



**ПРОМЯНА НА ФИЗИОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ
ПРИ ТАГЕТЕС (*TAGETES PATULA*), СОРТ УСМИВКА,
В УСЛОВИЯ НА ИНДУЦИРАН ВОДЕН ДЕФИЦИТ
CHANGES IN THE PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS
OF MARIGOLD (*TAGETES PATULA*) CV *USMIVKA*
UNDER INDUCED WATER DEFICIT CONDITIONS**

Надежда Запрянова^{1*}, Валерия Иванова², Иванка Кръстева¹
Nadejda Zapryanova^{1*}, Valeria Ivanova², Ivanka Ivanova¹

¹Институт по декоративни растения – София

¹Institute of Ornamental Plants – Sofia

²Аграрен университет – Пловдив

²Agricultural University – Plovdiv

*E-mail: nadejda_zaprianova@abv.bg

Abstract

Drought is one of the main unfavourable environmental factors which affect the quality and productivity of ornamental plants. Plant responses to the harmful effect of stress factors (drought) are not yet fully understood, as the plant organism employs a large array of adaptive defense reactions to respond to a stress stimulus. By studying the physiological mechanisms of plant resistance under laboratory conditions, the specific responses of the plant to a single stress factor can be observed. In order to simulate the water deficit induced by osmotic stress, different concentrations of polyethylene glycol (PEG) 6000 were used in the study: 10%, 20%, 30% and 40%.

The object of the study were Bulgarian *in vitro Tagetes patula* cv. *Usmivka*. The aim of the present study was to determine the response of *in vitro Tagetes patula* to drought induced by different PEG 6000 concentrations in different treatment durations. The response to drought stress was studied based on the following end-points: plant growth reactions, relative water content (RWC%), and electrolyte leakage (conductivity).

Key words: water deficit, polyethyleneglycol (PEG), tagetes, relative water content (RWC%), conductivity.

ВЪВЕДЕНИЕ

Водният дефицит е основен компонент на засушаването и причинява редица морфологични и физиологични промени в растенията, водещи до понижаване на стопанските им качества.

Климатичните сценарии до 2050-та година показват редуциране на годишните валежни суми в региона на Балканския полуостров, като очакваните валежи ще бъдат концентрирани основно през зимните месеци (Alexandrov and Genev, 2004). Промените в климата налагат да се изследват реакциите на културните растения към тях.

Изследване на физиологичните механизми на устойчивост в лабораторни условия дават възможност за проследяване на специфичната реакция на растенията спрямо единичен фактор на въздействие (Yordanov et al., 2000; Alexieva et al., 2003).

Симулиране на засушаване се извършва чрез използването на осмотик с високо молекулно тегло (>3000), какъвто е полиетиленгликолят (ПЕГ) (Murillo-Amador et al., 2002). Осмотично индуцираният воден дефицит от ПЕГ дава възможност за постигане на обезводняване на растенията в широк диапазон, като това се доближава максимално до ефекта от реалното почвено засушаване. Използването на ПЕГ в течни среди позволява прецизно и възпроизводимо да се постига желаният осмотичен потенциал на средата (Song et al., 2013).

Реакцията на *in vitro* културите към индуцирания стрес дава възможност на ранен етап да се селектират толерантни към водния дефицит растения. Това става възможно поради съществуващата взаимна връзка в отговора на растенията към стреса на клетъчно – *in vitro* и *in vivo* – ниво (Song et al., 2013).

Тагетесът като вид, използван масово при зацветяване на парковите пространства, е подложен на действието на засушаване (Chyliński, & Łukaszewska, 2008).

Целта на изследването е да се установи реакцията към воден дефицит на тагетес – български сорт „Усмивка”, при лабораторни условия, с използване на различни концентрации полиетиленгликол 6000.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Растителният материал, използван в изследването, е българският сорт тагетес „Усмивка”. Растенията се размножават *in vitro* по методика, приета в ИДР – София – хранителна среда MS с прибавяне на захароза – 30 g/l, и агар – 6 g/l; при рН = 5.7-5.8 преди автоклавиране. Отглеждат се във фитостатно помещение при температура 22°C, фотопериод 16:8 (ден:нощ) часа и интензивност на осветление 30 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Средата, индуцираща воден дефицит, съдържа:

Соли и витамини MS, захароза – 30 g/l, и ПЕГ 6000 с концентрации – 10, 20, 30 и 40%, с рН = 5.7-5.8 преди автоклавиране.

Експлантите се поставят в епруветки с контролна и стрес индуцираща течна среда върху мостчета от филтърна хартия. Микрорезниците се залагат по десет броя за всяка концентрация ПЕГ – 10, 20, 30, 40%, и контролна 0% среда в три повторения. Продължителността на действие на стреса е един (краткосрочен стрес), три (средносрочен стрес) и шест (дългосрочен стрес) дни.

За експерименталната работа *in vitro* се използват експланти с дължина 2-3 cm и тегло 100 mg, измерено при стерилни условия преди залагането им на индуцираща стрес среда.

Отчитат се водният дефицит в растителните тъкани, растежът, относителното водно съдържание и степента на увреждане на клетъчните мембрани.

В изследванията *in vitro* растежът се изразява чрез процента на нарастване на теглото на микрорезниците след култивиране за определен период (1-3-6 дни върху ПЕГ 10, 20, 30, 40%) спрямо първоначалното тегло.

Степента на увреждане на мембраните се определя кондуктивно чрез изтичането на електролити от листата – само след стрес – и се изразява в $\mu\text{S/g}$ свежо тегло.

Относителното водно съдържание (ОВС) се измерва едновременно с изтичането на електролити и се изчислява по формулата

$$\text{ОВС \%} = (\text{св.т.} - \text{с.т.}) / (\text{т.т.} - \text{с.т.}) \times 100 - \text{методиката на Turner}$$

Водният дефицит (ВД, %) се изразява по формулата

$$\text{ВД \%} = 1 - \text{ОВС.}$$

След периода на стресиране експлантите се прехвърлят на MS среда без стрес агента ПЕГ, за да се определи възстановителната им способност и се отчете % на вкореняване.

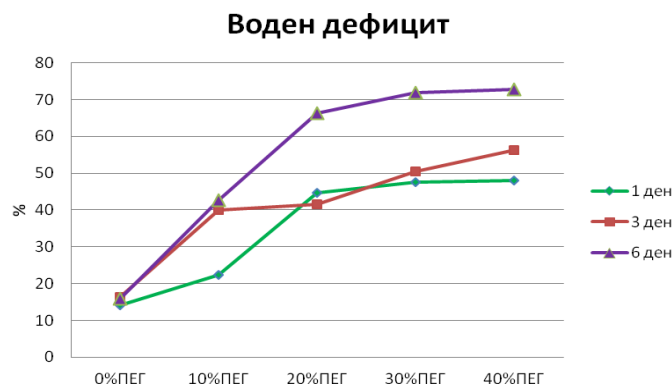
Данните, представени на фигурите, са изразени като средна стойност \pm SE от два независими експеримента, изведени в десет повторения за вариант. Анализирани са за достоверност чрез t тест на програмата GraphPad Prism. Достоверната разлика между контролата и вариантите е представена с *($P < 0.05$), **($P < 0.01$), ***($P < 0.0001$), а недоказаната разлика – нс.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В зависимост от концентрацията и продължителността на действие на полиетиленгликола се наблюдава увеличение на водния дефицит в тъканите на тагетеса (фиг. 1).

Воден дефицит е отчетен и в контролните растения, като стойностите му варират около 16% в трите периода на отчитане (1, 3 и 6 дни). Установено беше, че *краткосрочният стрес* (1 ден) води до покачване на стойностите на водния дефицит, като при ниските концентрации на полиетиленгликола (10% ПЕГ) достига до 22%, а при 40% ПЕГ се увеличава с 3,5 пъти спрямо контролата и достига 48% (фиг. 1). При *дългосрочния 6-дневен период* водният дефицит достига стойности при 40% ПЕГ – 72% - надвишаващ 4,5 пъти тези в контролните растения.

При симулирано засушаване *in vivo* чрез редуциране на броя на поливките при тагетес сорт „Усмивка” отчетеният воден дефицит в растителните тъкани при контролните растения е 21%. Най-висока стойност от 72,25% е достигната при варианта с еднократна седмична поливка, при който ППВ е 30% (Zarguanova, 2015). Според концепцията на Cornic et al. (2002) обезводняването, предизвикващо в растенията воден дефицит до 30%, се приема като мек или умерен стрес.

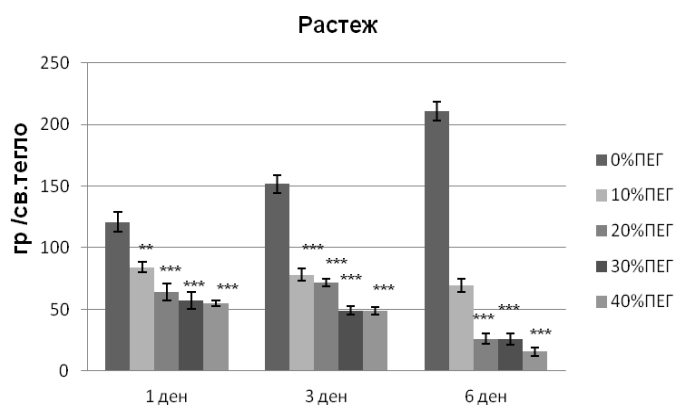


Фиг. 1. Воден дефицит (%) в растителните тъкани на *in vitro* резници от тагетес, сорт „Усмивка“, при различни концентрации на ПЕГ и продължителност на стреса един, три и шест дни
Fig. 1 Water deficit (%) in the plant tissues of *tagetes* explants cv. *Usmivka* *in vitro* at different PEG concentrations and stress duration 1, 3 and 6 days

Със завишаване на водния дефицит се отчитат понижени стойности както в растежа, така и в относителното водно съдържание в растителните тъкани. Контролните растения нарастват и тази тенденция се запазва през трите периода на отчитане (1, 3 и 6 дни) (фиг. 2). На шестия ден те са свежи, зелени, в нормално тургорно състояние и начало на вкореняване.

При растенията, подложени на концентрации 10 и 20% ПЕГ, се установява леко завяхване, докато на 30% и 40% ПЕГ завяхването се увеличава, но не се наблюдава некротизиране на тъканите, каквото е наблюдавано при експланти от хризантема (Zargyanova and Nencheva, 2013). След прилагане на краткосрочен осмотичен стрес (един ден) експлантите, отглеждани върху контролната среда, слабо нарастват и достигат стойности $120,8 \pm 7,9$ (фиг. 2). С повишаване на концентрацията на ПЕГ в хранителната среда растежът на експлантите намалява пропорционално, като при концентрация 30 и 40% ПЕГ той е под 50% спрямо контролата, съответно $54,88 \pm 2,5$ g/свежо тегло; при 30% и $57,16 \pm 6,5$ g/свежо тегло при 40% ПЕГ с доказаност при $P < 0.0001^{***}$.

Удълженият период на третиране (6 дни) довежда до драстично намаляване на растежа, като при 30% ПЕГ той е $25,77 \pm 2,5$ g/свежо тегло, а при 40% ПЕГ – $15,52 \pm 2,5$ g/свежо тегло, докато при контролата отчетената стойност е $210,36 \pm 2,5$ g/свежо тегло (фиг. 2). Потискането на растежа е свързано с намалената способност на растенията да поемат вода (Shabani et al., 2013). Осмотичният стрес на клетъчно ниво действа чрез забавяне на клетъчното делене. Клетките губят тургора си и това довежда до загуба на тегло (Heyser и Nabors, 1981). При експланти на хризантема растежът намалява до 50% спрямо контролните растения с увеличаване на количеството на ПЕГ (Zargyanova and Nencheva, 2013).



Фиг. 2. Растеж на *in vitro* резници от тагетес, сорт „Усмивка“, при различни концентрации на ПЕГ и продължителност на стреса един, три и шест дни

Fig. 2. Growth of of tagetes, cv Usmivka explants in vitro at different PEG concentrations and stress duration 1, 3 and 6 days

Относителното водно съдържание (% ОВС) е често използван показател за определяне на водния статус. В комбинация с допълнителни параметри (съдържание на пролин) може да се използва за оценка на нови видове, подходящи за отглеждане в градски условия (Chyliński, Łukaszewska & Kutnik, 2007). В растителните тъкани на тагетес той намалява с увеличаване на използваните концентрации на ПЕГ.

Контролните растения поддържат висок процент водно съдържание в тъканите си – около 85% (фиг. 3).

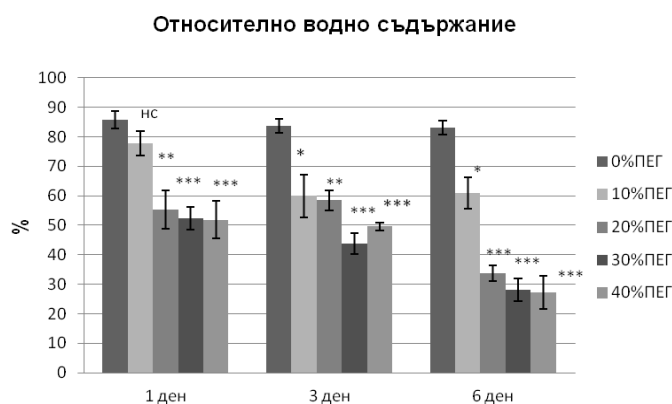
Получените резултати показват, че приложеният ПЕГ стрес води до постепенно намаляване на водното съдържание в растенията, като най-ниски стойности се достигат при 40% ПЕГ при всички изпитани срокове, като те варират от $51.88 \pm 6.4\%$ при краткосрочния едnodневен стрес, $49.63 \pm 1.3\%$ – при средносрочния 3-дневен стрес, до $27.26 \pm 5.7\%$ – при дългосрочния 6-дневен стрес (фиг. 3).

Разликата между отделните варианти и контролата са статистически доказани при $P < 0.05^{**}$ и $P < 0.0001^{***}$.

Подобна реакция е наблюдавана в калусна култура от *Carthamus tinctorius* L. (шафранка) – най-ниски стойности на растеж и % ОВС са отчетени при прилагането на 40% PEG (Kakaei et al., 2013).

При хризантемата продължителният стрес на засушаване силно понижава водния потенциал на клетката и води до намаляване на тургора на тъканите и трайно завяхване на растенията, особено при по-висока концентрация на ПЕГ. Докато при контролните растения стойностите са постоянни – около 70%, то при 40% ПЕГ на 6-ия ден те достигат до 18.10 ± 3.6 (Zapryanova and Nencheva, 2013).

Измерените стойности на относителното водно съдържание (ОВС %) при тагетес, сорт *Усмивка*, отгледан *in vivo*, показват висок процент на водното съдържание в тъканите на контролните растения – вариращ от 70 до 90%. Приложеното симулирано засушаване с редуциране на поливките води до постепенно намаляване на водното съдържание в растенията, като най-ниски стойности са достигнати при варианта с еднократна поливка, като при опит на леха той е 55,65%, а при съдовия опит е 46,33% (Zargyanova, 2015).



Фиг. 3. Относително водно съдържание на *in vitro* резници от тагетес, сорт „Усмивка“, при различни концентрации на ПЕГ и продължителност на стреса един, три и шест дни

Fig. 3. Relative water content (RWC) of tagetes, cv *Usmivka* explants *in vitro* at different PEG concentrations and stress duration 1, 3 and 6 days

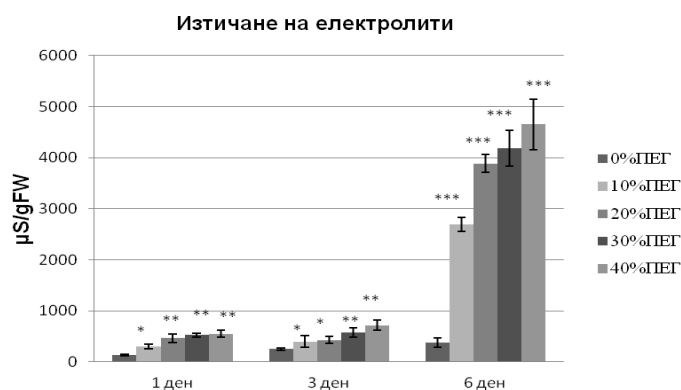
Стрес-агентът (ПЕГ 6000) с действието си засяга организацията и състава на клетъчните мембрани.

Изтичане на електролити се наблюдава в ниска степен в контролните растения при отчитане на първия ден след залагане на опита – 135 $\mu\text{S/g}$, и леко се завишава до 385 $\mu\text{S/g}$ при 6-дневния стрес период.

Увеличаване на изтичането на електролити се наблюдава още на първия ден на действие на стрес агента и стойностите му достигат при 40% ПЕГ до $527 \pm 70.4 \mu\text{S/g}$ свежо тегло в сравнение с контролата – 135 $\mu\text{S/g}$ свежо тегло, което е доказателство за настъпващи изменения в клетъчните мембрани (фиг. 4).

При дългосрочния стрес период (6 дни) се наблюдава рязко покачване на стойностите на този показател при всички концентрации на ПЕГ. Те варират от $2701 \pm 537 \mu\text{S/g}$ свежо тегло при 10% ПЕГ до $4652 \pm 494 \mu\text{S/g}$ свежо тегло при 40% ПЕГ.

Статистически е установена много добра доказуемост между отделните варианти и контролата при всички концентрации на ПЕГ при $P < 0.05$ ** и $P < 0.0001$ *** (фиг. 4).



Фиг. 4. Изтичане на електролити на *in vitro* резници от тагетес, сорт „Усмивка”, при различни концентрации на ПЕГ и продължителност на стреса един, три и шест дни

Fig. 4. Electrolyte leakage from of tagetes, cv *Usmivka* explants *in vitro* at different PEG concentrations and stress duration 1, 3 and 6 days

След различните стрес периоди на третиране с ПЕГ концентрации растителните експлантите от тагетес са поставени за възстановяване на MS среда.

Получените резултати показват, че при стрес период 1-3 дни и различни концентрации ПЕГ възстановяването е на 100%, с изключение на 40% ПЕГ, когато са отчетени 80%. Вкореняване е отчетено при всички варианти, независимо от концентрацията на ПЕГ. Най-нисък процент (30%) се наблюдава при ПЕГ 40% при 3-дневния стрес период.

Дългосрочният 6-дневен стрес на ПЕГ показва 100% възстановяване и вкореняване при ниската 10%-ова ПЕГ концентрация. При 20 и 30% ПЕГ процентът на възстановени растения намалява и става около 50%. Процентът на вкореняване също пада до 30-40%. При високата 40%-ова ПЕГ концентрация се възстановяват 10% от заложените растения, но вкореняване не се отчита.

ИЗВОДИ

1. Контролните растения на тагетес (*Tagetes patula*), сорт „Усмивка”, поддържат висок процент водно съдържание в тъканите си – около 85%. Те са свежи, зелени, в нормално тургорно състояние и с начало на вкореняване на шестия ден.

2. Нарастването на експлантите от тагетес намалява пропорционално с увеличаване на концентрацията на полиетиленгликола и при 30 и 40% ПЕГ той е под 50% спрямо контролата.

3. Относителното водно съдържание в растителните тъкани намалява в зависимост от действието на ПЕГ, като най-ниски стойности се достигат при 40% ПЕГ – 27.26±6,4% на 6-ия ден.

4. Симулираното засушаване чрез използване на различни концентрации на полиетиленгликол 6000 (10, 20, 30 и 40%) предизвиква изменения в клетъчните мембрани на тагетеса. Най-високи стойности на електролитното изтичане са отчетени на 6-я ден – 4625±521 µS/g свежо тегло при 40% ПЕГ.

5. Отчетеният воден дефицит варира от 16 до 73%.

6. Растителните експланти от тагетес показаха добър адаптивен отговор, което се доказва от високия процент на възстановяване – 60% и 40% след тридневен престой на 30 и 40% полиетиленгликол. Дългосрочният стрес период от 6 дни се отразява неблагоприятно на тагетеса, което се доказва с ниския процент (10%) възстановени растения при 40% ПЕГ и липсата на вкореняване.

REFERENCES

Alexandrov, V., M. Genev, 2004. The effect of climate variability and change on water resources in Bulgaria, in Hydrology: Science and Practice for the 21st century, Vol. 1 (Webb B., Arnell N., Onof C., MacIntyre N., Gurney R. and Kirby C., eds.), British Hydrological Society, 1-8.

Alexieva, V., S. Ivanov, I. Sergiev, E. Karanov, 2003. Interaction between stresses.// Bulg. J. Plant Physiol.- Special Issue, 1-18.

Chyliński, W. K., A. J. Łukaszewska & K. Kutnik, 2007. Drought response of two bedding plants. Acta Physiologiae Plantarum, 29(5), 399-406.

Chyliński, K. W. & A. J. Łukaszewska, 2008. Reaction of bedding ornamentals to drought stress. Ann. Warsaw Univ. Life Sci.–SGGW, Horticult. Landsc. Architect, 29, 39-44.

Cornic, G., C. Fresneau, 2002. Photosynthetic carbon reduction and oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought.// Ann. Bot. 89, 887-894.

Heyser, J., M. Nabors, 1981. Growth, water content, and solute accumulation of two tobacco cell lines cultured on sodium chloride, dextran, and polyethylene glycol. Plant physiology, 68(6), 1454-1459.

*Kakaei, M., M. Mansouri, M. Abdollahi & F. Moradi, 2013. Effect of NaCl and PEG induced osmotic stress on callus growth parameters of two Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars. Intl J Agri Crop Sci. Vol., 6 (3), 127-132.*

Murillo, Amador B., Lopez-Aguilar, R. Kaya, J. Larrinaga-Mayoral, A. Flores-Hernandez, 2002. Comparative effects of NaCl and PEG on germination, emergence and seedling growth of cowpea.// J. Agron. Crop Sci. 188, 235-247.

*Shabani, A, A. Sepaskhah, A. Kamgar-Haghighi, 2013. Growth and physiologic response of rapeseed (*Brassica napus* L.) to deficit irrigation, water salinity and planting method. Inter. J. of Plant Production 7, 569-596.*

Song, H., Y. Seo, M. Jeong, H. Kim, H. Im, H. Cho & M. Choi, 2013. In vitro evaluation system using osmotic agents of drought tolerance ecological restoration plants. Korean Institute of Forest Recreation and Welfare, 4, 611-613.

Turner, N., 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water stress. Plant Soil, 58, 339-366.

Yordanov, I., V. Velikova., T. Tsonev, 2000. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. Photosynthetica, 38, 171-186.

Zapryanova, N., D. Nencheva, 2013. Effect of water deficit induced by osmotic stress on Bulgarian chrysanthemum cv. Zhoro *in vitro*. Subtropical and Ornamental Horticulture, 49, 253-259.

Zapryanova, N., 2015. Study of the water deficit effects on the biometrical, physiological and ornamental indicators of marigold (*Tagetes patula*), variety "Usmivka", Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, vol. 18, 2, 388-402.

