

ОБЩАЯ  
БИОЛОГИЯ

УДК 581.1

ИНДУЦИРОВАННЫЙ БРАССИНОСТЕРОИДАМИ ПРАЙМИНГ  
РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ СНИЖАЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС  
И ПОВЫШАЕТ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ

© 2018 г. М. В. Ефимова<sup>1,\*</sup>, В. А. Хрипач<sup>1,2</sup>, Е. В. Бойко<sup>1</sup>,  
М. К. Малофий<sup>1</sup>, Л. В. Коломейчук<sup>1</sup>, О. К. Мурган<sup>1</sup>, А. Н. Видершпан<sup>1</sup>,  
Е. А. Мухаматдинова<sup>1</sup>, член-корреспондент РАН В. В. Кузнецов<sup>1,3</sup>

Поступило 31.10.2017 г.

Впервые показано, что кратковременная предобработка растений картофеля двумя разными по структуре brassinosterоидами приводит к появлению у растений способности отвечать на “отсроченный” солевой стресс накоплением соединений с антиоксидантной активностью и повышением солеустойчивости.

DOI: 10.7868/S0869565218060233

Под праймингом растений понимают процесс приобретения организмом после первичного контакта со стрессовым фактором способности повышать устойчивость к стрессу в ответ на действие того или иного повреждающего фактора в будущем. Индукторами (стимулами) перехода растения в состояние прайминга могут быть природные стрессоры или химические соединения [1]. Механизмы, которые лежат в основе перехода растения из нормального состояния в состояние прайминга, практически не исследованы. Наибольший интерес представляет использование в качестве сигналов прайминга химических соединений, например, фитогормонов, поскольку кратковременная предобработка семян (прайминг семян) или растений может привести к значительному повышению устойчивости к самым разным абиотическим и биотическим повреждающим воздействиям [2].

Среди фитогормонов наиболее перспективными кандидатами на роль индукторов прайминга являются стероидные гормоны растений – brassinosterоиды (БС). Brassinosterоиды обладают выраженным pleiotропным действием. Они являются регуляторами протекания многих молекулярных и интегральных физиологических процессов: от стимуляции синтеза ДНК, РНК и белков, активации деления клеток,

биосинтеза компонентов клеточной стенки до фотосинтеза, дыхания, донорно-акцепторных отношений, роста, онтогенеза и продуктивности [3–6].

Помимо этого БС являются эффективными стресспротекторными соединениями, защитное действие которых во многом определяется их способностью к мобилизации или синтезу компонентов клеточной антиоксидантной системы [4, 7]. Подавляющее большинство опубликованных до настоящего времени работ в этой области было направлено на изучение протекторных механизмов действия БС в условиях стресса, тогда как их способность индуцировать состояние прайминга в результате кратковременной гормональной предобработки растений до стрессорного воздействия практически не изучено. Исследованию механизмов прайминга картофеля под действием БС и посвящено настоящее сообщение.

Работу проводили на растениях *Solanum tuberosum* L. среднеспелого сорта Луговской (идентификатор 8301891), широко распространённого в Центральных регионах России и в Сибири. Картофель данного сорта даёт стабильно высокий урожай, его клубни характеризуются высокой лёжкостью и устойчивостью к ряду заболеваний, в том числе к фитофторозу. Оздоровлённые растения-регенеранты картофеля *in vitro* получали из апикальной меристемы и на протяжении 25 сут культивировали на агаризованной питательной среде Мурасиге–Скуга (МС) с половинным содержанием макро- и микроэлементов. По окончании культивирования корни растений отмывали от агаризованной среды и проводили двухнедельную адаптацию микроклонов к жидкой среде МС и условиям воздушной среды под люминесцентными лампами

<sup>1</sup>Национальный исследовательский  
Томский государственный университет, Томск

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси, Минск

<sup>3</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева  
Российской Академии наук, Москва

\*E-mail: steymv555@gmail.com

L36W/77 Fluora (“Osram”, Германия) при плотности потока квантов фотосинтетически активной радиации  $200\text{--}250 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . После двухнедельного роста на гидропонной установке в среде МС растения переносили на 4 ч в ту же самую среду в отсутствие (контрольный вариант) или в присутствии brassinosteroidов в диапазоне концентраций от  $10^{-11}$  до  $10^{-8}$  М. В качестве активных brassinosteroidов использовали 24-эпибрассинолид (ЭБЛ) и 28-гомобрассинолид (ГБЛ), которые различались как по количеству атомов углерода в молекуле – С28 (24-эпибрассинолид) и С29 (28-гомобрассинолид), так и по конфигурации заместителей в боковой цепи – 24R-метил (24-эпибрассинолид) и 24S-этил-(28-гомобрассинолид).

После четырёхчасовой гормональной обработки растения переносили в раствор МС без добавления brassinosteroidов на 20 ч. В дальнейшем их помещали в питательную среду МС в отсутствие (контрольный вариант) или в присутствии 100 мМ NaCl (опытные варианты). Через 6 сут растительный материал фиксировали в жидком азоте и использовали для проведения анализов. Оценку ростовых и физиологических показателей проводили согласно методикам, описанным ранее [4]. Эксперименты повторяли не менее трёх раз. Достоверность различий между опытными и контрольными образцами оценивали с помощью критерия *t* Стьюдента.

Кратковременная обработка растений ЭБЛ и ГБЛ в концентрациях  $10^{-11}$  и  $10^{-10}$  М в некоторой степени активировала их рост спустя 164 ч после действия гормонов (табл. 1). Это проявлялось в увеличении

сырой массы растений картофеля на 15–17% от контроля в ответ на обработку ЭБЛ и ГБЛ), суммарной листовой поверхности (на 36–44%) и числа столонов (на 27–32%). Тем не менее сухая масса растений, суммарная листовая поверхность и содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и каротиноидов) в ответ на воздействие brassinosteroidов не изменились (данные не представлены).

Выращивание растений картофеля в течение 144 ч на среде МС, содержащей 100 мМ NaCl, привело к снижению суммарной площади листьев в 1,6 раза, числа столонов в 3,8 раза и количества ярусов (рис. 1). Сырая и сухая биомассы растений снизились в 1,4–1,7 раза (данные не представлены). Уровень фотосинтетических пигментов (хлорофилла *a* и каротиноидов) в листьях картофеля снизился в 1,6 раза (рис. 2б).

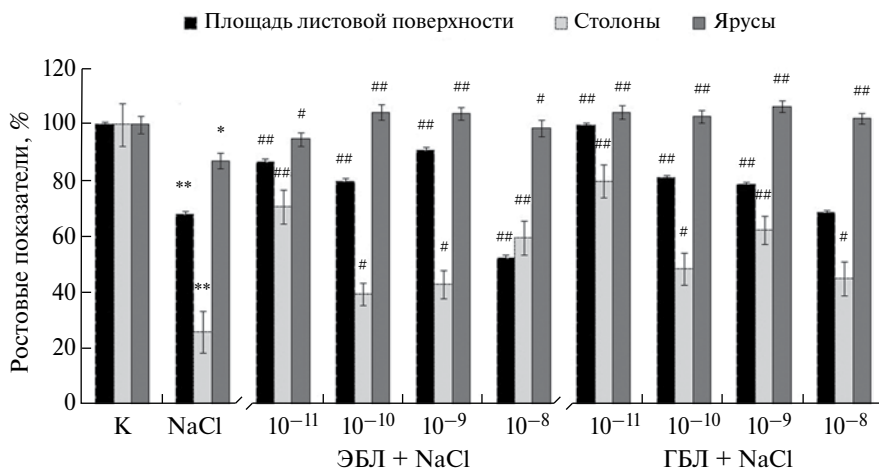
Известно, что NaCl в высоких концентрациях оказывает не только прямое токсическое действие на клеточный метаболизм и вызывает осмотический стресс, но и стимулирует генерацию активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса. Основная причина окислительного стресса в этом случае связана с закрыванием устьиц, снижением доступности CO<sub>2</sub> и повышением энергии возбуждения электронов, что сопровождается интенсивной генерацией АФК [8]. Другой причиной увеличения продукции АФК при засолении является нарушение дыхания [9].

Для оценки уровня окислительного стресса в растениях картофеля при засолении мы оценили интенсивность перекисного окисления липидов, измеряемую по содержанию малонового диальдегида (МДА)

**Таблица 1.** Влияние четырёхчасовой обработки растений картофеля 24-эпибрассинолидом (ЭБЛ) и 28-гомобрассинолидом (ГБЛ) на основные ростовые показатели

Вариант обработки	Число столонов		Суммарная площадь листьев		Суммарная масса растений	
	шт.	%	см <sup>2</sup>	%	г	%
Контроль	5,00 ± 0,38	100	45,52 ± 4,36	100	5,45 ± 0,31	100
10 <sup>-11</sup> М ЭБЛ	6,63 ± 0,46*	132	62,10 ± 4,32*	136	6,35 ± 0,53	117
10 <sup>-10</sup> М ЭБЛ	5,78 ± 0,64	116	65,49 ± 5,46*	144	6,26 ± 0,63	115
10 <sup>-9</sup> М ЭБЛ	4,89 ± 0,54	98	55,76 ± 4,65	122	5,67 ± 0,39	104
10 <sup>-8</sup> М ЭБЛ	5,18 ± 0,81	104	50,92 ± 5,22	112	5,78 ± 0,50	106
10 <sup>-11</sup> М ГБЛ	6,36 ± 0,58*	127	57,57 ± 4,19	126	5,92 ± 0,40	109
10 <sup>-10</sup> М ГБЛ	5,00 ± 0,47	100	53,03 ± 5,30	116	5,27 ± 0,28	97
10 <sup>-9</sup> М ГБЛ	3,70 ± 0,90	74	47,11 ± 6,34	103	5,03 ± 0,55	92
10 <sup>-8</sup> М ГБЛ	4,63 ± 0,97	93	49,97 ± 5,36	110	5,62 ± 0,54	103

Здесь и на рис. 1 и 2  $M \pm m$ ,  $n = 3$ ; \* $p < 0,05$  при сравнении с контролем.



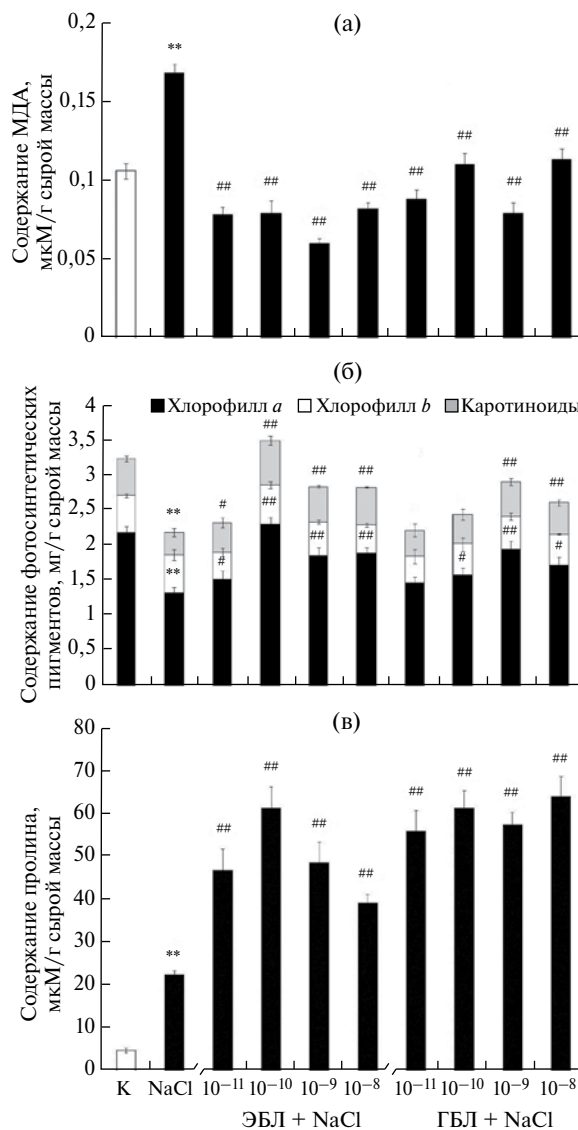
**Рис. 1.** Влияние засоления (100 мМ NaCl, 144 ч) и четырёхчасовой предобработки брассиностероидами (24-эпибрасинолидом – ЭБЛ или 28-гомобрасинолидом – ГБЛ) с последующим “отсроченным” засолением (100 мМ NaCl, 144 ч) на основные ростовые показатели растений картофеля. \**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01 (контрольный вариант vs воздействия NaCl); #*p* < 0,05; ##*p* < 0,01 (NaCl vs воздействия брассиностероидами на фоне засоления).

в реакции с тиобарбитуровой кислотой. Величина этого показателя в реакционной среде возросла на 58–60% при использовании растений *S. tuberosum*, подвергнутых солевому воздействию, по сравнению с контрольными образцами (рис. 2а).

Как известно, для снижения негативного влияния окислительного стресса в растениях активируются антиоксидантные защитные системы, действие которых направлено на гашение АФК. Повышенный интерес в этой связи могут представлять ферментные (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза и др.) и неферментные системы антиоксидантной защиты (каротиноиды, низкомолекулярные фенольные соединения, пролин и др.) [10].

В ответ на засоление достоверных изменений активности ключевых антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, пероксидаза) мы не зарегистрировали (данные не представлены), но имело место пятикратное увеличение по сравнению с контрольными растениями уровня пролина – ключевого компонента неферментативной системы антиоксидантной защиты (рис. 2в).

Кратковременное внесение стероидных гормонов в питательную среду снизило отрицательное влияние засоления (100 мМ NaCl), наступившего через 20 ч после окончания гормональной обработки, на ростовые показатели – число столонов, суммарную



**Рис. 2.** Влияние засоления (100 мМ NaCl, 144 ч) и четырёхчасовой предобработки брассиностероидами (24-эпибрасинолидом – ЭБЛ или 28-гомобрасинолидом – ГБЛ) с последующим “отсроченным” засолением (100 мМ NaCl, 144 ч) на содержание МДА – (а), на содержание основных фотосинтетических пигментов – (б) и на содержание пролина – (в).

листовую поверхность и сырую массу растений, что свидетельствовало о повышении солеустойчивости. При этом число столонов и размер листовой поверхности возросли в 3,0–3,2 и в 1,3–1,5 раза соответственно при минимальной концентрации brassinosterоидов ( $10^{-11}$  М), тогда как число ярусов увеличивалось на 25–26% по сравнению с растениями, подвергнутыми лишь солевому стрессу (рис. 1).

Экзогенное внесение гормонов во всем диапазоне исследуемых концентраций на фоне засоления способствовало уменьшению уровня МДА, что свидетельствовало о снижении степени перекисного окисления липидов и интенсивности окислительного стресса (рис. 2а) и явилось одной из вероятных причин повышения солеустойчивости растений.

Содержание фотосинтетических пигментов (хлорофилл *a* и каротиноиды) также возросло при обработке растений ЭБЛ (от  $10^{-10}$  до  $10^{-8}$  М) и ГБЛ ( $10^{-9}$  и  $10^{-8}$  М), достигнув в ряде случаев контрольных значений (рис. 2б). Как известно, накопление каротиноидов является одной из стратегий снижения интенсивности окислительного стресса [11]. Каротиноиды участвуют в тушении радикала  $^1\text{O}_2$  и перекиси водорода, которые генерируются при избыточном возбуждении хлорофилла.

Помимо накопления каротиноидов при адаптации растений к водному дефициту и токсическому действию избытка неорганических ионов, прежде всего натрия, важная роль принадлежит аминокислоте пролину – совместимому осмолиту с выраженными свойствами антиоксиданта и химического шаперона [12, 13].

Как следует из полученных нами данных, кратковременная предобработка brassinosterоидами изменила метаболизм в клетках картофеля таким образом, что они приобрели способность отвечать на “отсроченное” действие солевого стресса более активной (в 2,0–2,7 раза) кумуляцией пролина по сравнению с растениями, подвергнутыми лишь действию 100 мМ NaCl (рис. 2в).

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что транзистентная обработка

brassinosterоидами индуцирует переход растений картофеля в состояние прайминга, которое проявляется в их способности отвечать на “отсроченный” солевой стресс более эффективной кумуляцией пролина и каротиноидов, обладающих выраженными антиоксидантными и стресспротекторными свойствами. Последнее обстоятельство, очевидно, лежит в основе снижения уровня окислительного стресса и повышения солеустойчивости в клетках картофеля.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 16–16–04057.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hilker M., Schwachtje J., Baier M., et al.* // Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 2016. V. 91. P. 1118–1133.
2. *Savvides A., Ali S., Tester M., Fotopoulos V.* // Trends Plant Sci. 2016. V. 21. P. 329–340.
3. *Khripach V.A., Zhabinskii V.N., de Groot A.E.* Brassinosteroids: A New Class of Plant Hormones. San Diego: Acad. Press, 1999. 456 p.
4. *Ефимова М.В., Савчук А.Л., Хасан Дж.А.К. и др.* // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 778–789.
5. *Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К. и др.* // ДАН. 2012. Т. 445. № 6. С. 693–697.
6. *Efimova M.V., Vankova R., Kusnetsov V.V., et al.* // Steroids. 2017. V. 120. P. 32–40.
7. *Ashaf M., Akmar N.A., Arteca R.N., et al.* // Critical Rev. Plant Sci. 2010. V. 29. P. 162–190.
8. *Schmitt Fr.-J., Renger G., Friedrich T., et al.* // Biochim. et Biophys. Acta. 2014. V. 1837. P. 835–848.
9. *Jacoby R.P., Che-Othman M.H., Millar A.H., et al.* // Plant, Cell & Environ. 2016. V. 39. P. 823–833.
10. *Bose J., Rodrigo-Moreno A., Shabala S.* // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 1241–1257.
11. *Ozgur R., Uzilday B., Sekmen A.H., et al.* // Funct. Plant Biol. 2013. V. 40. P. 832–847.
12. *Donald S.P., Sun X.Y., Hu C.A., et al.* // Cancer Res. 2001. V. 61. P. 1810–1815.
13. *Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., et al.* // Antioxid. Redox Signal. 2013. V. 19. P. 998–1011.