

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ОБЩЕСТВО ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ

***Актуальные проблемы картофелеводства:
фундаментальные и прикладные аспекты***

Материалы всероссийской научно-практической конференции

с международным участием

10–13 апреля 2018 г.

Издание вышло в свет при финансовой поддержке

Российского научного фонда

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2018

УДК 581.1

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕРОИДНЫХ ФИТОГОРМОНОВ В РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ТИПОВ ЭКСПЛАНТОВ

*Р.П. Литвиновская**, *А.Л. Савчук**, *В.А. Хрипач^{*} ***, *М.В. Ефимова***,
*Ю.В. Медведева***, *Вл.В. Кузнецов** ****

* Институт биоорганической химии НАН Беларуси
ул. Купревича, 5/2, Минск, Беларусь

** Национальный исследовательский Томский государственный университет
пр. Ленина, 36, Томск, Россия

*** Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия
E-mail: litvin@iboch.by

Ключевые слова: brassinостероиды (БС), количественное определение, иммунохимический метод, картофель.

Количественное определение стероидных фитогормонов важно как для изучения их роли, особенностей естественного распределения и закономерностей метаболизма в растениях, так и для целей эффективного применения синтетических фитогормонов в качестве активных ингредиентов новых препаратов. Однако количественное определение brassinостероидов представляет весьма сложную и дорогостоящую задачу, поскольку содержание их в растениях составляет менее 10⁻⁵%. В настоящее время для определения brassinостероидов наиболее часто применяются различные варианты хроматографии с масс-спектрометрической детекцией. Проведение подобного рода анализа во всех случаях требует сложной многоступенчатой процедуры пробоподготовки, которая включает экстракционные и хроматографические методы очистки, что делает практически невозможным оперативный мониторинг brassinостероидов в растениях, продуктах питания, окружающей среде и препаратах на их основе.

В связи с расширяющимся применением brassinостероидов и постоянно возрастающим интересом к данному классу растительных гормонов, актуальной является задача разработки новых высокоэффективных и доступных методов количественного анализа стероидных фитогормонов как в природных объектах, так и в препаратах на их основе. Наиболее перспективным подходом в данном случае является иммунохимический анализ, который позволяет определять низкие концентрации стероидных гормонов при несложном приборном оснащении. Мировой приоритет в области разработки методологии иммунохимического анализа фитогормональных стероидов принадлежит Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси [1]. Нами разработаны специфические иммунохимические тест-системы для определения brassinостероидов ряда 24-эпибрасинолида [2], брасинолида- [3], 28-гомобрасинолида [4], 7-окса-6-оксо- [5], 6-оксо- [6] и 6-дезоксопроизводных [7].

С целью отказа от многостадийной пробоподготовки, повышения чувствительности, упрощения процедуры измерения и для устранения негативного влияния матрикса (традиционный метод дает ложнозавышенные результаты) разработан двустадийный метод иммуноанализа brassinостероидов в растительных образцах, использующий принцип разделения фаз взаимодействия определяемого и меченого антигенов с антителами к субстрату [6]. На первом этапе в лунках с иммобилизованными антителами находятся калибровочные пробы и анализируемые образцы, на втором этапе (после промывки лунок) добавляется меченый антиген (конъюгат brassinостероида с пероксидазой хрена).

Использование разработанных методов иммуноферментного анализа позволяет, например, изучить динамику уровня эндогенных brassinosterоидов в условиях стресса и в процессе адаптации растений. Впервые показано изменение (повышение или снижение) уровня стероидных фитогормонов в ответ на абиотические и биотические факторы стресса, что свидетельствует о вовлечении данной группы фитогормонов в регуляцию стрессоустойчивости растений [8–10].

В настоящем исследовании методом двухстадийного иммуноферментного анализа [6] проанализировано содержание brassinosterоидов группы brassinолида (БРС), 24-эпibrassinолида (ЭБС), 28-гомобрassinолида (ГБС), 7-окса-6-оксо- (В-лактонБС) и 6-оксо- (6-кетобС) производных в побегах и корнях образцов картофеля, выращенных из апикальной меристемы (АМ) или боковой почки БП).

В качестве объектов исследования использовали растения *Solanum tuberosum* L., отличающиеся сроком созревания – раннеспелые (Жуковский ранний и Ред Скарлетт) и среднеспелые (Луговской и Накра) сорта. Исходные оздоровленные материнские микроклоны *S. tuberosum* были получены из Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (п. Коренёво, Россия). В дальнейшем было проведено потоковое клонирование растений-регенерантов для увеличения количества исследуемого материала. Эндогенный уровень стероидных гормонов определяли в побегах и корнях микроклонов растений картофеля. Для получения микропобегов использовали два типа эксплантов: апикальная часть побега (с верхушечной почкой и прилегающими 2–3 листьями) и сегмент побега длиной 10 мм с боковой пазушной почкой и прилегающим листом.

Культивирование микрочеренков *in vitro* осуществляли на модифицированной агаризованной безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга (рН = 5.8), с добавлением витаминов (тиамин, пиридоксин и никотиновая кислота – 1 мг/л) и сахарозы (30 мг/л). Продолжительность выращивания для сортов Жуковский, Луговской и Ред Скарлетт составляла – 23 дня, для сорта Накра – 30 суток. Микроклоны выращивали под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora («Osram», Германия) при плотности потока квантов ФАР 200–250 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой 16° ± 2°С.

Эндогенное содержание стероидных гормонов определяли в побегах и корнях пробирочных растений картофеля. Результаты исследования представлены на рис. 1, 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что сорта одинакового срока созревания имеют близкий brassinosterоидный профиль. Так, для сортов раннего срока созревания характерно наличие высокого уровня кетонов в побегах, в то время как в корнях обнаружено преимущественное содержание лактонов. При этом в сорте Жуковский, который относится к очень ранним сортам, содержание лактонов сопоставимо с кетонами. Отличительной чертой является также присутствие в значительном количестве 24-эпibrassinosterоидов в корнях и их отсутствие в побегах (или их содержание находится ниже предела обнаружения).

Для среднеспелых сортов характерно также преобладание кетонов над лактонами в надземной части растений, но в корнях это различие нивелируется (кроме сорта Луговской, выращенного из апикальной меристемы). Следует отметить, что во всех изученных вариантах проростков среднеспелых сортов отсутствуют brassinosterоиды ряда 24-эпibrassinолида.

Различия в количественном содержании brassinosterоидов наблюдаются и в зависимости от типа эксплантов. В побегах микроклонов картофеля сортов Ред Скарлетт, Луговской и Накра, выращенных из сегмента побега с боковой пазушной почкой, обнаружено более высокое содержание фитогормонов ряда brassinолида, чем в побегах этих же сортов, выращенных из апикальной части побега, а для сорта Жуковский ранний – наоборот. Наибольшее содержание brassinosterоидов ряда brassinолида отмечено в корнях карто-

феля сортов Ред Скарлетт и Луговской, выращенных из сегмента побега с боковой пазушной почкой, и сорта Жуковский ранний, выращенных из апикальной части побега. Наибольшее содержание 24-эпибрсиностероидов и 28-гомобрсиностероидов наблюдалось в корнях микроклонов картофеля сорта Жуковский ранний, выращенных из сегмента побега с боковой пазушной почкой.

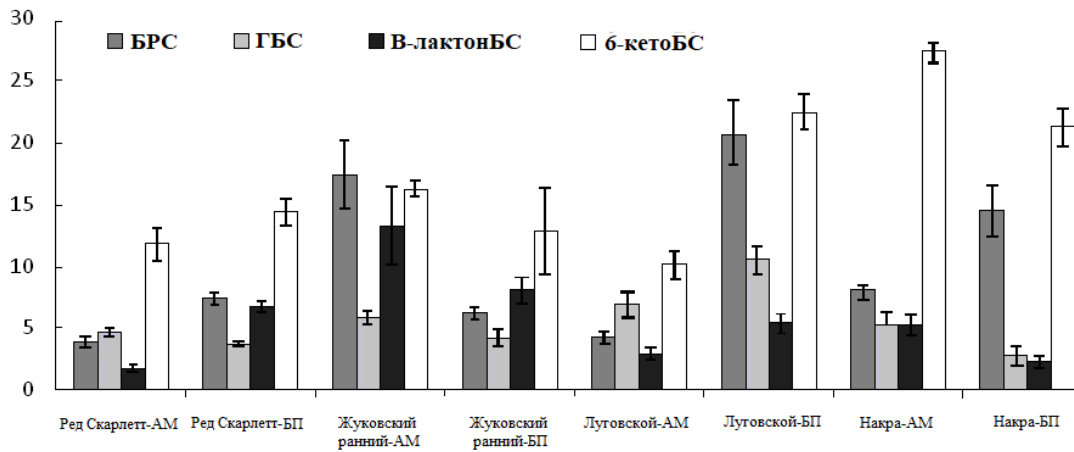


Рис. 1. Содержание эндогенных БС (нг/г лиоф. веса) в побегах картофеля различных сортов (n=3, p≤0,05): АМ – микроклоны растений картофеля, полученные из апикальной части побега; БП – микроклоны растений картофеля, полученные из сегмента побега длиной 10 мм с боковой пазушной почкой и прилегающим листом

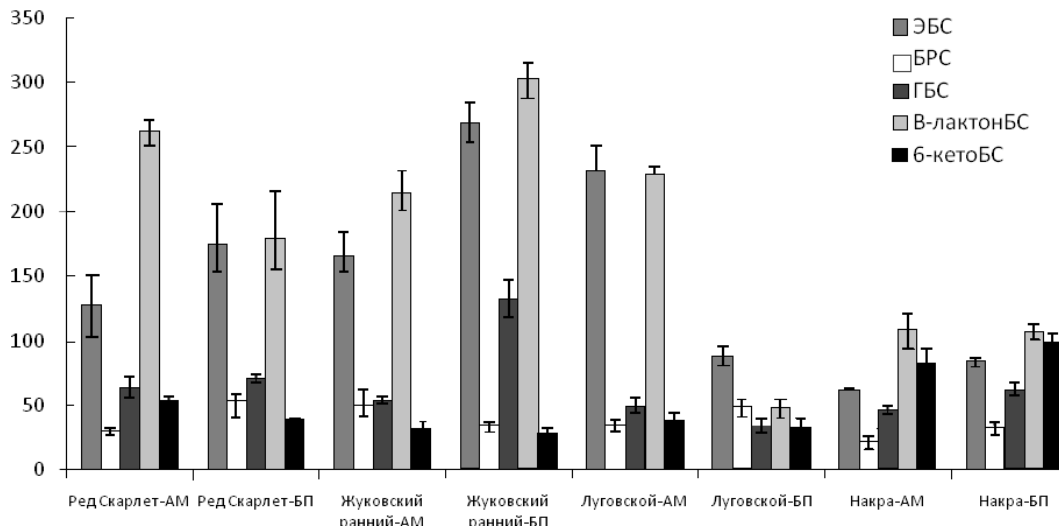


Рис. 2. Содержание эндогенных БС (нг/г лиоф. веса) в корнях картофеля различных сортов (n=3, p≤0,05): АМ – микроклоны растений картофеля, полученные из апикальной части побега; БП – микроклоны растений картофеля, полученные из сегмента побега длиной 10 мм с боковой пазушной почкой и прилегающим листом

Исследования по определению фитогормонов проводились с лиофилизированными образцами. Отмечено, что при пересчете полученных результатов по содержанию стероидов в нг на г сырого веса наблюдается значительный разброс результатов. Избежать данного влияния и стандартизовать образцы растительного материала удалось путем их предварительной лиофилизации до постоянной массы. Поэтому все рассуждения относятся к экспериментам с лиофилизированными растениями. Однако следует отметить, что замеченные

тенденции и особенности – сортовые, содержание в отдельных частях (побеги-корни), тип экспланта – прослеживаются как в одном, так и в другом случае.

Исследование было поддержано грантом Российского научного фонда (РНФ) № 16-16-04057.

ЛИТЕРАТУРА

1. Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Litvinovskaya R.P. Immunoassays of brassinosteroids // “Brassinosteroids: a Class of Plant Hormones” / eds. S.Hayat and A. Ahmad. Dordrecht, 2011. P. 375–392.
2. Хрипач В.А., Свиридов О.В., Прядко А.Г., Литвиновская Р.П., Драч С.В., Матвеев В.Д., Новик Т.В., Михайлопуло К.И. иммуноферментный анализ (24r)-брасиностероидов // Биоорганическая химия. 2007. Т. 33. С. 371–378.
3. Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Драч С.В., Аверькова М.А., Жабинский В.Н., Свиридов О.В., Прядко А.Г., Новик Т.В. // Доклады НАН Беларуси. 2009. Т. 53. С. 74–77.
4. Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Райман М.Э., Драч С.В., Жабинский В.Н., Свиридов О.В., Прядко А.Г., Новик Т.В. Синтез и иммунохимическое определение 28-гомобрасиностероидов // Весці НАН Беларусі, сер. хім. навук. 2008. № 3. С. 47–58.
5. Khripach V., Zhabinskii V., Antonchick A., Litvinovskaya R., Drach S., Sviridov O., Pryadko A., Novick T., Matveentsev V., Schneider B. A new type of modified brassinosteroids for enzyme-linked immunosorbent assay // Natural Product Commun. 2008. Vol. 3. P. 735–748.
6. Pradko A.G., Litvinovskaya R.P., Sauchuk A.L., Drach S.V., Baranovsky A.V., Zhabinskii, Mirantsova T.V., Khripach V.A. A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants// Steroids. 2015. Vol. 97. P. 78–86.
7. Литвиновская Р.П., Савчук А.Л., Кожарнович К.Г., Прядко А.Г., Миранцова Т.В., Жабинский В.Н., Хрипач В.А. тест-системы для иммуноферментного определения 6-дезоксобрасиностероидов // Биоорганическая химия. 2017. Т. 43. С. 284–301.
8. Литвиновская Р.П., Савчук А.Л., Манжелесова Н.Е., Полянская С.Н., Хрипач В.А. Иммуноферментные тест-системы для оценки стероид-гормонального статуса растений при биотическом стрессе // Известия РАН, сер. хим. 2014. № 9. С. 2184–2188.
9. Ефимова М.В., Савчук А.Л., Хасан Дж.А.К., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса брасиностероидами // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 778–789.
10. Деревянчук М.В., Грабельных О.И., Литвиновская Р.П., Войников В.К., Савчук А.Л., Хрипач В.А., Кравец В.С. Роль брасиностероидов в адаптации функционирования митохондрий растений *in vivo* при действии абиотических стрессов // Доповіди НАН України. 2015. № 1. С. 153–158.

УДК 635.21

ВЛИЯНИЕ СИДЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ И РЕГУЛЯТОРА РОСТА РОСТОК НА РОСТ, РАЗВИТИЕ И УРОЖАЙНОСТЬ РАННЕСПЕЛЫХ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ В ЛЕСОСТЕПНОЙ ЗОНЕ ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Ю.П. Логинов, А.С. Семенков, А.А. Казак

ФГБОУ ВО Государственный аграрный университет Северного Зауралья
пр. Республики, 7, Тюмень, Россия
E-mail: kazaknastenka@rambler.ru

Ключевые слова: картофель, сорт, сидерат, регулятор роста, урожайность, качество клубней.

Картофель относится к основным продуктам питания [1, 2]. В области на каждого жителя производится около 200 кг картофеля, что составляет 166% к научно-обоснованной норме питания. Однако, несмотря на столь высокое производство картофеля, в мае – июле на прилавках магазинов отсутствует картофель местного производства и в торговлю поступает картофель из ближних и дальних зарубежных стран [3–6]. Для решения отмеченной проблемы необходимо придать особое значение производству раннего картофеля.