрата - четко контролирует экспериментатор. Оценку при помощи вегетационного метода проводят по общепринятым правилам. Однако вегетационный метод, как и полевой, требует много времени и больших трудовых затрат, что снижает его производительность.

Оценку солеустойчивости можно ускорить, применяя модификации вегетационного метода. В этом случае сравнительную солеустойчивость образцов определяют по изменению интенсивности ростовых процессов (высота растений и сухая масса) надземных органов в 1-2-месячном возрасте (в зависимости от длительности вегетационного периода культуры). Засоление субстрата растворами NaCl производится до уровня 10-12 атм для кормовых злаков, 7-10 атм - для зерновых; и 5 атм - для бобовых культур. Показателем солеустойчивости служит отношение продуктивности или интенсивности роста растений при засолении к этим же параметрам в контроле.

Морфофизиологический метод диагностики солеустойчивости основан на том, что в условиях засоления ряд показателей ростовых и органо-образовательных процессов растений в период вегетации, таких как, длина конуса нарастания, количество сегментов, скорость сегментации конуса, находятся в прямой связи с изменением величины структурных элементов урожая зерна. Степень солеустойчивости определяется величиной отклонения выбранных параметров от контроля под влиянием засоления. Проводить эти исследования необходимо после экспериментального установления периодов онтогенеза каждой культуры, когда о корреляционной зависимости между морфофизиологическими изменениями и солеустойчивостью можно судить наиболее достоверно. Для ячменя такими периодами являются II—III и V—VI этапы органогенеза. Конусы нарастания просматривают и измеряют под стереомикро скопом типа МБС-2 в 10-15 повторностях. Результаты измерений подвергают дисперсионному анализу и обрабатывают по общепринятым правилам статистических методов.

Наиболее распространенным **прямым методом определения солеустойчивости растений является метод проростков**. Критериями солеустойчивости в этом методе служат показатели прорастания семян в солевых растворах по сравнению с прорастанием в воде. Метод проростков имеет целый ряд технических модификаций, отличающихся способом проращивания, условиями засоления и элементами учета показателей. Эти варианты можно свести в следующие группы.

Определение солеустойчивости по показателям прорастания семян.

В этом методе в качестве показателя устойчивости используют энергию прорастания или процент всхожести семян. Отобранные партии семян (50—150 шт. в пробе при 2—3-кратной повторности) проращивают в средах с различной концентрацией солей NaCl или Na₂SO₄ (от 0,05-0,10 до 0,3-0,4М). При этом разные авторы рекомендуют разные способы проращивания семян: между слоями фильтровальной бумаги, увлажненных растворами солей; на стеклянных палочках, погруженных на $\frac{2}{3}$ — $\frac{3}{4}$ в растворы солей, и в емкостях с песком, равномерно увлажненным до оптимальной влажности солевым раствором.

Семена проращивают в термостате, при температуре, обусловленной биологией культуры в течение 5-15 суток при засолении и водном контроле. Основной показатель устойчивости – процент проросших семян по сравнению с контролем. Кроме этого в качестве показателей устойчивости можно использовать снижение энергии прорастания, скорости прорастания семян, длину проростков и корешков через определенное время прорастания в солевых растворах.

Для оценки сравнительной солеустойчивости сортов авторами рекомендован также способ оценки показателя D₅₀ — среднего времени (в днях) выживания сорта после засоления среды. При этом молодые растения, 2—3-недельного возраста, поливают раствором NaCl (50 мМ) и отмечают срок, когда у каждого сорта погибнет 50% растений. Чем больше величина D₅₀, тем выше солеустойчивость сорта. Этим способом, в сущности, оценивается не агрономическая, а биологическая солеустойчивость (вернее — солевыносливость), оба эти признака хотя и коррелируют между собой, но отражают разные стороны адаптивных качеств сорта.

Метод культуры тканей. Сущность метода заключается в культивировании ткани гипокотилей с использованием в качестве показателя солеустойчивости относительного прироста биомассы при заданной концентрации NaCl после 7—8 дней культивирования.

Косвенные методы определения солеустойчивости. Роль косвенных методов в диагностике устойчивости растений возрастает с развитием прикладных наук и инструментального усовершенствования приборов и вычислительной техники. Основным недостатком их пока остается слабая сортовая дифференциация.

При оценке солеустойчивости растений по скорости и степени выцветания хлорофилла листья срезают под водой у основания черешка, помещают в воду (контроль) и в растворы солей 2—4%-ной концентрации и выдерживают на рассеянном свете несколько суток. В результате разрушения хлорофилл-белкового комплекса под влиянием солей происходит постепенное выцветание хлорофилла, что отмечают по изменению общей окраски листьев или, чаще, по появлению некротических, бледных участков, площадь которых увеличивается. У менее солеустойчивых сортов выцветание хлорофилла в солевых растворах идет быстрее и в большей степени.

Биофизические методы оценки солеустойчивости. При этом методе измеряют электрическую емкость корней растений, выдержанных в растворах солей

(NaCl или Na₂SO₄ при концентрации 0,1—0,3 М в течение 10—30 мин) и контрольных (необработанных) растений. По разности значений электрической емкости корней судят о солеустойчивости растений.

Оценка кислотоустойчивости растений

На кислых почвах на растения через корневую систему действует несколько стрессовых агентов (избыток подвижных ионов алюминия, водорода, железа и марганца).

В основу методов оценки кислотоустойчивости положено сравнение ростовых параметров растений, выращенных в нормальных условиях и при нескольких фонах закисления, обусловленных выбранными ионами.

Количественным параметром степени кислотоустойчивости является коэффициент устойчивости (КУ) – отношение параметра растений (например, массы) выращенных при кислой реакции среды, к параметру (массе растений), полученных на среде с рН, близкой к нейтральной.

Коэффициент устойчивости (КУ) является одним из лабораторных диагностических тестов для ранней идентификации форм, толерантных к Н⁺, Al³⁺, а также, к Fe³⁺ и Mn³⁺. Коэффициент устойчивости, например, для толерантных сортов кукурузы составляет 0,84-0,87 против 0,37-0,44 для форм чувствительных. Аналогичные по своей направленности результаты получены и при изучении сортов пшеницы, ячменя, гороха, сои и вики. Постановка таких опытов осуществляется в водной культуре (с момента прорастания семян) в условиях 3-4 концентраций токсически действующего иона (от малых до больших).

Показано, что изменение длины корней в начальные фазы развития (10-12-суточные растения) под влиянием Н⁺ и Al³⁺ в растворе достоверно отражает степень устойчивости генотипа к ингибирующе действующим агентам на последующих этапах онтогенеза. Например, длина корней устойчивых сортов яровой пшеницы уменьшается на 22%, у чувствительных - на 86; у ячменя - соответственно на 19 и 81; у гороха — на 24 и 72; у сои — на 11 и 69%. Индекс относительной длины корней (ИДК - отношение средней длины при высокой концентрации стрессового фактора к средней длине корней при низкой (постановка опытов также в водной культуре) - хорошо коррелирует с урожаем зерна в поле (в среднем для всех изученных культур $r = 0,756$). Следовательно, ИДК можно использовать для быстрого и раннего отбора форм, устойчивых к кислотности.

Показателем устойчивости к закислению может служить **устойчивость хлорофилл-белкового комплекса** (извлекаемость зеленого пигмента), которая весьма неодинакова у растений, контрастно реагирующих на высокую кислотность среды. На основании результатов многих опытов с пшеницей, ячменем, кукурузой, гречихой, соей, горохом и викой вычислен коэффициент устойчивости пигмента (КУП) как отношение показателя в контроле (—Al, рН = 6,5-6,8) к показателю в опыте (+Al, рН = 4,0-4,2). Оказалось, что для устойчивых форм эти величины неизменно существенно выше (0,614-0,71), чем для чувствительных (0,37-0,47).

Таким образом, степень извлекаемости пигментов из листьев может служить объективным сравнительным диагностическим показателем устойчивости растений к ионной токсичности в зоне корней. Сортоспецифичность особенно четко прослеживается у молодых растений, что наиболее важно для ранней диагностики в селекции.

Оценка устойчивости к закислению по содержанию пролина.

Ионы Al оказывают сильное влияние на содержание аминокислот в тканях корней растений. В результате жесткого Al-стресса особенно изменяется количество пролина. Чувствительные к алюминиевой токсичности формы гороха от действия Al-ионов повышают его в 10-11 раз, тогда как у толерантных содержание пролина увеличивается не более чем на 60—70%.

Были испытаны многие сорта, гибриды и мутанты гороха, пшеницы, ячменя, кукурузы, вики и сои, контрастно реагирующие на почвенную кислотность, обусловленную действием избытка H^+ и Al-ионов. Во всех без исключения случаях содержание пролина в тканях корней чувствительных форм растений повышалось в 6—9 раз больше, чем у устойчивых (в расчете на единицу белка или сырой массы корней).

Методы оценки газоустойчивости растений можно разделить на следующие группы: биологические, анатомо-морфологические, цитологические, морфометрические, экологические, физиологические, биохимические, биофизические.

Перечисленные методы отличаются по степени сложности исполнения и требуют различных, подчас уникальных приборов и оборудования. Поэтому для массовой оценки устойчивости большого ассортимента декоративных растений, например для целей озеленения, могут использоваться более простые и доступные методы, основанные на определении степени повреждения листьев, выживаемости деревьев в заводских условиях, степени снижения прироста или урожайности и другие.

Специфичность методов оценки газоустойчивости растений заключается в необходимости определять различия в устойчивости у видов, сортов и форм растений в широком диапазоне концентраций газов, времени действия и степени нарушения жизненных функций - от невидимых повреждений до острых или катастрофических (смертельных). Поэтому условно методы оценки газоустойчивости растений можно также разделить на методы оценки невидимых повреждений или функциональных нарушений и методы оценки видимых повреждений (некрозы, изреживания крон деревьев, потери прироста и урожайности). Наряду с этим заслуживает внимания и проблема определения влияния промышленных газов на качество урожая.

Кроме того, газоустойчивость может рассматриваться с нескольких позиций: 1-я - устойчивость как сохранение декоративности растений; 2-я - устойчивость как сохранение урожайности и 3-я - устойчивость как сохранение жизни или выживаемость. По этим признакам можно разделить методы оценки газоустойчивости растений на три группы: 1-я — методы, основанные на оценке устойчивости вегетативной массы и генеративных органов, 2-я — методы оценки по изменению

урожайности и 3-я — методы определения сублетальных и летальных концентраций вредных ингредиентов по 50- или 100%-ной гибели органов растений или целых особей.

Устойчивость растений к промышленным газам или газоустойчивость универсально характеризует степень повреждения ассимиляционных органов, а в случае так называемых «невидимых повреждений» — степень нарушения фотосинтеза и связанных с ним процессов (фотохимическая активность, фотоиндуцированное свечение, содержание пигментов, регуляторные функции мембран, диффузное сопротивление и др.). Любые другие показатели и функции растений: прирост или продуктивность, фенологические ритмы роста и развития, биологические особенности, анатомо-морфологическое строение и структура листьев лишь косвенно сопряжены с фотосинтетической активностью и потому их изменение нечетко и не всегда находится в прямой и пропорциональной зависимости от степени повреждения листьев и угнетения фотосинтеза. Поэтому оценка газоустойчивости растений по этим отдельным признакам не дает устойчивых однозначных и достоверных результатов.

Биологические методы. В основе биологических методов оценки газоустойчивости лежит изменение биологической реакции растений под воздействием промышленных газов на предприятиях или в экспериментальных (газовые камеры) условиях. В качестве диагностических признаков можно использовать изменение всхожести и энергии прорастания семян, скорости роста и формирования отдельных органов, элементов урожая или продуктивности растений, изменение сроков и длительности прохождения фаз развития и органогенеза, качества семян и др. Вместе с тем многие исследователи нередко отмечают отсутствие четкой связи изменения указанных параметров с газоустойчивостью видов или степенью действия газов. Несомненно, более четкая зависимость может быть получена в контролируемом экологическом режиме (фитотрон).

Рекомендуется определять устойчивость растений и степень токсичности или отравленности почв промышленными эксгалатами путем выращивания на них в первом случае большого числа видов растений, во втором — индикаторных, или чувствительных, форм. Этот метод основан на определении влияния промышленных выбросов, накопленных в почве, на различные морфобиологические характеристики растений. Известно, что количество вредных ингредиентов в почве зависит от концентрации их в воздухе или расстояния от источника и времени или длительности накопления. Для большей точности оценки необходимо однородную по физико-химическим свойствам почву в сосудах выдержать в различных зонах загрязнения воздуха, а контрольные сосуды — в условиях чистой атмосферы и после этого проводить посеvy растений. Затем на разных фазах роста и развития проводить биометрические измерения числа и размеров листьев, сырой и сухой массы их, размеров стебля, корней и др. Устойчивость растений к многим газам (исключение - H_2S и CO) коррелирует с рядом их биологических свойств - для устойчивых видов характерны большая длительность вегетации, более позднее (в конце лета) и короткое по продолжительности цветение. Указанные биологические признаки видов также можно использовать для диагностики газоустойчивости.

Анатомо-морфологические методы. Анатомо-морфологическое строение листьев растений в значительной мере характеризует скорость поглощения не только углекислого газа, но и разнообразных поллютантов. Поэтому определение изменений параметров ассимиляционного аппарата растений может служить надежным способом оценки газоустойчивости видов. К числу диагностических показателей следует отнести: вентиляруемость губчатой паренхимы листа, число и размеры устьиц (для древесных пород и цветочных растений с односторонним нижним расположением устьиц), отношение высоты палисадной ткани к высоте губчатой (древесные), толщину кутикулы и воскового налета (хвойные), степень ксероморфности строения, наличие дополнительных механических покровных образований на эпидермисе (лох серебристый), затрудняющих газообмен. Для устойчивых видов характерны большая ксероморфность строения листа, меньшая вентиляруемость губчатой паренхимы, большее число на 1 мм^2 и меньшие размеры устьиц, большее отношение высоты палисадной ткани к высоте губчатой, большая толщина кутикулы и воскового налета. Указанные особенности строения листьев могут определяться микроскопически с использованием традиционных методов и приборов.

Микроскопический метод определения вентиляруемости губчатой паренхимы сопряжен с большой трудоемкостью изготовления постоянных препаратов поперечных срезов листьев, поэтому чаще используют вакуум-инфильтрационный метод. Он позволяет определять в течение 2 ч среднюю для целого листа вентиляруемость в 4-кратной повторности у 30—50 видов и сокращает время на определение показателя по сравнению с микроскопическим методом в тысячи раз. Суть метода заключается в определении количества инфильтрируемой в лист воды, выражаемого в процентах по отношению к исходной сырой массе листа. Зная удельную плотность воды ($1 \text{ г при } +4^\circ \text{ C}$) и определив объем листа, можно рассчитать вентиляруемость (объем межклетников губчатой паренхимы) в процентах к объему целого листа. Вначале определяют сырую массу отобранных листьев в 4-кратной повторности, затем помещают их в стаканы с водой в эксикатор и откачивают воздух вакуумным насосом до разрежения $0,1-0,12 \text{ атм}$ и полного удаления воздуха из межклетников. Затем медленно впускают воздух, что приводит к заполнению межклетников листа водой. Листья обсушивают с поверхности фильтровальной бумагой и снова взвешивают. Показатель вентиляруемости P находят по формуле:

$$P = [(m_2 - m_1)/m_1] \cdot 100\%$$

где: m_1 – первоначальная масса;

m_2 – масса после насыщения межклетников водой.

Чем больше показатель вентиляруемости, тем менее газоустойчиво растение.

Цитологические методы. Промышленные газы в значительной степени проникают в лист через устьица и концентрируются в хлоропластах. Поэтому под их влиянием происходит постепенное изменение профиля хлоропластов от эллипсоидального до овального или округлого, нарушение гранулярной структуры, набухание и дегградация тилакондов, разбухание ламелл. При высоких дозах ток-

сикантов и на заключительных этапах их действия наблюдается разрушение мембран, грануляция цитоплазмы и пластидного матрикса, дезинтеграция рибосом и эндоплазматического ретикулума, агглютинация хроматина, разрушение органоидов и клеточный плазмолиз.

Нарушение клеточных структур сходно как при действии многих газов (SO_2 , Cl_2 , озон и др.), так и у разных по устойчивости видов. Опыт многих исследователей позволяет сделать вывод, что скорость появления деструктивных изменений в клетках может служить диагностическим признаком.

Морфометрические методы. В случае действия сублетальных и летальных концентраций газов устойчивость растений может определяться по степени некрообразования при повреждаемости листьев в процентах от общей поверхности или в баллах по отношению к наиболее чувствительному виду, например люцерне.

Глазомерный метод оценки процента поврежденной поверхности листа при достаточном опыте и увеличении повторности позволяет определять степень устойчивости с ошибкой $\pm 7-10\%$.

В ряде случаев при проведении специальных исследований по регулированию устойчивости растений, экологии устойчивости и в физиолого-биохимических экспериментах такая точность определения повреждаемости листьев газом недостаточна. Для растений с простой геометрической формой листа (однодольные, хвойные) разработан метрический метод оценки повреждения и газоустойчивости. Так как у однодольных клиновидная форма листа, а у хвойных — вытянутая (игла) и повреждения в обоих случаях начинаются с кончика, затем, увеличиваясь, распространяются в базальном направлении, то поврежденную часть листа или хвои можно измерить линейкой. Отношение поврежденной длины листа (хвои) к общей длине в процентах или процент повреждений их длины может служить показателем повреждаемости или газоустойчивости. Условно принято к устойчивым видам относить растения с повреждением листьев газом от 0 до 20%, среднеустойчивым — от 21 до 50%, неустойчивым — свыше 50%.

Наиболее удобным для измерения процессом у двудольных растений в экстремальных условиях является водный режим. В большинстве случаев у растений в этих случаях усиливается потеря воды, которую легко определить весовым методом на торсионных или аналитических весах. Суть метода заключается в определении изменения сырой массы единицы площади листа (берется 10—20 высечек пробоотборником) до и после действия газа. Степень снижения массы 1 см² площади листа через 5—24 ч после газации растений имеет коррелятивную прямую связь со степенью повреждения.

Весовой метод определения газоустойчивости растений позволяет определять так называемые «невидимые» повреждения или физиологические нарушения (изменение диффузного сопротивления мезофилла и устьиц, проницаемости клеточных мембран) до появления видимых некрозов.

Возможно, полезным методом оценки устойчивости у древесных растений может служить определение степени потери листьев и хвои после длительного действия сублетальных концентраций или в случае острых повреждений леталь-

ной концентрацией газа. Для этого необходимо на модельных деревьях и ветвях регулярно с наступлением вегетации измерять количество листьев (хвои) на единицу длины побега. При этом измерения лучше вести на побегах прошлых лет, а у хвойных отдельно учитывать количество хвоинок двулетних, трех-, четырех- и пятилетних.

Экологические методы. Укрепилось мнение, что газы изменяют аппертуру устьиц, благодаря чему может меняться скорость поглощения газов. В сходных условиях газации у устойчивых видов степень открытия устьиц уменьшается на 40%, у среднеустойчивых - на 18% и у неустойчивых лишь на 11%. Поэтому для оценки экологической пластичности, характеризующей степень газоустойчивости, рекомендуется определение реакции устьичного аппарата растений на действие газа по инфильтрации в межклетники различных жидкостей (метод Молиша), с оценкой ее анатомическими и порометрическими методами.

Физиологические методы. Степень повреждения растений газами прямо пропорциональна скорости поглощения их, которая в свою очередь для многих вредных ингредиентов (исключение CO и H₂S) находится в такой же зависимости от интенсивности газообмена листа. Поэтому существует ряд характерных признаков, по которым в условиях чистого воздуха можно судить о газоустойчивости видов. К ним относятся интенсивность фотосинтеза и дыхания, окислительно-восстановительный потенциал, общая оводненность листьев.

Характер нарушения физиологических процессов под влиянием ряда газов сходен у всех видов растений и выражается в двух-трехфазном изменении фотосинтеза, дыхания, транспирации и других процессов. В случае низких концентраций газов вначале наблюдается фаза активации фотосинтеза, дыхания и других процессов, а затем - фаза угнетения. Отличия между разными по устойчивости видами заключаются в том, что фазы активации и угнетения отдельных процессов у них наступают неодновременно: раньше у неустойчивых видов и позже — у устойчивых. Это, несомненно, связано с разной скоростью поглощения газа и накопления вредных соединений в клетках до активирующих, ингибирующих и летальных доз у разных по устойчивости видов.

Поэтому физиологические методы диагностики газоустойчивости растений основываются на определении ряда параметров, характеризующих физиологическую активность вида в условиях чистой среды: интенсивность газообмена (фотосинтез и дыхание), фотохимической активности (реакция Хилла), окислительно-восстановительного потенциала, общей оводненности листьев. Для устойчивых к сернистому газу видов древесных растений по сравнению с неустойчивыми характерны: пониженная интенсивность фотосинтеза, более : низкий окислительно-восстановительный потенциал, общая оводненность листьев, низкая фотохимическая активность.

В сходных экологических условиях и режиме обработки растений газом у разных по устойчивости видов наблюдается из-за разной скорости поглощения токсиканта неодинаковое изменение отдельных физиологических процессов и часто неодинаковая степень (интенсивность) нарушений. Полезно оценивать: кинетику изменения фотосинтеза (скорость наступления активации и угнетения

фотосинтеза и относительную величину их); кинетику изменения общей оводненности листьев, транспирации, степень подавления фотохимической активности хлоропластов. Предварительно при этом необходимо подобрать экспериментальным путем дозы воздействия поллютанта (концентрация-х-время), экологический режим (освещенность, влажность, температура) и интервалы (длительность) последействия.

Изменение физиологических процессов у растений под влиянием газов следует изучать, создавая концентрацию газа в токе воздуха.

Биохимические методы. У устойчивых к SO₂ видов древесных рас,- тений по сравнению с неустойчивыми больше крахмала, свободных аминокислот, но меньше органических кислот и углеводов. Различия в биохимическом составе у злаков менее существенны.

Древесные породы с различной устойчивостью к аммиаку отличаются по содержанию органических кислот (щавелевая). Для устойчивых видов по сравнению с неустойчивыми характерно меньшее содержание крахмала, гемицеллюлозы и более высокое содержание белков, сахаров (глюкоза, фруктоза), аминокислот и органических кислот.

Таким образом, биохимический состав растений не играет существенной роли в устойчивости к кислым газам и, несомненно, имеет, значение в устойчивости к аммиаку, так как органические кислоты позволяют лучше связывать и обезвреживать газ.

Вместе с тем ряд других биохимических особенностей растений (пигментный состав, содержание аскорбиновой кислоты и ферментативная активность) обнаруживает определенную связь с устойчивостью растений к газам. Устойчивые к сернистому газу древесные растения характеризуются меньшим содержанием пигментов, отношением хлорофилла «а» к «б», содержанием аскорбиновой кислоты, активности каталазы. Эти особенности связаны с низкой физиологической активностью устойчивых видов.

Перечисленные особенности рекомендуется использовать для оценки газоустойчивости вилов.

Биофизические методы исследований и диагностики устойчивости к экстремальным условиям имеют серьезные преимущества по сравнению с традиционными физиолого-биохимическими - прижизненное получение информации, изучение кинетики изменения физиологического состояния растений в процессе действия факторов, высокая чувствительность приборов и объективность получаемой информации. В настоящее время разработаны экспресс-методы оценки устойчивости растений к любым факторам с помощью био- и электро- хемиллюминесценции, фотоиндуцированного свечения.

Определение количества окисляемых веществ в листьях растений методом электрохемиллюминесценции (ЭХЛ). Метод определения количества окисляемых веществ в листьях растений с помощью 0,1 N-раствора перманганата калия субъективен из-за нечеткого изменения окраски зеленых растворов. Объективным методом определения содержания окисляемых веществ является окисление их с помощью выпрямленного анодного тока 10- 20 мВ на квантометрической уста-

новке с чувствительным фотоумножителем. При этом необходимо оценивать количество окисляемых веществ в 1 г сырой массы листа после полного окисления профильтрованного гомогената или отсчет свечения снимать после выхода на устойчивое плато либо через определенный, равный, промежуток времени после включения анодного тока. В любом из этих способов регистрации свечения интенсивность окисления фильтрата будет пропорциональна количеству окисляемых в ячейке веществ, извлеченных из одинаковой навески листьев. Гомогенизацию листа (0,2 г) производят с добавлением 10 мл электролита (0,01 N Na₂SO₄). Интенсивность ЭХЛ-фильтрата листа устойчивых видов ниже, чем у неустойчивых, на 12—18% и более.

Определение газостойчивости растений методом фотоиндуцированного свечения. Для записи кинетики ДПС (длительного послесвечения) лист растения зажимают в держателе фосфороскопа и после включения света записывают сигнал на самописце до выхода кривой свечения на стационарный уровень (1-3 мин). Перед опытом растение выдерживают в темноте 20—30 мин. На ленте потенциометра измеряют размеры: максимум ДПС после включения света (*H*); плато ДПС (*h*); расстояние от максимума ДПС до плато (*e*). Указанные параметры ДПС характеризуют в определенной мере работу фотосинтетического аппарата растений.

При выдерживании разных по устойчивости к SO₂ видов на рассеянном свете (1—2 тыс. лк) их кинетические кривые ДПС различны. У устойчивых видов по сравнению с неустойчивыми меньше максимум ДПС (*H*) и плато (*h*) в 3—4 раза, а разность *H* – *h* - в 15—20 раз. Различия в максимуме ДПС у газонных злаков при +20°C составляют 41%, при +30°C - 50%. При темновой подготовке растений (1—3 ч) различия в кинетике ДПС сохраняются, но несколько уменьшаются. Длительная темновая подготовка (3 сут) приводит к усилению ДПС листьев и более значительному (на 59—100%) у чувствительных видов. Таким образом характер фотоиндуцированного свечения листьев характеризует фотосинтетическую активность и газостойчивость растений.

Электрометрическое измерение проницаемости клеточных мембран по десорбции электролитов/ Накопление ионов в клеточной мембране, с одной стороны, и усиление свободнорадикальных окислительных процессов в липидах, с другой, приводит к нарушению тонкого молекулярного строения плазмалеммы и ее регуляторной функции. Это отражается на способности мембраны регулировать проницаемость и поддерживать водный баланс клетки. Нарушение регуляторной функции плазмалеммы под влиянием газов можно регистрировать несколькими методами: по изменению проницаемости мембран (десорбция электролитов в дистиллированную воду); по изменению концентрации ионов в клетке (изменению электропроводности гомогената).

Для измерения проницаемости клеточных мембран точную навеску свежих листьев (0,5 г) или 5-10 высечек площадью 1-3 см² помещают в дистиллированную воду (10 мл) на 3-5 ч. После этого определяют электропроводность дистиллированной воды без растений, воды, в которой лежали высечки с растениями без

действия газа (контроль), и воды с высечками листьев растений, подвергнутых действию газа (опыт).

У опытных (после действия газа) растений увеличивается проницаемость клеточных мембран, определяемая по электропроводности. Изменение проницаемости мембран под влиянием газов имеет двухфазный характер: вначале слабое уменьшение, а затем увеличение, которые могут характеризовать в определенной мере газоустойчивость видов. С другой стороны, степень увеличения проницаемости мембран может характеризовать степень действия газов на растения (концентрация-х-время действия), токсичность газов. Чем выше концентрация и время действия газа, токсичность его, тем сильнее нарушение регуляторных функций мембран. Различия в изменении проницаемости клеточных мембран у видов вызваны неодинаковой скоростью поглощения газа, и потому коррелируют с газоустойчивостью.

Изменение электропроводности гомогената листьев (0,5 г сырой массы листьев в 10 мл дистиллята) опытных растений по сравнению с контролем характеризует изменение содержания свободных ионов в клетке вследствие накопления газа и изменение связываемости их белковыми соединениями, степени метаболических превращений. Как и в предыдущем случае, под влиянием SO_2 у растений наблюдается вначале слабое уменьшение электропроводности гомогената листьев, а затем увеличение. Кинетика изменения электропроводности гомогената в зависимости от дозы действия газа различна у видов и характеризует газоустойчивость растений.