

УДК 581.14:57.044

МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРИРУЮЩИХ КОРНЕЙ ТОМАТА (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) СОРТА “РЕКОРДСМЕН” В УСЛОВИЯХ NaCl-ЗАСОЛЕНИЯ *IN VITRO*

© 2019 г. Л. Р. Богоутдинова^{1,2, *}, Е. Н. Баранова¹, Г. Б. Баранова¹, Н. В. Кононенко¹,
Е. М. Лазарева^{1,3}, Е. А. Смирнова^{1,3}, М. Р. Халилуев^{1,2}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,
Москва, 127550 Россия

²Кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства

Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550 Россия

³Кафедра клеточной биологии и гистологии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119991 Россия

*E-mail: bogoutdinova_lr@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.07.2019 г.

После доработки 04.09.2019 г.

Принята к публикации 09.09.2019 г.

Целью настоящего исследования являлся сравнительный анализ корней томата, регенерированных *in vitro* при добавлении в питательную среду NaCl в концентрациях 0–250 мМ. В ходе изучения процесса морфогенеза на органном уровне были установлены концентрации NaCl, ингибирующие ризогенез, а также проведен морфометрический анализ регенерированных корней у ювенильных проростков (число и длина регенерированных корней, а также их сырая и сухая биомасса). В результате цитологического анализа были обнаружены нарушения на тканевом уровне, выражавшиеся в изменении степени вакуолизации клеток корневого чехлика и клеток первичной коры корня (КПКК) в условиях засоления. При некоторых концентрациях NaCl отмечено существенное изменение длины корневого чехлика (50–100 и 250 мМ NaCl) и числа его слоев (50, 75, 150–250 мМ NaCl), площади клеток центрального цилиндра (КЦЦК) (75–150 и 250 мМ NaCl), КПКК (100–200 мМ NaCl), а также показателя ядрышко-ядерного соотношения (25, 50 и 200 мМ NaCl) в клетках этих тканей. Методом цитофотометрии было показано увеличение числа интерфазных клеток корневой меристемы в G₂-фазе при одновременном уменьшении этого показателя в G₁-фазе. С помощью иммунофлуоресцентного мечення выявлены различные варианты дезорганизации альфа-тубулинового цитоскелета в интерфазных клетках меристемы корня. Методом трансмиссионной электронной микроскопии выявлены структурные изменения пластид в клетках корневого чехлика, КПКК и КЦЦК, а также изменения организации ядерного компартмента в КПКК при действии NaCl в концентрации 150 мМ. Указанные характеристики могут быть использованы для сравнительной оценки генотипов томата в условиях засоления на разных уровнях организации. Предложенный методологический подход может быть также применен и для культур, не имеющих трудностей с индуцируемым ризогенезом в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: *Solanum lycopersicum* L., регенерация корней *in vitro*, NaCl-засоление, тубулиновый цитоскелет, анатомическое строение корня, корневой чехлик

DOI: 10.1134/S0041377119120022

Известно, что главными факторами, определяющими повреждающее действие засоления на растения, являются осмотический стресс и накопление токсичных ионов (Strogonov, 1974; Serrano et al., 1999). Высокие концентрации ионов Na⁺ и Cl[–] индуцируют образование избыточного количества активных форм кислорода (АФК), способствуют разруше-

нию цитохромов и фрагментации ДНК (Andronis, Roubelakis-Angelakis, 2010; Suzuki et al., 2011). Кроме того, солевой стресс вызывает изменение проницаемости плазмалеммы и селективного транспорта ионов, что, в свою очередь, приводит к нарушению гомеостаза (Zhang, Shi, 2013). В условиях засоления происходит снижение активности фотосинтеза, ингибирование активности и стабильности ферментативных и структурных белков, изменения структуры цитоскелета (Lugan et al., 2010; Peleg et al., 2011). Гиперосмотический стресс приводит к программируе-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода, ИМК – 3-индолилмасляная кислота, МС – питательная среда Мурасиге и Скуга, КПКК – клетки первичной коры корня, КЦЦК – клетки центрального цилиндра корня, ПКГ – программируемая клеточная гибель.

мой клеточной гибели (ПКГ) (Huh et al., 2002; Ji et al., 2013).

Поскольку корень в первую очередь сталкивается с избыточным содержанием ионов Na^+ и Cl^- , солевой стресс оказывает непосредственное влияние на его архитектуру (Hajer et al., 2006). В ряде исследовательских работ было показано, что высокие концентрации NaCl ингибировали образование корневых волосков (Wang et al., 2008), тогда как в условиях слабого засоления, напротив, наблюдалось стимулирование их образования (Ji et al., 2013). Известно, что рост корня происходит в результате образования новых клеток путем их деления и последующего растяжения (Гудков, 1986; Burssens et al., 2000; Узбеков, 2004). Ингибирование формирования и роста корней в условиях засоления обусловлено подавлением пролиферативной активности клеток (West et al., 2004; Perilli et al., 2012) и (или) нарушением скорости их растяжения (Shibli et al., 2007).

Томат (*Solanum lycopersicum* L.) высокочувствителен к избыточному засолению почвы (Turhan et al., 2009) и широко используется в качестве модельного объекта для изучения механизмов устойчивости к данному стрессовому фактору. В ряде исследовательских работ было продемонстрировано, что у диких видов *Solanum* (*S. peruvianum* L.), отличающихся повышенной устойчивостью к данному стрессовому фактору, засоление негативным образом влияет на ростовые характеристики корневой системы (Tal, 1971; Mittova et al., 2002).

Повышение осмолярности почвенного раствора вызывает уменьшение объема цитоплазмы и снижение тургора клетки, что, в конечном итоге, может приводить к обратимому и необратимому плазмолизу. Считается, что гибель отдельных клеток корня при кратковременном солевом стрессе является защитным механизмом, необходимым для поддержания целостности корневой системы (Huh et al., 2002; Gémes et al., 2011). Однако с увеличением продолжительности солевого стресса происходит гибель не только отдельных клеток, но и ряда тканей или корней у многих видов растений, включая томат (Bagniewska-Zadworna, Arasimowicz-Jelonek, 2016). Предположительно, образование АФК митохондриями в стрессовых условиях является пусковым механизмом для индукции различных типов ПКГ (Navrot et al., 2007).

В настоящее время для получения устойчивых к засолению сортов различных видов растений широко используются методы клеточной и генной инженерии. Метод культуры *in vitro*, позволяющий создавать и поддерживать константные контролируемые условия, упрощает отбор устойчивых генотипов за короткий период времени. В ряде исследований установлена положительная корреляция морфо-биологических показателей в условиях засоления между каллусной тканью томата *in vitro* и целым растением *in vivo* (Pérez-Alfocea et al., 1994). Для оценки солеустойчивости культурного и дикого видов томата

Кано с соавторами (Cano et al., 1998) в качестве экспланта *in vitro* использовали побеговую апикальную меристему. Авторы пришли к выводу, что показатель частоты ризогенеза, а также число регенерируемых *in vitro* корней наиболее пригодны и информативны для быстрой сравнительной оценки и скрининга генотипов, устойчивых к засолению. Однако существует и противоположная точка зрения, согласно которой данных, полученных с помощью одного метода клеточной селекции, недостаточно для сравнительной оценки сортов томата при действии абиотических стрессовых факторов (Mercado et al., 2000). В связи с этим, оценку устойчивости растений к засолению необходимо проводить комплексно с использованием различных морфо-биологических, физиолого-биохимических, цитологических и молекулярно-генетических показателей.

Таким образом, цель настоящей работы — сравнительный анализ корней томата, регенерированных *in vitro* на питательных средах с различным содержанием NaCl , на органном, тканевом, клеточном и субклеточном уровнях по ряду морфо-биологических (число, длина, сырая и сухая биомасса регенерированных корней), а также количественных (размерные характеристики клеток и их отдельных компартментов) и качественных (структурная организация клеток и их отдельных компартментов) цитологических показателей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследований служили корни проростков томата *Solanum lycopersicum* L. ($2n = 24$) сорта Рекордсмен.

Получение асептических донорных проростков. Асептические проростки томата были получены из семян, которые подвергали поверхностной стерилизации в течение 10 с в 96%-ном этаноле, а затем в течение 7–8 мин в 20%-ном водном растворе хлорсодержащего коммерческого отбеливателя АСЕ с добавлением 0.01% Tween 20. Стерилизованные семена 3–4 раза промывали автоклавированной дистиллированной водой и помещали в культуральные сосуды с питательной средой на основе минеральных компонентов и витаминов, составленных по прописи базовой среды Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) а также дополненной 3%-ной сахарозой и 0.7%-ным агаром. Перед автоклавированием pH питательных сред доводили 1 М КОН до 5.7–5.8. Стерилизацию питательной среды осуществляли автоклавированием в течение 20 мин при 121°C и давлении 1.1 атм. Проростки культивировали в условиях световой комнаты при температуре 23–25°C, освещенности 2.5–3.0 клк и фотопериоде 16/8 ч (день/ночь).

Имитация NaCl засоления в условиях *in vitro*. У 8–10-суточных асептических проростков томата на стадии начала образования первого настоящего листа отсекали корень и часть гипокотыля. Впослед-

ствии фрагменты побеговой части проростков переносили в культуральные сосуды с питательной средой для индукции ризогенеза ($\frac{1}{2}$ дозы макро- и микросолей по прописи МС, 2% сахарозы, 0.7% агар, 0.2 мг/л 3-индолилмасляной кислоты (ИМК) (Sigma, США), с добавлением NaCl в концентрациях 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 и 300 мМ. Раствор ИМК пропускали через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0.22 мкм (Millipore, США) и добавляли после автоклавирования в охлажденную до 45°C питательную среду. В каждом варианте эксперимента использовали 10 проростков, повторность трехкратная.

Оценку частоты ризогенеза и морфометрическую характеристику корней проводили на 8 сут эксперимента. Частоту ризогенеза (%) определяли как отношение числа проростков, у которых происходил органогенез корней, к их общему числу. Кроме того, в процессе культивирования отмечали время начала корнеобразования. Учитывали количество (шт.) и длину (см) регенерированных корней, а также их сырую и сухую биомассу (мг). Сырую и сухую биомассу корней оценивали гравиметрическим методом с использованием аналитических весов (Sartorius, Германия). Для определения сухой биомассы корни инкубировали при температуре 65°C до достижения постоянного веса.

Световая и трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Фрагменты кончиков корней длиной 0.4 см фиксировали в 2.5%-ном растворе глutarового альдегида (Merck, Германия) на 0.1 М фосфатном буфере Соренсена (pH 7.2) с добавлением 1.5%-ной сахарозы в течение 2 ч при комнатной температуре. После отмывки от фиксатора в 0.1 М буфере Соренсена (pH 7.2) корни дофиксировали 1%-ным OsO₄ (Sigma, США) в течение 1 ч при 4°C. Впоследствии растительный материал обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации (30, 50, 70, 96 и 100%), затем в окиси пропилене (Fluka, Германия) и заключали в смесь эпоксидных смол Epon-812 и Araldit M (Merck, Германия) по стандартной методике (Уикли, 1975).

Срезы толщиной 1–2 мкм изготавливали стеклянным ножом с помощью ультрамикротомы LKB-V (LKB, Швеция), помещали на предметные стекла и заключали в смесь эпоксидных смол. Полутонкие срезы анализировали и фотографировали в микроскопе Olympus BX51 (Olympus, Япония), оборудованном камерой Color View II (Soft Imaging System, Германия). Морфометрические характеристики клеток корня определяли с помощью программного обеспечения Cell A (Olympus, Япония). Для определения длин и площадей клеток колумеллы, центрального цилиндра (КЦЦК) и первичной коры (КПКК) каждого опытного варианта анализировали не менее 200 клеток корней независимых проростков.

Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-V (LKB, Швеция) с помощью алмазного но-

жа (OU PONT Instruments, США), помещали на покрытые формваровой подложкой бленды и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Препараты анализировали и фотографировали на электронном микроскопе H-500 (Hitachi, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Фиксация и приготовление препаратов мацерированных клеток. Иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью антител к тубулину. Корни проростков (3–4 мм) фиксировали в 4%-ном параформальдегиде (Sigma-Aldrich, США) в РНЕМ-буфере, pH 6.9 (60 мМ PIPES, 25 мМ HEPES, 10 мМ EGTA и 2 мМ MgCl₂; все компоненты Sigma-Aldrich, США) в течение 1.5–2 ч при комнатной температуре. Фиксатор отмывали в РНЕМ-буфере. Отделяли зону меристемы (3 мм) и помещали в мацерующий раствор, содержащий 2% раствор целлюлазы и пектиназы (Sigma-Aldrich, США) на Na-ацетатном буфере (pH 5.0) на 30 с, после чего обработанные корни перемещали в РНЕМ-буфер. Затем корни переносили в каплю буфера на покровное стекло и разделяли на клетки препаровальной иглой. Полученные препараты высушивали при 4°C в течение 24 ч.

Образцы на 30 мин помещали в 0.5% Triton X-100, приготовленный на РНЕМ-буфере, содержащий 5% DMSO. Далее препараты отмывали в 10 мМ Трис-буфере (pH 7.6) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре с моноклональными мышинными антителами к α -тубулину (клон DM1a) (разведение 1 : 400) (Sigma-Aldrich, США) на 10 мМ Трис-буфере (pH 7.6), содержащем 0.1% BSA. Затем препараты последовательно отмывали в 10 мМ Трис-буфере (pH 7.6) и 20 мМ Трис-буфере (pH 8.2) и инкубировали с козыми антителами к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1 : 400, в течение 45 мин при 37°C. Препараты окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США), заключали в Mowiol 4-88 (Hoechst, Германия) и анализировали на микроскопе Axiovert 200 M (Zeiss, Германия) с эпифлуоресцентным освещением и набором фильтров (с пиком возбуждения 450–480 нм и пиком эмиссии 515–565 нм для Alexa Fluor 488; с пиком возбуждения 365 нм и пиком эмиссии 420 нм для DAPI) и объективом Neofluar 100/1.24. Изображения получали с помощью цифровой камеры AxioCam HRm (Carl Zeiss, Германия) и обрабатывали в программе Adobe Photoshop 6.0.

Цитофотометрический анализ. Фрагменты кончиков корней томата длиной 0.5 см фиксировали в смеси этанола и уксусной кислоты (3 : 1) в течение 3 ч, гидролиз проводили 5 N HCl в течение 40 мин при 22°C. Препараты окрашивали реактивом Шиффа (Merck, Германия). Содержание ДНК определяли в относительных единицах на цитофотометре SMP20 (Opton, Германия) с объективом $\times 16$, окуляром $\times 10$ и зондами 0.08–2.5 мм. В качестве стандарта использовали ядра меристематических клеток корня в ста-

дях телофазы (2С) или метафазы (4С). Выборка для каждой экспериментальной точки составляла не менее 300 ядер из клеток 15 фрагментов корней.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием параметрических критериев Стьюдента, Фишера и Дункана. Расчеты осуществляли с помощью статистической программы AGROS (версия 2.11) и стандартных пакетов программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В процессе культивирования проростков на питательной среде МС с добавлением 0.2 мг/л ИМК были установлены концентрации хлорида натрия, ингибирующие органогенез корней. Так, незначительное снижение частоты ризогенеза на 8 сут культивирования (93.3%) у проростков томата сорта Рекордсмен наблюдали на среде, содержащей 250 мМ NaCl, тогда как на среде с добавлением 300 мМ NaCl регенерации корней не происходило вовсе. Следует отметить также, что с возрастанием концентрации NaCl в питательной среде для индукции ризогенеза (150 мМ и более) установлено увеличение продолжительности периода с начала появления регенерируемых корней. Так, в контрольных и в опытных условиях при действии NaCl в концентрации 100 мМ ризогенез начинался на 4 сут эксперимента, в то время как при действии NaCl в концентрациях 150, 200 и 250 мМ — на 5, 6 и 7 сут соответственно.

Установлены концентрации NaCl в питательной среде для индукции ризогенеза, которые оказывали существенное влияние на число регенерируемых корней у проростков, а также их длину по сравнению с контролем (рис. 1). Так, достоверное уменьшение числа регенерирующих корней (рис. 1а), а также их длины (рис. 1б) отмечено на средах, содержащих NaCl в концентрациях 150 и 100 мМ соответственно. Последующее уменьшение числа и длины корней происходило с увеличением содержания NaCl. Впоследствии была оценена сырая (рис. 1в) и сухая (рис. 1г) биомасса регенерируемых корней. Установлена обратная зависимость между показателем сырой биомассы корней, регенерированных на одном проростке, и интенсивностью NaCl-засоления. Несмотря на то, что ингибирование числа и длины корней *in vitro* происходило в условиях сильного засоления, снижение сырой биомассы по сравнению с контролем отмечено уже при минимально изученной концентрации (25 мМ) NaCl. Напротив, статистически значимое постепенное уменьшение сухой биомассы корня отмечено только при действии NaCl в концентрациях 100–250 мМ.

Известно, что растительные клетки, подвергнутые стрессовому воздействию, характеризуются временной остановкой клеточного цикла, замедленной репликацией ДНК, что приводит к снижению пролиферативной активности клеток корневой мери-

стемы и роста корня. В результате проведенного нами цитофотометрического анализа было установлено, что стрессовое воздействие, обусловленное повышенной концентрацией NaCl, вызывает изменения параметров клеточного цикла в меристематических клетках корня, что проявляется в перераспределении клеток по фазам клеточного цикла (рис. 2). В целом можно отметить, что у контрольных растений более 60% интерфазных клеток корневой меристемы находилось в G₁-фазе, тогда как наименьшее число клеток — в G₂-фазе. Увеличение концентрации NaCl в составе питательной среды приводило к увеличению числа клеток корневой меристемы, находящихся в G₂-фазе, при одновременном их уменьшении в G₁-фазе клеточного цикла. Перераспределение клеток по фазам клеточного цикла в сторону преобладания клеток в G₂-фазе отмечено при действии NaCl в концентрациях 150 и 200 мМ.

Следующим этапом настоящего исследования была оценка влияния NaCl-засоления на анатомо-морфологическую структуру клеток корня методом световой микроскопии (рис. 3). На продольных срезах корней в условиях засоления отчетливо можно видеть увеличение степени вакуолизации клеток корневого чехлика (25, 100–250 мМ NaCl) (рис. 3б, д–з) и КПКК (25, 75, 150, 200 и 250 мМ NaCl) (рис. 3б, г, е–з) по сравнению с контролем. Кроме того, отмечается изменение длины клеток колумеллы (табл. 1) и чехлика в целом (рис. 4а), а также числа его слоев (рис. 4б) при действии NaCl. Так, по сравнению с контролем наблюдается увеличение размеров клеток колумеллы при действии NaCl в концентрациях от 25 до 50 мМ и от 75 до 250 мМ. В целом, увеличение длины корневого чехлика по сравнению с контролем было отмечено на средах, содержащих NaCl в концентрациях 50–100 и 250 мМ (рис. 4а). При этом во всех опытных вариантах за исключением 25 и 100 мМ NaCl происходило уменьшение числа его слоев (рис. 4б). В ряде случаев также отмечено существенное влияние NaCl на размеры КПКК и КЦЦК (рис. 5а). Особенно это установлено в отношении КЦЦК. Так, в зависимости от концентрации NaCl в составе питательной среды наблюдалось как увеличение (100 мМ), так и уменьшение (150 и 200 мМ) площади клеток КПКК относительно контроля. Напротив, в КЦЦК увеличение площади клеток происходило при действии NaCl в концентрациях 75–150 мМ. При этом в условиях 200 и 250 мМ NaCl-засоления, при котором наблюдалось сильное ингибирование числа регенерируемых побегов, а также их ростовых характеристик, отмечалось постепенное уменьшение данного показателя.

Важным показателем, характеризующим метаболическое и функциональное состояние растительной клетки, является ядрышко-ядерное соотношение ($S_{\text{ядрышка}}/S_{\text{ядра}}$). Низкие концентрации NaCl (25–50 мМ) приводили к снижению этого показателя в КПКК и КЦЦК, тогда как при последующем уве-

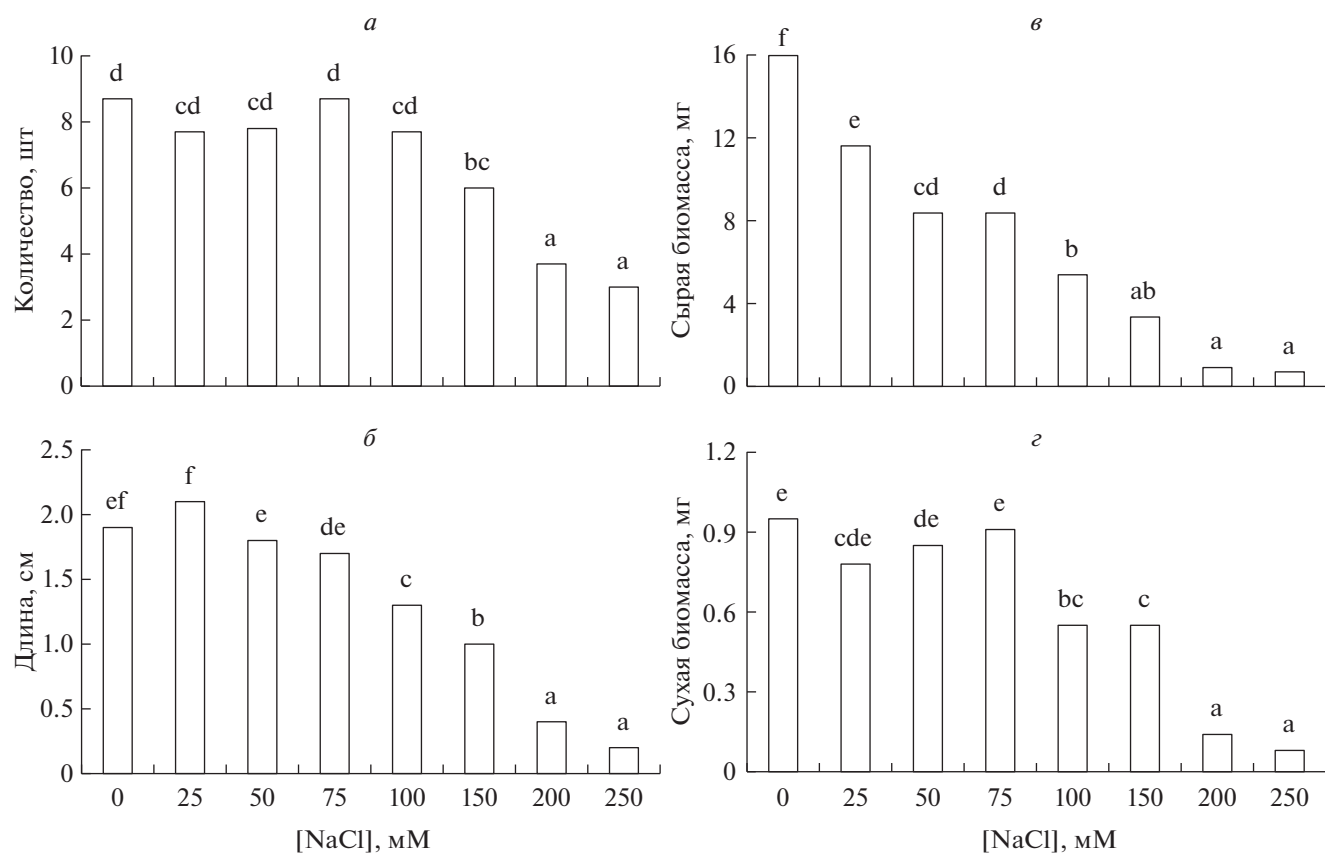


Рис. 1. Влияние различных концентраций NaCl в составе питательной среды для индукции ризогенеза на количество корней (а), длину корня (б), а также сырую (в) и сухую (г) биомассу. Одинаковыми буквами обозначены экспериментальные группы, для которых с использованием критерия Дункана были выявлены статистически незначимые различия ($\alpha = 0.05$) между средними значениями (трехкратная повторность по 10 проростков в каждой).

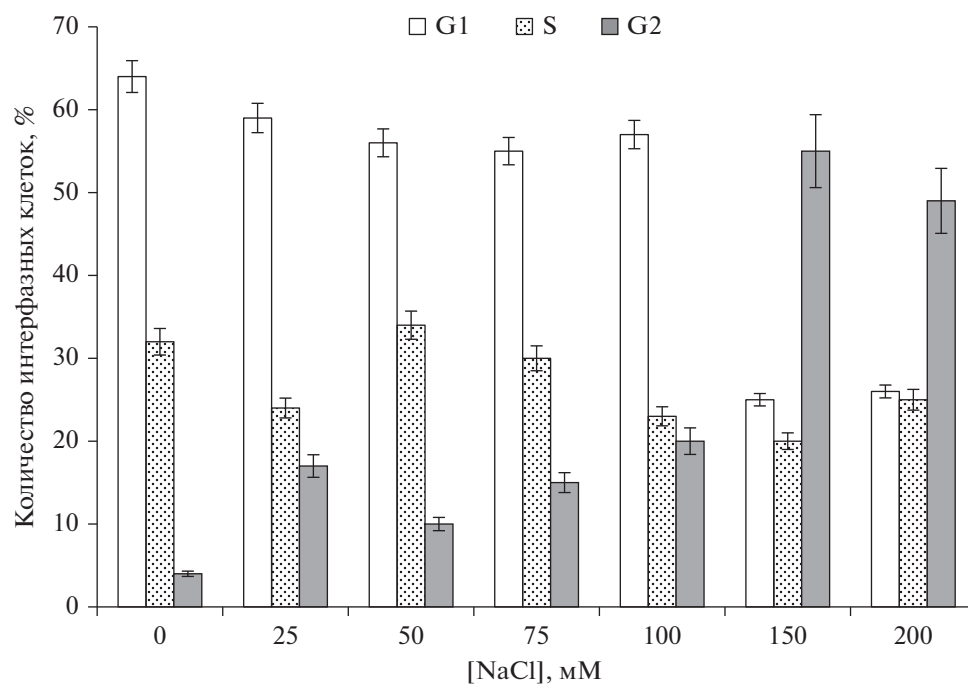


Рис. 2. Влияние NaCl в питательной среде (диапазон концентраций 0–200 mM) на распределение клеток корневой меристемы по фазам клеточного цикла. Данные представлены в виде средних значений и ошибки средней.

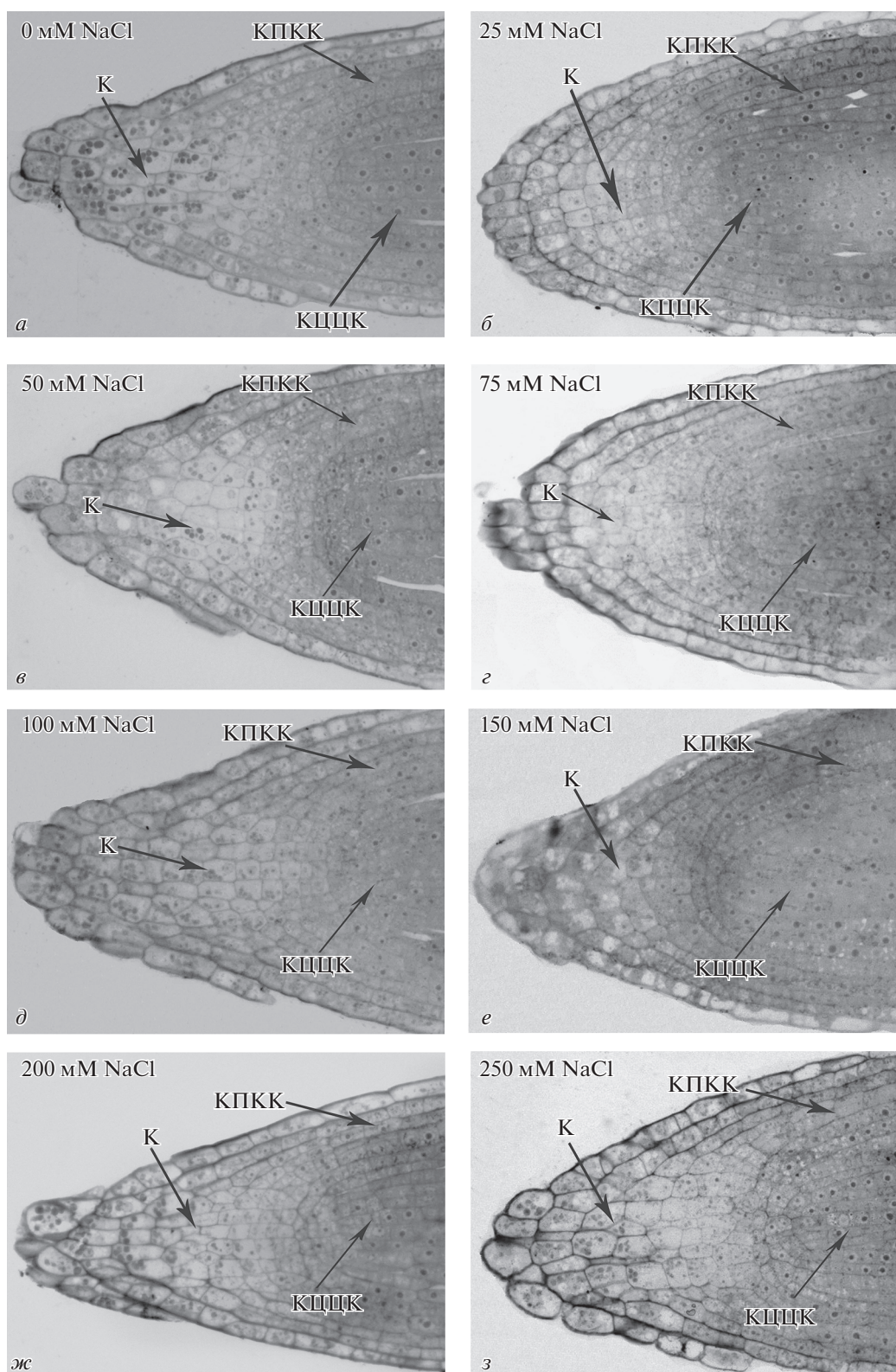


Рис. 3. Продольный срез корней томата сорта Рекордмен, регенерированных *in vitro* в контрольных условиях (а), а также при действии NaCl в различных концентрациях (25–250 мМ) (б–з соответственно). Условные обозначения: К – клетки колумеллы, КПКК – клетки первичной коры корня, КЦЦК – клетки центрального цилиндра корня. Увеличение объектива $\times 20$.

личении содержания NaCl в питательной среде (75–100 мМ NaCl) значения данного показателя возвращались к контрольному уровню (рис. 5б). При действии NaCl в концентрациях 150–250 мМ $S_{\text{ядрышка}}/S_{\text{ядра}}$ в данных типах клеток соответствовала контрольным значениям, за исключением варианта 200 мМ NaCl, в котором ядрышко-ядерное соотношение достоверно уменьшалось в КЦЦК.

Отмеченные ранее различия в длине корня, а также морфометрических характеристиках клеток могут быть обусловлены дезорганизацией цитоскелета клеток под действием NaCl-засоления. В действительности оказалось, что расположение кортикальных микротрубочек в интерфазных клетках корня менялось при хлоридном засолении (рис. 6). В большей части клеток корневой меристемы контрольных растений, находящихся в интерфазе, можно отчетливо наблюдать упорядоченную кортикальную сеть, состоящую из параллельно расположенных пучков микротрубочек (рис. 6а). В условиях NaCl-засоления у большинства клеток отмечается дезорганизация кортикальных микротрубочек, выражающаяся в нарушении их параллельности относительно друг

Таблица 1. Длина клеток колумеллы корневого чехлика при действии NaCl в различных концентрациях

[NaCl], мМ	Увеличение длины клеток колумеллы, % относительно контроля
25	10.2
50	37.8
75	18.9
100	39.3
150	55.1
200	52.0
250	56.7

другу (рис. 6б–з). Кроме того, при действии NaCl в концентрациях 25–150 и 250 мМ формировались неоднородные по плотности “прореженные” пучки кортикальных микротрубочек (рис. 6б–е, з). При этом можно отчетливо наблюдать, что пучки кортикальных микротрубочек, расположенные в клетках корней, регенерированных на средах с добавлением NaCl в концентрации 150 и 250 мМ, были значитель-

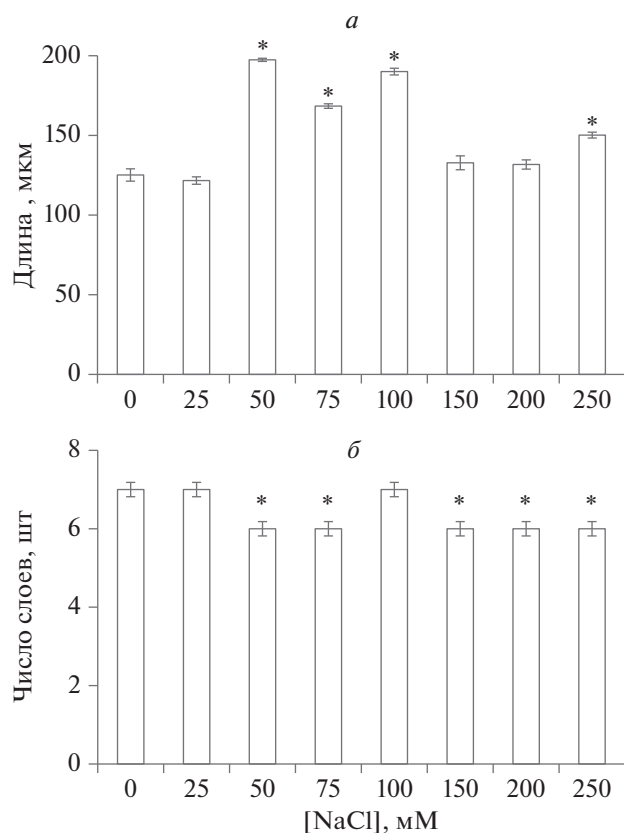


Рис. 4. Влияние NaCl-засоления на длину (а) и число слоев (б) корневого чехлика. Для каждого варианта представлены средние значения и "ошибки средней". * Обозначены варианты, статистически значимо отличающиеся от контроля ($\alpha = 0.05$).

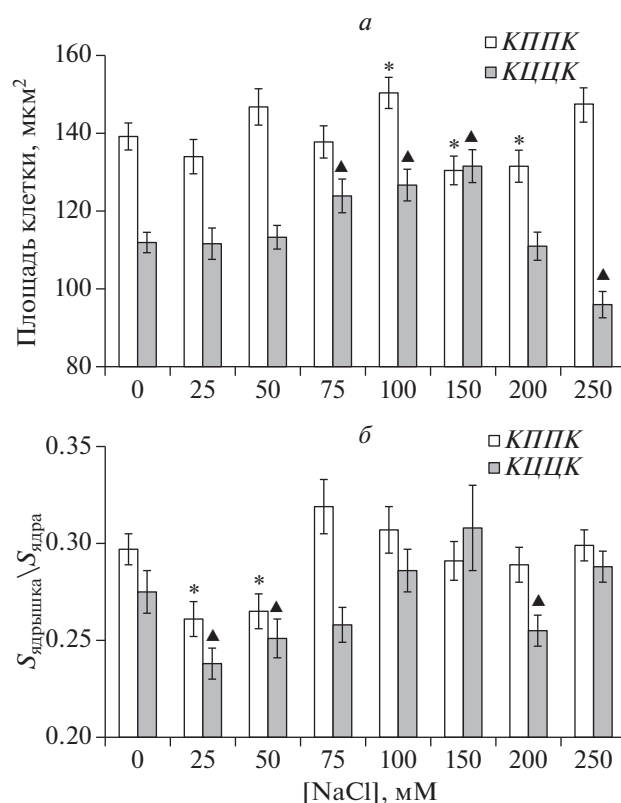


Рис. 5. Влияние NaCl-засоления на площадь клеток (а), а также ядрышко-ядерное соотношение (б) КППК и КЦЦК. Для каждого варианта представлены средние значения и "ошибки средней". * и ▲ обозначены варианты, статистически значимо отличающиеся от соответствующего контроля ($\alpha = 0.05$).

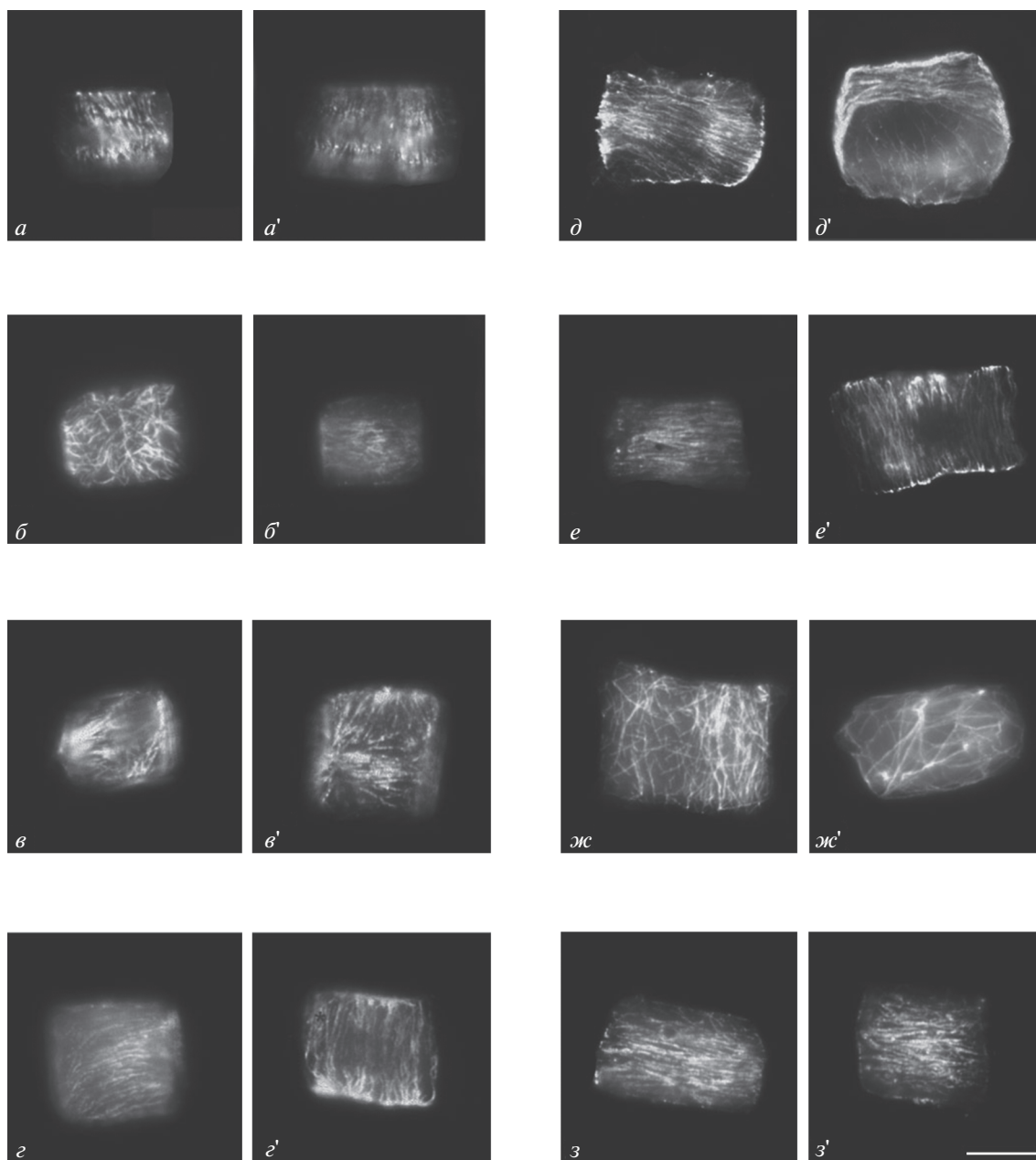


Рис. 6. Иммуноцитохимическое выявление α -тубулина в интерфазных клетках корня проростков томата сорта Рекордсмен в контрольных условиях (*a, a'*), а также при действии NaCl в различных концентрациях (25–250 мМ) (*б, б'* – 25 мМ NaCl; *в, в'* – 50 мМ NaCl; *з, з'* – 75 мМ NaCl; *д, д'* – 100 мМ NaCl; *е, е'* – 150 мМ NaCl; *ж, ж'* – 200 мМ NaCl; *з, з'* – 250 мМ NaCl). Масштабный отрезок – 10 мкм.

но тоньше и короче, чем в контроле (рис *бe, з*). Различия между контрольным и экспериментальными вариантами в структурной организации тубулинового цитоскелета, установленные путем иммуноцитохимического окрашивания, были подтверждены методом ТЭМ (рис. 7). Так, в интерфазных клетках корня в контрольных образцах выявляются типичные микротрубочки, которые параллельными рядами располагаются вблизи клеточной стенки (рис. *7a*). В клетках корней, регенерированных на средах с до-

бавлением NaCl в концентрации 150 мМ, отчетливо видно наличие неоднородных по электронной плотности атипичных элементов цитоскелета (фибрилярно-тубулярных тяжей), отсутствующих у растений, культивируемых в стандартных условиях (рис. *7б*).

Изменения ультраструктурной организации клеток корня в условиях засоления отмечены не только в отношении тубулинового цитоскелета, но и ядерного (рис. 8), а также пластидного (рис. 9) компартментов. Так, в КПКК при действии NaCl в концен-

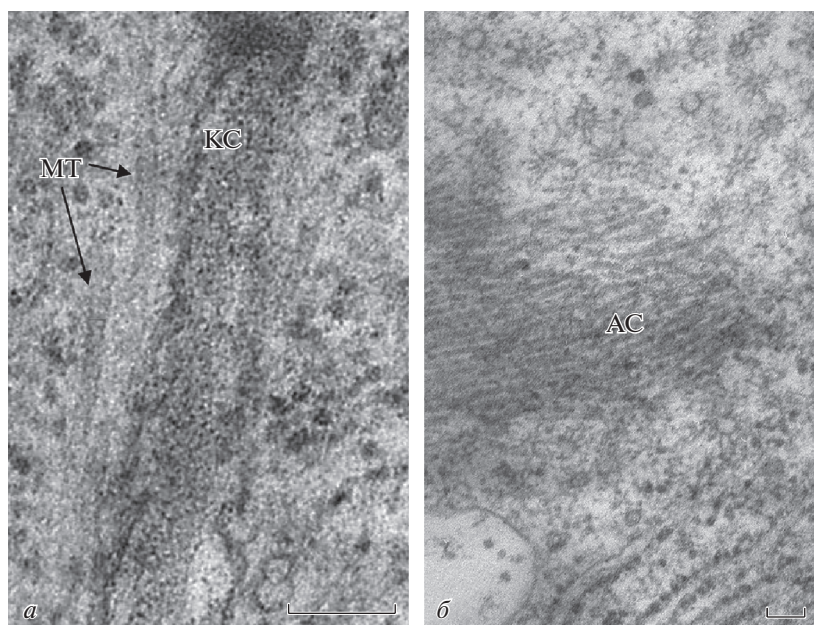


Рис. 7. Ультраструктурная организация тубулинового цитоскелета в КЦК в условиях контроля (а), а также на среде, содержащей 150 мМ NaCl (б). Условные обозначения: КС — клеточная стенка, АС — атипичные структуры, МТ — микротрубочки. Масштабный отрезок — 1 мкм.

трации 150 мМ отмечали: 1) образование инвагинаций ядерной мембраны; 2) изменение расположения конденсированного хроматина, который в контрольных условиях ассоциирован преимущественно с ядерной мембраной, а в условиях засоления многочисленные глыбки конденсированного хроматина расположены преимущественно в нуклеоплазме; 3) увеличение плотности гранулярного компонента ядрышка.

Мы также выявили в различных тканях корня структурно-функциональные преобразования пластид в условиях засоления (рис. 9). Это, прежде всего, касалось формы и размера пластид, а также их включений. Так, в клетках корневого чехлика на среде, содержащей NaCl в концентрации 150 мМ, отмечается визуальное увеличение размера крахмальных зерен и их электронной плотности. При этом форма крахмальных зерен меняется с аморфной на округлую (рис. 9а, б). В КПКК засоление приводило к визуальному увеличению размера пластид за счет появления различного размера крахмальных зерен, которые отсутствуют в контрольных условиях (рис. 9в, г). При этом менялась и их форма (округлая в контроле и удлинённая при действии NaCl в концентрации 150 мМ). В КЦК в контрольных условиях пластида представлены амилопластами правильной округлой формы с множественными аморфными включениями крахмала (рис. 9д). Напротив, в условиях засоления амилопласты вариабельны по форме, содержат существенно меньшее число темноокрашенных крахмальных зерен. При

этом они имеют четко выраженную округлую форму (рис. 9е).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании экспериментальной моделью для изучения влияния засоления на морфобиологические и структурно-функциональные характеристики подземных органов томата (*S. lycopersicum* L.) являются корни, регенерированные у ювенильных растений на питательных средах с различным содержанием NaCl. Для сравнительной оценки растений томата по устойчивости к засолению *in vitro* впервые были использованы одинаковые по габитусу и стадии развития фрагменты надземной части ювенильных проростков, которые затем культивировали на питательных средах для индукции ризогенеза с различной степенью засоления. Преимуществами этой системы является относительная простота и быстрота получения выравненного растительного материала в количестве, достаточном для последующих экспериментов. Важной составляющей является также и то, что формирование корней происходит непосредственно в четко моделируемых константных стрессовых условиях, что крайне необходимо для получения достоверных и корректных для интерпретации качественных и количественных характеристик. Это обусловлено тем, что даже незначительные изменения абиотических факторов окружающей среды кардинальным образом влияют на проявление повреждающего действия засоления на организменном, органном, тканевом, клеточном и молекулярном уровнях.

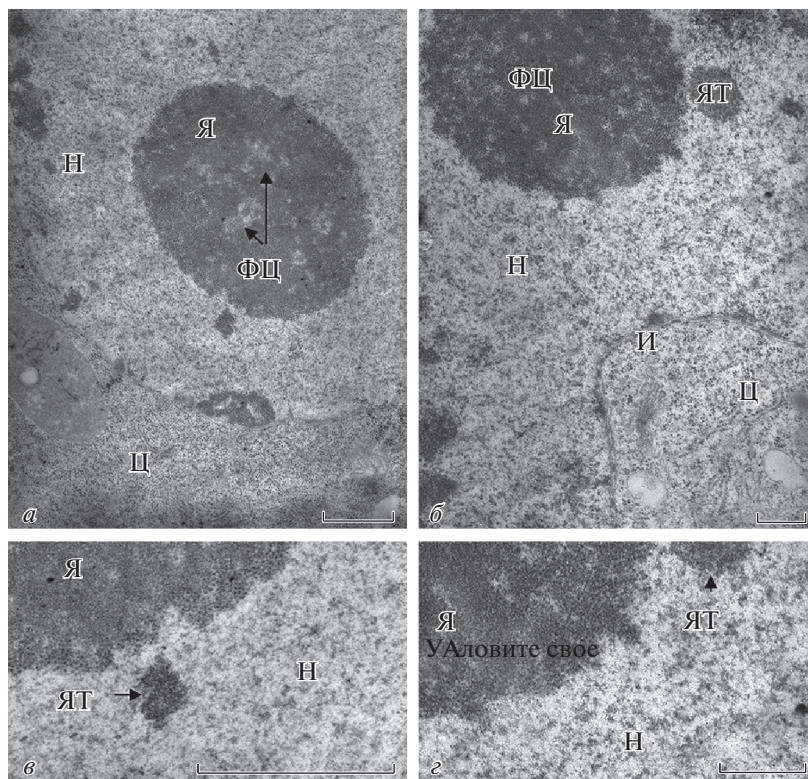


Рис. 8. Ультраструктурная организация ядра в КЦК в контрольных условиях (а), а также на среде, содержащей 150 мМ NaCl (б). Условные обозначения: И – инвагинация, Н – нуклеоплазма, ФЦ – фибриллярный центр, Ц – цитоплазма, Я – ядрышко, ЯТ – ядерное тельце. Масштабный отрезок – 1 мкм.

Одним из негативных эффектов засоления является изменение ростовых показателей различных органов растений. Хорошо известно, что ответная реакция на солевой стресс включает преимущественно подавление процессов инициации и роста первичных и боковых корней (Wang et al., 2009; Ji et al., 2013). Однако в ряде исследований отмечено, что низкие концентрации NaCl, напротив, приводят к увеличению ростовых показателей по сравнению с контролем (Wang et al., 2009). В нашем исследовании полное ингибирование ризогенеза у проростков томата сорта Рекордсмен наблюдалось на питательных средах, содержащих NaCl в концентрации 300 мМ. Достоверное уменьшение числа и длины корней происходило при действии высоких концентраций NaCl (150 и 100 мМ соответственно). При этом стимулирующего эффекта на рост корней при низком и умеренном засолении отмечено не было. Подавление ризогенеза, скорее всего, обусловлено тем, что в условиях сильного засоления (более 250 мМ NaCl) клетки гипокотыля, которые в присутствии экзогенного ауксина способны к формированию корней, полностью утрачивают пролиферативную активность.

Механизмы, за счет которых происходит торможение роста корней в условиях засоления, крайне разнообразны. Прежде всего, это обусловлено осмотическим стрессом, вызванным нарушением водно-

го баланса, а также непосредственным токсическим действием ионов Na^+ и Cl^- в избыточных концентрациях (Mitsuya et al., 2007). Дополнительное негативное воздействие NaCl, связанное с осмотическим эффектом, может быть обусловлено выходом воды из клеток вследствие более высокой осмотичности питательной среды. Уменьшение длины регенерируемых корней при осмотическом стрессе, отмеченное нами при действии NaCl в концентрациях 100 мМ и выше, связывают с уменьшением пролиферативной активности корневой меристемы (Samarajeewa et al., 1999) и ингибированием клеточного растяжения (West et al., 2004). Концентрации NaCl, при которых ингибируются ростовые процессы, существенным образом зависят от генотипа растений. Так, при сравнении сорта томата Roma и гибрида F1 Patio ранее были установлены существенные различия между генотипами *S. lycopersicum* L. по содержанию NaCl в составе питательной среды, при котором у регенерантов происходило достоверное уменьшение длины корней (Shibli et al., 2007). В настоящем исследовании уменьшение данного показателя отмечено на среде с добавлением 100 мМ NaCl.

Степень выраженности нарушения водного баланса у регенерируемых корней непосредственно связана с концентрацией NaCl в питательной среде, что подтверждается показателями сырой биомассы.

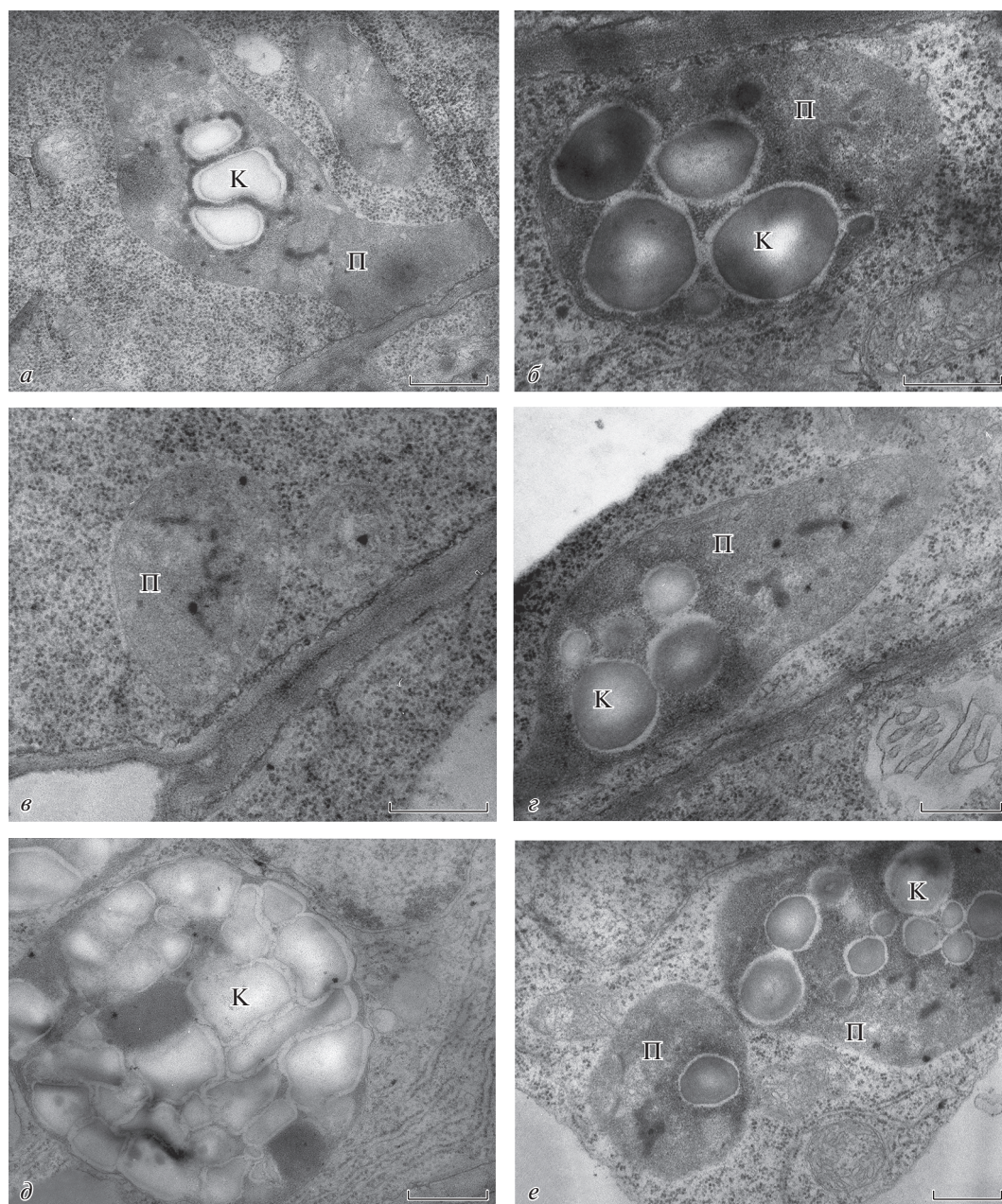


Рис. 9. Ультраструктурная организация пластид в клетках корневого чехлика (*а, б*), КППК (*в, г*) и КЦЦК (*д, е*) в контрольных условиях (*а, в, д*), а также на среде, содержащей NaCl в концентрации 150 мМ (*б, г, е*). Условные обозначения: К — крахмальные зерна, П — пластиды. Масштабный отрезок — 1 мкм.

Снижение сухой биомассы корней, которое, по-видимому, обусловлено нарушением потребления минеральных (в особенности K^+ и Ca^{2+}), а также органических составляющих и/или повышенным расходом накопленных пластических веществ (Mitsuya et al., 2007), наблюдалось только в условиях умеренного и сильного засоления (100–250 мМ NaCl).

Известно, что в условиях стресса ингибирование роста корней происходит за счет изменения параметров клеточного цикла (Samarajeewa et al., 1999; Burssens et al., 2000), что зависит от многих факто-

ров. К наиболее значимым из них можно отнести видовые особенности, возраст, условия окружающей среды (Гудков, 1986). Так, продолжительность клеточного цикла в клетках корня томата в среднем составляет 11 ч при температуре 23°C, из которых 4.3 ч приходится на S-фазу (Francis et al., 1985). Известно также, что растительные клетки, подвергнутые стрессовому воздействию, характеризуются временной остановкой клеточного цикла, замедленной репликацией ДНК. Увеличение длительности S-фазы может определяться различиями в скорости репли-

кации, числе репликонов на единицу длины ДНК. Могут возникать также временные задержки при переходах от фазы G_1 к S и от G_2 к M . Такие “блоки” G_1/S и G_2/M связаны с временным подавлением экспрессии ряда генов клеточного цикла и, как полагают, предоставляют время для репарации повреждений (Узбеков, 2004). Результаты цитофотометрического анализа свидетельствовали, что в условиях сильного засоления наблюдалось перераспределение клеток по фазам клеточного цикла в сторону увеличения числа клеток в G_2 -фазе при одновременном уменьшении в G_1 -фазе (рис. 2). Можно предположить, что, скорее всего, при действии NaCl в концентрациях 150 и 200 mM не происходило образование “блока” G_1/S , так как не установлено существенных отличий по количеству клеток, находящихся в S -фазе, между контрольной (32%) и экспериментальными (20 и 25% соответственно) группами. Вероятно, в данных условиях наблюдается блок в фазе G_2/M , который свидетельствует о подавлении митотической активности.

Результаты гистологического исследования указывают, что в условиях засоления (50, 75, 100 и 250 mM NaCl) происходило увеличение длины корневого чехлика (рис. 4). Схожая реакция на солевой стресс (25 и 50 mM NaCl) была характерна и для 4 сортов риса (Ferdose et al., 2009). Изменение ростовых характеристик клеток корневого чехлика может быть обусловлено избыточным накоплением ионов Na^+ , оказывающих токсическое действие. Так, в клетках корневого чехлика риса в условиях засоления наблюдалась экспрессия стресс-индуцибельного гена *OsPMP3*, который кодирует мембранный белок 3 (PMP3), участвующий в регуляции потенциала катионных каналов плазматической мембраны и ограничивающий поступление ионов Na^+ (Mitsuya et al., 2007). По мнению Иванова (Иванов, 1987), увеличение длины чехлика в условиях засоления обусловлено асимметричным делением клеток первого слоя, а также более высокой интенсивностью их деления и скоростью роста.

Увеличение степени вакуолизации клеток различных тканей корня (корневого чехлика, КПКК) (рис. 3), обусловленное осмотическим стрессом, приводило к изменению их размера (рис. 4a, рис. 5a). Центральную часть корневого чехлика растений класса Двудольные занимает колумелла (Armstrong, Heimsch, 1976). Двухфазное увеличение длины клеток колумеллы при действии NaCl, обнаруженное в ходе нашей работы (табл. 1), согласуется с результатами проведенных ранее исследований (Munns, Tester, 2008). Несмотря на отсутствие видимых признаков вакуолизации КЦЦК (рис. 3) наблюдалось изменение их размера, которое в зависимости от концентрации NaCl выражалось как в увеличении, так и уменьшении площади (рис. 5a). Изменение размера межклетников в паренхиме коры гипокотыля, а также формы и площади среза клеток эпидермиса и па-

ренхимы в условиях NaCl-засоления были ранее отмечены у растений томата, реакция которых существенно отличалась от исследуемого генотипа, а также концентрации NaCl в питательной среде (Богоутдинова и др., 2016). Увеличение размеров клеток различных тканей корня может быть обусловлено повышением степени вакуолизации цитоплазмы, связанной с регуляровкой осмолярности среды (Park et al., 2016). Повышение осмолярности внешней среды вызывает уменьшение объема цитоплазмы и снижает тургор, что, в конечном итоге, может вызвать плазмолиз и гибель клеток (Wood, 1999). Напротив, уменьшение размера клеток корня в условиях умеренного хлоридного засоления можно рассматривать в нескольких аспектах. С одной стороны, оно может представлять собой положительную адаптивную реакцию клеток на засоление. Известно, что нарушение водного баланса растений при действии NaCl, выражающееся в снижении оводненности тканей, приводит к уменьшению размера клеток и, тем самым, понижает осмотический потенциал клеточного сока (Кудоярова и др., 2013). С другой стороны, уменьшение клеток в размере в условиях засоления может быть обусловлено нарушениями структурной организации цитоскелета, приводящими к ингибированию растяжения клеток (Wang et al., 2010a). Повреждающее действие солевого стресса на структурную организацию цитоскелета, отмеченное в ходе настоящего исследования и выражающееся в дезорганизации кортикальных микротрубочек (рис. 6), а также появление фибриллярно-тубулярных тяжей (рис. 7), согласуются с результатами предыдущих исследований. Так, при воздействии KCl в концентрации 350 mM в течение нескольких часов кортикальные микротрубочки в корнях кукурузы пространственно переориентировались (Blancaflor, Hasenstein, 1995). Поперечная ориентация кортикальных микротрубочек в клетках BY-2 табака изменялась в течение 15 мин после обработки 150 mM NaCl (Dhonukshe et al., 2003). Причиной, по которой в условиях солевого стресса происходит реорганизация цитоскелета, является избыточное накопление АФК. Экспериментальное изменение в клетках растений уровня АФК с помощью менадиона и N-ацетилцистеина изначально приводило к разборке микротрубочек, после чего в клетках с высоким уровнем АФК формировались паракристаллические тубулиновые тяжи, а в клетках с низким уровнем АФК — атипичные тубулиновые структуры (макротрубочки) (Livanos et al., 2012).

Ядрышко — специфический субкомпаратмент ядра клетки, где происходит синтез рибосомных субъединиц. Нами было установлено, что засоление приводит к изменению размеров ядрышка и ядра в целом в КПКК и КЦЦК, что согласуется с результатами других исследователей (Teegararak et al., 2009). Показателем, характеризующим метаболическое и функциональное состояние растительной клетки, является соотношение площади ядрышка и общей площади ядра клетки. Считается, что увеличение ядерно-яд-

рышкового соотношения свидетельствует об усилении биосинтетических процессов в клетке. Так, в клетках корней пшеницы под воздействием 1 мМ ацетата кадмия наблюдалось существенное снижение показателя $S_{\text{ядрышка}}/S_{\text{ядра}}$ (60% от соответствующего значения контроля), что свидетельствовало об уменьшении активности ядрышкового организатора (Безрукова и др., 2016). Полученные нами данные показали, что минимальные из изученных концентраций хлорида натрия в питательной среде приводили к снижению настоящего показателя, тогда как при последующем повышении концентрации NaCl в питательной среде $S_{\text{ядрышка}}/S_{\text{ядра}}$ было сопоставимо с контрольным значением (рис. 5б). Данный факт может свидетельствовать о том, что растения томата исследованного генотипа являются чувствительными к солевому стрессу, но способны переносить высокие концентрации NaCl в питательной среде. Засоление приводило не только к изменению размеров ядрышка и ядра, но и их структурной организации (рис. 8). Отмеченные инвагинации ядерной мембраны (рис. 8б) могут участвовать в обмене белков между нуклеоплазмой и цитоплазмой, что подтверждается расположением инвагинаций вблизи ядрышка (Collings et al., 2000), а также увеличивать площадь контакта между ядром и цитоплазмой (Meier, 2001). Следующими важными характеристиками являлись изменение расположения фибриллярных центров и увеличение гранулярного компонента ядрышка (рис. 8б, 8г), свидетельствующее о повышении синтетической активности, возможно влияющее на меняющуюся в условиях засоления транспортировку Ca^{2+} (Thuleau et al., 2013). Существует также предположение, что конденсация хроматина, которая предположительно вызывает изменение расположения фибриллярных центров, может является одним из признаков ПКГ при солевом стрессе (Wang et al., 2010b).

Влияние солевого стресса отражалось и на ультраструктуре пластид, что, прежде всего, выражалось в изменении их формы, размера, а также качественных и количественных характеристик включений. Первые два наблюдения, характерные для стрессовых условий и показанные во всех изученных типах тканей, могут обуславливаться нарушением водного баланса (Munns, Tester, 2008; Horie et al., 2012), что согласуется с полученными ранее данными об изменении показателей сырой биомассы. Другие заметные изменения на ультраструктурном уровне касались размера крахмальных зерен. Увеличение зерен крахмала, показанное в клетках чехлика, и их образование в КПКК, может обуславливаться накоплением запасных веществ в результате нарушения их транспорта (Cuellar-Ortiz et al., 2008). В отличие от клеток чехлика и КПКК, в КЦЦК наблюдалось уменьшение количества включений при действии NaCl в концентрации 150 мМ. Можно предположить, что данный эффект вызван повышенным расходом крахмала (González-Cruz, Pastenes, 2012.) и (или) снижением скорости синтеза запасных ве-

ществ (Borek et al., 2006), что подтверждается показанными ранее значениями показателя сухой биомассы (рис. 1г). Таким образом, по результатам ТЭМ при сильном засолении установлены характерные ультраструктурные изменения в различных тканях корня по сравнению с контрольным вариантом.

Итак, при использовании данного методологического подхода в ходе исследования установлены существенные отличия ответной реакции регенерированных корней на NaCl-засоление по ряду морфометрических, анатомических и цитологических показателей. Так, на органном уровне обнаружены существенные различия по частоте ризогенеза, количеству и длине регенерированных корней, а также их сырой и сухой биомассе. Выявлены различия на тканевом уровне, выражающиеся в изменении качественных (степень вакуолизации клеток корневого чехлика и КПКК) и количественных характеристик (длины чехлика, площади КПКК и КЦЦК, ядрышко-ядерного соотношения в КПКК и КЦЦК). Изменение ростовых показателей регенерируемых корней подтверждены данными цитофотометрического анализа по изучению распределения клеток корневой меристемы по фазам клеточного цикла. Засоление приводило к дезорганизации тубулинового цитоскелета, которая, в зависимости от концентрации NaCl в питательной среде, выражалась в нарушении ориентации микротрубочек, плотности их расположения, а также структурной организации. На субклеточном уровне с помощью ТЭМ установлены существенные различия ультраструктурной организации ядерного и пластидного компартментов в контроле и после воздействия NaCl в концентрации 150 мМ. Вышеназванные характеристики могут использоваться для сравнительной оценки устойчивости томатов разных генотипов в условиях засоления на разных уровнях организации. Предложенный новый методологический подход для сравнительной оценки солеустойчивости в условиях *in vitro* может быть применен не только для томата, но и для других растений, у которых отсутствуют трудности в индуцируемом органогенезе корней. Кроме того, он может быть использован и в отношении других стрессовых воздействий абиотической природы, имитируемых в условиях *in vitro* (например, тяжелые металлы, осмотический стресс, обусловленный добавлением полиэтиленгликоля), а также при сравнительной оценке контрольных и трансгенных растений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 0574-2019-0002 (AAAA-A18-118051890089-0).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей при выполнении исследовании не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Шакирова Ф.М. 2016. Защитное действие агглютиниона зародыша пшеницы на протекание митоза в корнях проростков *Triticum aestivum* при воздействии кадмия. Физиология растений. 63(3) : 382–389. (Bezrukova M.V., Fatkhutdinova R.A., Shakirova F.M. 2016. Protective effect of wheat germ agglutinin on the course of mitosis in the roots of *Triticum aestivum* seedlings exposed to cadmium. Russ. J. Plant Physiol. 63(3) : 358–364.)
- Богоутдинова Л.Р., Баранова Г.Б., Баранова Е.Н., Халилуев М.Р. 2016. Сравнительная анатомо-морфологическая характеристика клеток эпидермиса и паренхимы коры гипокотыля у двух генотипов томата (*Solanum lycopersicum* L.) в условиях хлоридного засоления *in vitro*. Сельскохозяйственная биология. 51(3) : 318–326. (Bogoutdinova L.R., Baranova G.B., Baranova E.N., Khaliluev M.R. 2016. Comparative anatomical and morphological studies of the epidermal and cortical parenchyma hypocotyl cells of two tomato genotypes (*Solanum lycopersicum* L.) under sodium chloride stress *in vitro*. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. 51(3) : 318–326.)
- Гудков И.Н. 1986. Регуляция физиологических функций растений. Киев: Наукова думка. 18–30. (Gudkov I.N. 1986. Regulatsiya fiziologicheskikh funktsiy rasteniy. Kiev: Naukova dumka. 18–30.)
- Иванов В.Б. 1987. Пролиферация клеток в растениях. В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Цитология. М.: ВИНТИ. 5. 219 с. (Ivanov V.B. 1987. Proliferatsiya kletok v rasteniyakh. V kn.: Itogi nauki i tekhniki. Ser. Tsitologiya. M.: VINITI. 5. 219 p.)
- Кудоярова Г.Р., Холодова В.П., Веселов Д.С. 2013. Современное состояние проблемы водного баланса растений при дефиците воды. Физиология растений. 60(2) : 155–165. (Kudoyarova G.R., Kholodova V.P., Veselov D.S. 2013. Current state of the problem of water relations in plants under water deficit. Russ. J. Plant Physiol. 60(2) : 165–175.)
- Узбеков Р.Э. 2004. Анализ клеточного цикла и методика исследования динамики уровня экспрессии белков на его различных фазах с использованием синхронизированных клеток. Биохимия 69(5) : 597–611. (Uzbekov R.E. 2004. Analysis of protein expression level dynamics in the cell cycle using synchronized cells. Biochemistry (Moscow). 69(5) : 485–496.)
- Уикли Б. 1975. Электронная микроскопия для начинающих. М.: Мир. 324 с. (Weakley B. 1975. A beginner's handbook in biological electron microscopy. M.: Mir. 324 p.)
- Andronis E.A., Roubelakis-Angelakis K.A. 2010. Short-term salinity stress in tobacco plants leads to the onset of animal-like PCD hallmarks in planta in contrast to long-term stress. Planta. 231 : 437–448.
- Armstrong, J.E., Heimsch C. 1976. Ontogenetic reorganization of the root meristem of Compositae. Am. J. Bot. 63 : 212–219.
- Bagniewska-Zadworna A., Arasimowicz-Jelonek M. 2016. The mystery of underground death: Cell death in roots during ontogeny and in response to environmental factors. Plant Biol. 18 : 171–184.
- Blancaflor E.B., Hasenstein K.H. 1995. Growth and microtubule orientation of *Zea mays* roots subjected to osmotic stress. Int. J. Plant Sci. 156 : 774–783.
- Borek S., Ratajczak W., Ratajczak L. 2006. Ultrastructural and enzymatic research on the role of sucrose in mobilization of storage lipids in germinating yellow lupine seeds. Plant Sci. 170 : 441–452.
- Burssens S., Himanen K., van de Cotte B., Beeckman T., Van Montagu M., Inzé D., Verbruggen N. 2000. Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. Planta. 211 : 632–640.
- Cano E.A., Pérez-Alfocea F., Moreno V., Caro M., Bolarín M.C. 1998. Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through *in vitro* shoot apex culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 53 : 19–26.
- Collings D.A., Carter C.N., Rink J.C., Scott A.C., Wayatt S.E., Stromgren-Allen N. 2000. Plant nuclei can contain extensive grooves and invagination. Plant Cell. 12 : 2425–2439.
- Cuellar-Ortiz S.M., De La Paz Arrieta-Montiel M., Acosta-Gallegos J., Covarrubias A.A. 2008. Relationship between carbohydrate partitioning and drought resistance in common bean. Plant Cell Environ. 31 : 1399–1409.
- Dhonukshe P., Laxalt A.M., Goedhart J., Gadella T.W.J., Munnik T. 2003. Phospholipase D activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. Plant Cell. 15 : 2666–2679.
- Ferdose J., Kawasaki M., Taniguchi M., Miyake H. 2009. Differential sensitivity of rice cultivars to salinity and its relation to ion accumulation and root tip structure. Plant Prod. Sci. 12 : 453–461.
- Francis D., Kidd A.D., Bennett M.D. 1985. DNA replication in relation to DNA C values. In: The cell division cycle plants. Cambridge, Cambr. Univ. Press. 61–82.
- Gémes K., Poór P., Horváth E., Kolbert Z., Szópkó D., Szepesi A., Tari I. 2011. Cross-talk between salicylic acid and NaCl-generated reactive oxygen species and nitric oxide in tomato during acclimation to high salinity. Physiol. Plant. 142 : 179–192.
- González-Cruz J., Pastenes C. 2012. Water-stress-induced thermotolerance of photosynthesis in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants: the possible involvement of lipid composition and xanthophyll cycle pigments. Environ. Exp. Bot. 77 : 127–140.
- Hajer A.S., Malibari A. A., Al-Zahrani H.S., Almaghrabi O.A. 2006. Responses of three tomato cultivars to sea water salinity 1. Effect of salinity on the seedling growth. Afr. J. Biotech. 5 : 855–861.
- Horie T., Karahara I., Katsuhara M. 2012. Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants. Rice. 5 : 11.
- Huh G.H., Damsz B., Matsumoto T.K., Reddy M.P., Rus A.M., Ibeas J.I., Narasimhan M.L., Bressan R.A., Hasegawa P.M. 2002. Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. Plant J. 29 : 649–659.

- Ji H., Pardo J. M., Batelli G., Van Oosten M. J., Bressan R.A., Li X. 2013. The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles. *Mol. Plant*. 6 : 275–286.
- Livanos P., Galatis B., Quader H., Apostolakis P. 2012. Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. *Cytoskeleton*. 69 : 1–21.
- Lugan R., Niogret M.F., Lepout L., Guegan J.P., Larher F.R., Savoure A., Kopka J., Bouchereau A. 2010. Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant J*. 64 : 215–229.
- Meier I. 2001. The plant nuclear envelope. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. 58 : 1774–1780.
- Mercado J.A., Sancho-Carrascosa M.A., Jimenez-Bermudes S., Peran-Quesada R., Pliego-Alfaro F., Quesada M.A. 2000. Assessment of *in vitro* growth of apical stem sections and adventitious organogenesis to evaluate salinity tolerance in cultivated tomato. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 62 : 101–106.
- Mitsuya S., Yamane K., Miyake H., Takabe T. 2007. Functional analysis of plasma membrane protein 3 (PMP3) homologs in salt tolerance of rice and *Arabidopsis* plants. In: Proc. 2nd Int. Conf. Rice for the Future. Bangkok, Thailand. 242–246.
- Mittova V., Guy M., Tal M., Volokita M. 2002. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: Increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radicals Res*. 36 : 195–202.
- Munns R., Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev. Plant Biol*. 59 : 651–681.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15 : 473–497.
- Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jacquot J.-P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol. Plant*. 129 : 185–195.
- Park H.J., Kim W.Y., Yun D.J. 2016. A new insight of salt stress signaling in plant. *Mol. Cells*. 39 : 447–459.
- Peleg Z., Apse M., Blumwald E. 2011. Engineering salinity and water-stress tolerance in crop plants: Getting closer to the field. *Adv. Bot. Res*. 57 : 405–428.
- Pérez-Alfocea F., Guerrier G., Estañ M. T., Bolarin M. C. 1994. Comparative salt responses at cell and whole-plant levels of cultivated and wild tomato species and their hybrid. *J. Hort. Sci*. 69 : 639–644.
- Perilli S., Di Mambro R., Sabatini S. 2012. Growth and development of the root apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol*. 15 : 17–23.
- Reynolds E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol*. 17 : 208–212.
- Samarajeewa P.K., Barrero R.A., Umeda-Hara C., Kawai M., Uchimiya H. 1999. Cortical cell death, cell proliferation, macromolecular movements and *rTip1* expression patterns in roots of rice (*Oryza sativa* L.) under NaCl stress. *Planta*. 207 : 354–361.
- Serrano R., Mulet J., Rios G., Marquez J., de Larrinoa I., Leube M., Mendizabal I., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros R., Montesinos C. 1999. A glimpse of mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J. Exp. Bot*. 50 : 1023–1036.
- Shibli, R.A., Kushad, M., Yousef, G.G., Lila, M. A. 2007. Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant Growth Reg*. 51 : 159–169.
- Strogonov B.P. 1974. Structure and function of plant cells in saline habitats. In: Israel program for scientific translation. New York, Halstad Press. 284.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R. 2011. Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol*. 14 : 691–699.
- Tal M. 1971. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: Responses of *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* and *L. esculentum* minor to sodium chloride solution. *Austr. J. Agric. Res*. 22 : 631–638.
- Teerarak M., Bhinija K., Thitavasanta S., Laosinwattana C. 2009. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip cells of *Allium cepa* L. *Sci. Hort*. 121 : 228–232.
- Thuleau P., Aldo D., Cotelle V., Brière C., Ranty B., Galaud J.P., Mazars C. 2013. Relationships between calcium and sphingolipid-dependent signalling pathways during the early steps of plant–pathogen interactions. *Bioch. Biophys. Acta*. 1833 : 1590–1594.
- Turhan A., Şeniz V., Kuşçu H. 2009. Genotypic variation in the response of tomato to salinity. *Afr. J. Biotech*. 8 : 1062–1068.
- Wang Y., Zhang W., Li K., Sun F., Han C., Wang Y., Li X. 2008. Salt-induced plasticity of root hair development is caused by ion disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res*. 121 : 87–96.
- Wang Y., Li K., Li X. 2009. Auxin redistribution modulates plastic development of root system architecture under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol*. 166 : 1637–1645.
- Wang C., Zhang L., Yuan M., Y. Ge, Liu Y., Fan J., Ruan Y., Cui Z., Tong S., Zhang S. 2010a. The microfilament cytoskeleton plays a vital role in salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biol*. 12 : 70–78.
- Wang J., Li X., Liu Y., Zhao X. 2010b. Salt stress induces programmed cell death in *Thellungiella halophila* suspension-cultured cells. *J. Plant Physiol*. 167 : 1145–1151.
- West G., Inze D., Beemster G.T.S. 2004. Cell cycle modulation in the response of the primary root of *Arabidopsis* to salt stress. *Plant Physiol*. 135 : 1050–1058.
- Wood D.E., Newcomb E.W. 1999. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem*. 274 : 8309–8315.
- Zhang J.L., Shi H. 2013. Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynth. Res*. 115 : 1–22.

MORPHO-BIOLOGICAL AND CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE REGENERATED ROOTS OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) VARIETIES “RECORDSMEN” UNDER NaCl-SALINITY *IN VITRO*

L. R. Bogoutdinova^{a, b, *}, E. N. Baranova^a, G. B. Baranova^a, N. V. Kononenko^a, E. M. Lazareva^{a, c},
E. A. Smirnova^{a, c}, and M. R. Khaliluev^{a, b}

^aAll-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

^bThe Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding and Seed Production, Russian State Agrarian University – Moscow
Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127550 Russia

^cDepartment of Cell Biology and Histology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: bogoutdinova_lr@rambler.ru

The aim of this study was a comparative analysis of tomato roots regenerated in the cultural medium *in vitro* supplemented with 0–250 mM NaCl. To study morphogenetic responses at the organ level, NaCl concentrations that inhibit rhizogenesis were established, and a morphometric analysis of regenerated roots from juvenile seedlings (the number and length of regenerated roots, as well as their net and dry biomass) was carried out. As a result of cytological analysis, disturbance at the tissue level were detected, which were expressed in a change in the degree of vacuolization of the root cap cells and root cortical cells (RCC) under salinity. At some concentrations of NaCl, a significant change in the length of the root cap (50–100 and 250 mM NaCl) and the number of its layers (50, 75, 150–250 mM NaCl), as well as the areas of the root cells of the central cylinder (RCCC) (75–150 and 250 mM NaCl) and RCC (100–200 mM NaCl), as well as the nucleolar-nuclear ratio in the cells of these tissues (25, 50 and 200 mM NaCl), are noted. A cytophotometric analysis showed an increase the number of root meristem cells in the G₂ phase while simultaneously decreasing in the G₁ phase. Immunofluorescent staining have been established different variants of alpha-tubulin cytoskeleton disorganization in interphase cells of the root meristem. Transmission electron microscopy revealed structural changes of plastids in the root cap, RCC and KCCC, as well as disturbance of the nuclear compartment in the RCC under 150 mM NaCl. These characteristics can be employed for comparative evaluation of tomato genotypes under salinity at different levels of organization. Proposed methodological approach can also be applied to crops without difficulty of root formation *in vitro*.

Keywords: *Solanum lycopersicum* L., *in vitro* root regeneration, NaCl-salinity, tubulin cytoskeleton, anatomical root structure, root cap