

УДК 581.1

ЭНДОГЕННЫЕ БРАССИНОСТЕРОИДЫ ВОВЛЕКАЮТСЯ В ФОРМИРОВАНИЕ СОЛЕУСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ

© 2023 г. Л. В. Коломейчук¹, Е. Д. Данилова^{1,*}, О. К. Мурган¹, А. Л. Савчук²,
Р. П. Литвиновская², В. А. Хрипач², член-корреспондент РАН В. В. Кузнецов^{3, 1}, М. В. Ефимова¹

Поступило 10.03.2023 г.
После доработки 30.03.2023 г.
Принято к публикации 30.03.2023 г.

Впервые показано, что на солевой стресс растения картофеля отвечали изменением профиля эндогенных brassinosteroidов (БС). При этом идентифицирована группа 6-кето-БС, содержание которых, в отличие от других анализируемых групп гормонов, значительно возросло при засолении. Установлено, что 10-кратное снижение уровня эндогенных БС в мутантных растениях *Arabidopsis thaliana* с нарушенным биосинтезом (*det2*) (или рецепцией (*bri1*)) фитостероидов приводит к снижению их солеустойчивости, о чем свидетельствует понижение эффективности протекания фотохимических процессов фотосистемы II (ФСII) и ингибирование роста. Представленные данные подтверждают идею о вовлечении эндогенных БС в формирование солеустойчивости растений.

Ключевые слова: brassinosteroidы, хлоридное засоление, фотосистема II, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*

DOI: 10.31857/S2686738923600164, EDN: JDCWCH

Браassinosteroidы (БС) – стероидные фитогормоны, играющие важную роль в жизнедеятельности растений, включая регуляцию онтогенеза, роста, развития и адаптацию к абиотическим и биотическим стрессорам. БС повышают устойчивость растений к широкому спектру неблагоприятных факторов, в том числе к засолению [1]. Засоление является одним из основных абиотических стрессоров, снижающих урожайность сельскохозяйственных культур. На долю засоленных территорий в мире приходится 50% орошаемых и 20% обрабатываемых земель [2]. Расширение засоленных площадей в настоящее время является результатом неблагоприятных глобальных изменений климата и интенсивной антропогенной деятельности [3]. Избыточное засоление вызывает осмотический, токсический и окислительный стрессы, что оказывает негативное влияние на протекание всех основных физиологических процессов [4]. Так, например, подавление фотосинтеза при солевом стрессе обусловлено де-

градацией хлорофиллов и каротиноидов, разрушением ультраструктуры хлоропластов, нарушением функционирования второй фотосистемы (ФС II), транспирации и газообмена [5].

Растения реагируют на засоление изменением уровня эндогенных фитогормонов, таких как, абсцизовая и жасмоновая кислоты, ауксины, цитокинины и гиббереллины [6]. В научной литературе накоплена огромная информация по влиянию экзогенных БС на устойчивость растений к повреждающим факторам [7]. Вместе с тем крайне мало публикаций по изучению роли эндогенных БС в формировании солеустойчивости важнейших культурных растений, в частности, картофеля.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы выяснить, отвечают ли растения картофеля на солевой стресс изменением профиля эндогенных БС и зависит ли солеустойчивость растений от уровня эндогенных стероидных фитогормонов. Для ответа на поставленные вопросы нами были использованы растения с оптимальным содержанием эндогенных brassinosteroidов (растения картофеля и родительские линии арабидопсис), а также растения *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом или рецепцией БС.

В качестве объекта исследования был выбран картофель (*Solanum tuberosum*) среднеспелого сорта Луговской, широко распространенного в Центральных регионах России и в Сибири. Кар-

¹Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: nusy.l.d@gmail.com

тофель данного сорта дает стабильно высокий урожай, его клубни характеризуются высокой лежкостью и устойчивостью к ряду заболеваний, в том числе, к фитофторозу. Оздоровленные растения-регенеранты картофеля этого сорта получали *in vitro* из апикальной меристемы и в течение 27 суток культивировали на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с половинным содержанием макро- и микроэлементов (0.5 МС). Корни растений промывали от агара и проводили адаптацию микроклонов к жидкой среде 0.5 МС и условиям воздушной среды под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora (“Osram”, Германия) при плотности потока квантов ФАР 200–250 мкмоль/м² с⁻¹ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой 20 ± 3°C. После двухнедельного роста растений на гидропонной установке на среде 0.5 МС, их переносили на ту же самую среду с добавлением 100 мМ NaCl на 7 сут. Оценивали ростовые параметры (длину осевых органов, число ярусов и столонов, сырую и сухую биомассу), содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов [8]. Образцы картофеля (побеги и корни) лиофильно высушивали. Лиофилизацию проводили под вакуумом с помощью сублимационной камеры VirTis 6211 (“LabX”, США). Содержание стероидных гормонов группы брассинолида (24S-метил-БС), группы 24-эпибрассинолида (24-эпи-БС), группы 28-гомобрассинолида (28-гомо-БС), В-лактонов (В-лактонБС) и В-кетон-ов (6-кетобС) проводили методом двухстадийного иммуноферментного анализа как описано ранее [9].

Для оценки влияния эндогенных брассиностероидов на солеустойчивость растений исследовали воздействие 100 мМ NaCl на морфогенез и фотохимические процессы проростков *Arabidopsis thaliana* родительских линий (Col, Ep-2) и полученных на их основе мутантов с нарушенным синтезом брассиностероидов (*det2*) или их рецепции (*bri1*). Семена *A. thaliana* стерилизовали 3%-ной H₂O₂ и высевали в стеклянные сосуды на питательную агаризованную среду с добавлением 100 мМ NaCl или без него (контроль). Для стимуляции и синхронизации прорастания, семена арабидопсис выдерживали в течение 3 суток при температуре 4–6°C. Далее семена перемещали под люминесцентные лампы L36W/77 Fluora (“Osram”, Германия) при плотности потока квантов ФАР 150 мкмоль м⁻² с⁻¹ в фитотрон с 16-ч фотопериодом и температурой 23 ± 0.5° С на 2 нед. Оценивали ростовые параметры растений (длину гипокотыля и корня) и фотохимическую активность фотосинтетического аппарата на ПАМ-флуориметре (Mini-ПАМ II, “Heinz-Walz”, Germany).

Эксперименты проводили в трех биологических повторностях; использовали не менее 60 растений на каждый вариант опыта. Полученные результаты представлены в таблицах и на ри-

сунках в виде значений средней арифметической со стандартной ошибкой. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения *t*-критерия находили для 95% уровня значимости ($p \leq 0.05$).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что уровень всех анализируемых групп стероидных фитогормонов в корнях растений картофеля в оптимальных условиях выращивания значительно превышал их содержание в побегах. Установлено, что в растениях картофеля сорта Луговской уровень гормонов группы В-лактон-БС (в корнях) и 24-эпи-БС (в побегах и корнях) был выше, чем других групп анализируемых стероидных фитогормонов (рис. 1). На фоне хлоридного засоления наблюдали значительное падение содержания всех исследуемых групп БС, за исключением группы 6-кетобС, уровень которых при солевом стрессе повышался в 4.2 и 1.7 раза в побегах и корнях относительно контроля (рис. 1). Вероятно, NaCl-зависимый рост группы 6-кетобС в ответ на засоление может косвенно свидетельствовать об их вовлечении в регуляцию солеустойчивости растений картофеля.

Ранее нами было установлено повышение уровня эндогенных БС в растениях рапса *Brassica napus* L. при солевом стрессе, что, вероятно, свидетельствует о регуляции БС солеустойчивости растений [10]. В других исследованиях повышение уровня эндогенных БС наблюдали в растениях риса при засухе [11] и в растениях кукурузы при действии низких температур [12]. Снижение содержания эндогенных БС было установлено у растений ярового ячменя в ответ на воздействие патогена *Helminthosporium teres* Sacc [13].

Изменение профиля анализируемых групп БС при засолении сопровождалось торможением образования столонов (на 73%) и ингибированием накопления сырой массы растений (на 33%), но не длины осевых органов и числа ярусов (табл. 1).

Как показано в табл. 2, снижение общей массы растений на фоне хлоридного засоления было обусловлено, в основном, уменьшением массы побегов (на 41%, относительно контроля), но не корней.

Негативное действие засоления также проявлялось в снижении уровней основных фотосинтетических пигментов. Так, количество хлорофилла *a* и каротиноидов в листьях растений, подвергнутых хлоридному засолению, снижалось на 39% относительно контрольного варианта, а содержание хлорофилла *b* на 15% (рис. 2).

Уменьшение общего содержания пигментов в листьях может служить адаптивным механизмом для снижения интенсивности поглощения энергии возбуждения в стрессовых условиях, когда способность листа использовать световую энер-

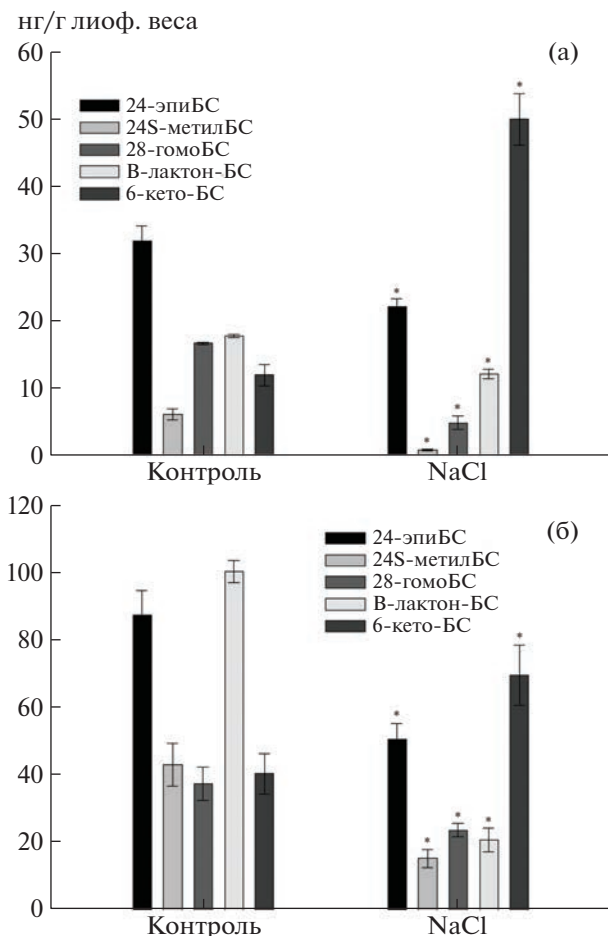


Рис. 1. Влияние 100 мМ NaCl на содержание эндогенных брассиностероидов в побегах (а) и корнях (б) растений картофеля сорта Луговской.

гию весьма ограничена. Наблюдаемое снижение содержания хлорофиллов и каротиноидов может быть связано с подавлением солевым стрессом биосинтеза фотосинтетических пигментов или ускорением их деградации [14].

Известно, что обработка растений экзогенными БС повышает их устойчивость к неблагоприятным температурам, избыточному засолению, высокому содержанию тяжелых металлов, воздействию патогенов, пестицидов и др. [15]. В основе защитного действия БС при солевом стрессе лежит их способность повышать эффективность

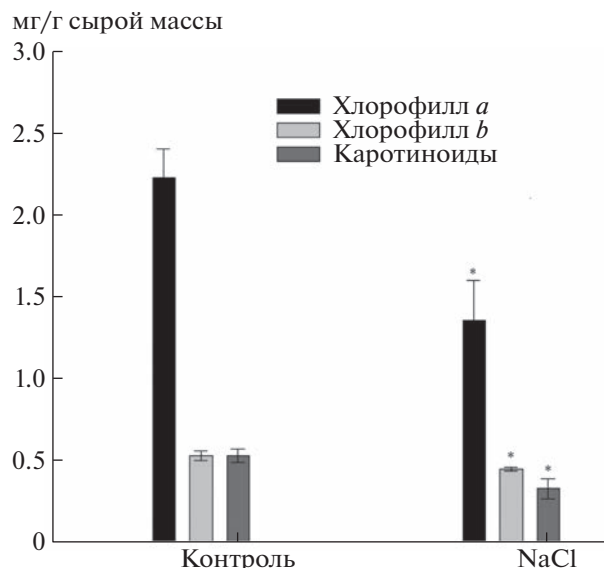


Рис. 2. Влияние 100 мМ NaCl на содержание фотосинтетических пигментов в листьях картофеля.

процессов фотосинтеза, за счет снижения деградации фотосинтетических пигментов и активации клеточной антиоксидантной системы [16, 17]. Однако вопрос о связи уровня эндогенных БС с устойчивостью растений к абиотическим стрессам остается практически открытым.

Для установления корреляции уровня эндогенных БС с солеустойчивостью растений мы изучали влияние 100 мМ NaCl на морфогенез и фотохимические процессы проростков *A. thaliana* родительских линий (Col, Ep-2) и полученных на их основе мутантов с нарушенным синтезом БС (*det2*) или их рецепции (*bri1*). Мутация в гене *DET2* приводила к нарушению первичных этапов синтеза брассиностероидов и к 10-кратному снижению их эндогенного содержания в проростках *det2* по сравнению с проростками дикого типа [18].

В ответ на действие 100 мМ NaCl проростки мутантных линий с нарушенным статусом БС обнаруживали более сильное ингибирование ростовых процессов и фотохимической функции ФС II. Как следует из табл. 3, торможение роста осевых органов при солевом стрессе у мутантных линий на 20–25% превышало подобное же ингибирование у исходных линий дикого типа, что свидетельствует о

Таблица 1. Влияние 100 мМ NaCl на ростовые параметры растений картофеля сорта Луговской

Вариант	Длина стебля, см	Длина корня, см	Число ярусов, шт	Число столонов, шт	Суммарная сырая масса растения, г
Контроль	12.78 ± 0.64	14.72 ± 1.04	10.33 ± 0.33	5.00 ± 0.38	5.45 ± 0.31
NaCl	12.63 ± 0.56	14.72 ± 0.73	9.00 ± 0.41	1.33 ± 0.37*	3.64 ± 0.44*

* $p < 0.05$ при сравнении с контрольным значением.

Таблица 2. Влияние 100 мМ NaCl на массу в растениях картофеля сорта Луговской

Вариант	Анализируемая часть растения	Сырая масса растения, г	Сухая масса растения, г
Контроль NaCl	Побег	3.28 ± 0.33	0.37 ± 0.08
		1.94 ± 0.31*	0.22 ± 0.04
Контроль NaCl	Корень	0.87 ± 0.10	0.047 ± 0.009
		0.65 ± 0.13	0.034 ± 0.009

* $p \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением.

Таблица 3. Влияние NaCl на ростовые параметры проростков *Arabidopsis thaliana*

Параметр	Вариант	Col-0	<i>det2</i>	En-2	<i>bri1</i>
Длина гипокотыля, мм	Контроль	2.28 ± 0.06	1.32 ± 0.03	2.10 ± 0.04	1.20 ± 0.08
	NaCl	1.50 ± 0.05*	0.60 ± 0.02*	1.25 ± 0.08*	0.45 ± 0.05*
Длина корня, мм	Контроль	18.57 ± 0.20	11.5 ± 0.05	14.50 ± 0.55	8.75 ± 0.85
	NaCl	11.46 ± 0.48*	5.00 ± 0.03*	8.50 ± 0.02*	2.95 ± 0.03*

* $p \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением.

Таблица 4. Влияние NaCl на фотохимические процессы ФСП в листьях проростков *Arabidopsis thaliana*

Параметр	Вариант	Col-0	<i>det2</i>	En-2	<i>bri1</i>
Y(II)	Контроль	0.63 ± 0.03	0.38 ± 0.02	0.58 ± 0.03	0.37 ± 0.02
	NaCl	0.45 ± 0.02*	0.23 ± 0.01*	0.40 ± 0.02*	0.22 ± 0.01*
ETR	Контроль	23.09 ± 1.15	14.02 ± 0.70	21.09 ± 1.05	19.09 ± 0.95
	NaCl	17.00 ± 0.85*	9.09 ± 0.45*	15.02 ± 0.75*	11.09 ± 0.55*
NPQ	Контроль	0.31 ± 0.02	0.39 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.21 ± 0.01
	NaCl	0.23 ± 0.01*	0.26 ± 0.01*	0.18 ± 0.01*	0.13 ± 0.01*
F _v /F _m	Контроль	0.81 ± 0.04	0.62 ± 0.03	0.79 ± 0.04	0.60 ± 0.03
	NaCl	0.69 ± 0.03*	0.46 ± 0.02*	0.64 ± 0.03*	0.37 ± 0.02*

Y(II) – эффективный квантовый выход, F_v/F_m – максимальный квантовый выход, ETR – относительная скорость транспорта электронов, NPQ – фотохимическое тушение. * $p \leq 0.05$ при сравнении с контрольным значением.

меньшей солеустойчивости растений с пониженным уровнем эндогенных БС (табл. 3).

Наряду с этим, на фоне хлоридного засоления у мутантных линий на 10–20% снижались параметры эффективности протекания фотохимических процессов ФСП по сравнению с родительскими линиями (табл. 4).

Повышенную чувствительность растений арабидопсис с нарушенным биосинтезом БС (мутанты *cpd* и *det2*) к некоторым повреждающим факторам отмечали и ранее [19]. Кроме того, было показано, что у БС-нечувствительных растений с нарушенным гормональным сигналингом (мутант типа *bri1*) была значительно снижена экс-

прессия стресс-регулируемых генов [20]. Все это свидетельствует о том, что эндогенные биологически активные БС вовлекаются в формирование стресс-толерантности растений.

Таким образом, в данной работе впервые показано, что на действие хлоридного засоления растения картофеля отвечали изменением профиля эндогенных БС. При этом идентифицирована группа 6-кето-БС, содержание которых, в отличие от других анализируемых групп гормонов, значительно возрастало в ответ на засоление как в побегах, так и в корнях. Установлено, что значительное снижение уровня эндогенных БС в мутантных растениях арабидопсис с нарушенным

биосинтезом или рецепцией фитостероидов приводит к снижению их солеустойчивости, о чем свидетельствует снижение эффективности протекания фотохимических процессов ФСII и ингибирование роста. Полученные данные имеют большое значение не только для понимания фундаментальных основ устойчивости, но и для разработки технологий повышения стресс-толерантности растений к засолению с помощью brassinosterоидов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Оценка влияния brassinosterоидов на формирование солеустойчивости растений выполнена при поддержке программы развития Томского государственного университета (Приоритет-2030, проект № 2.1.2.22). Осуществление морфометрического анализа растений было поддержано Российским научным фондом (РНФ, проект № 23-44-10019). Определение эндогенного содержания проведено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № X23РНФ-087).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Manghwar H., Hussain A., Ali Q., and Liu F.*, Brassinosteroids (BRs) Role in Plant Development and Coping with Different Stresses, // *Int. J. Mol. Sci.*, 2022. V. 23 (1012).
2. *Machado R.M.A., Serralheiro R.P.*, Soil salinity: effect on vegetable crop growth. management practices to prevent and mitigate soil salinization, // *Horticulturae*, 2016. V. 3 (2). P. 30.
3. *Giordano M., Petropoulos S.A., Rouphael Y.*, Response and defence mechanisms of vegetable crops against drought, heat and salinity stress, // *Agriculture*, 2021. V. 11. P. 463.
4. *Nxele X., Klein A., Ndimba B.K.*, Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants, // *S. Afr. J. Bot.*, 2017. V. 108. P. 261–266.
5. *Pan T., Liu M., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Nie C., Yu M., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I., Shabala S.*, Non-stomatal limitation of photosynthesis by soil salinity, // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 2021. V. 51. P. 791–825.
6. *Arif Y., Singh P., Siddiqui H., Bajguz A., and Hayat, S.*, Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance, // *Plant Physiol. Biochem.*, 2020. V. 156. P. 64–77.
7. *Ahamed G.J., Li X., Liu A., and Chen S.*, Brassinosteroids in plant tolerance to abiotic stress, // *J. Plant Growth Regul.*, 2020. V. 39. P. 1451–1464.
8. *Lichtenthaler H.K.*, Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, // *Methods Enzymol.*, 1987. V. 148. P. 350–382.
9. *Pradko A.G., Litvinovskaya R.P., Sauchuk A.L., Drach S.V., Baranovsky A.V., Zhabinskii V.N., Mirantsova T.V., Khrpach V.A.*, A new ELISA for quantification of brassinosterоids in plants, // *Steroids*, 2015. V. 97. P. 78–86.
10. *Ефимова М.В., Савчук А.Л., Хасан Дж.А.К., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Холодова В.П., Кузнецов В.В.*, Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса brassinosterоидами, // *Физиология растений*, 2014. V. 61 (6). P. 778–789.
11. *Ding J., Wu J.H., Liu J.F., Yuan B.F., and Feng Y.Q.*, Improved methodology for assaying brassinosterоids in plant tissues using magnetic hydrophilic material for both extraction and derivatization, // *Plant Methods*, 2014. V. 10 (1). P. 39–49.
12. *Кравец В.С., Кретинин С.В., Деревянчук М.В., Драч С.В., Литвиновская Р.П., Хрипа В.А.*, Влияние низких температур на уровень эндогенных Brassinosterоидов, // *Доповіді НАН України*, 2011. V. 8. P. 155–114.
13. *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. V. 9. P. 2184–88.
14. *Kolomeichuk L.V., Efimova M.V., Zlobin I.E., Kreslavski V.D., Murgan O.K., Koviun I.S., Khrpach V.A., Kuznetsov V.V., and Allakhverdiev S.I.*, 24-Epibrassinolide alleviates the toxic effects of NaCl on photosynthetic processes in potato plants, // *Photosynth. Res.*, 2020. V. 146. P. 151.
15. *Chaudhuri A., Halder K., Abidin M.Z., Majee M., Datta A.*, Abiotic Stress tolerance in plants: brassinosterоids navigate competently, // *Int. J. Mol. Sci.*, 2022. V. 23 (14577).
16. *Yuan L., Shu S., Sun J., Guo S., and Tezuka T.*, Effects of 24-epibrassinolide on the photosynthetic characteristics, antioxidant system, and chloroplast ultrastructure in *Cucumis sativus* L. under Ca(NO₃)₂ stress, // *Photosynth. Res.*, 2012. V. 112 (3). P. 205–214.
17. *Hayat S., Khaliq G., Wani A.S., Alyemeni M.N., and Ahmad A.*, Protection of growth in response to 28-homobrassinolide under the stress of cadmium and salinity in wheat, // *Int. J. Biol. Macromol.*, 2014. V. 64. P. 130–136.
18. *Fujioka S., Li J., Choi Y.-H., Seto H., Takatsuto S., Noguchi T., Watanabe T., Kuriyama H., Yokota T., Chory J., Sakurai A.*, The Arabidopsis deetiolated2 mutant is blocked early in brassinosterоid biosynthesis, // *Plant Cell*, 1997. V. 9. P. 1951–1962.
19. *Zeng H., Tang Q., and Hua X.*, Arabidopsis brassinosterоid mutants *det2-1* and *bin2-1* display altered salt tolerance, // *J. of Plant Growth Regul.*, 2010. V. 29 (1). P. 44–52.
20. *Kim S.Y., Kim B.H., Lim C.J., Lim C.O., and Nam K.H.*, Constitutive activation of stress-inducible genes in a brassinosterоid-insensitive 1 (*bri1*) mutant results in higher tolerance to cold, // *Physiol. Plant.*, 2010. V. 138 (2). P. 191–204.

ENDOGENOUS BRASSINOSTEROIDS ARE INVOLVED IN THE FORMATION OF SALT RESISTANCE OF PLANTS

L. V. Kolomeichuk^a, E. D. Danilova^{a,#}, O. K. Murgan^a, A. L. Sauchuk^b, R. P. Litvinovskaya^b,
V. A. Khripach^b, Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov^{a,c}, and M. V. Efimova^a

^aNational research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

^bInstitute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

^cTimiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: nusy.l.d@gmail.com

For the first time it was shown that potato plants responded to salt stress by changing the profile of endogenous brassinosteroids (BS). At the same time, a group of 6-keto-BS was identified, the content of which, unlike other analyzed groups of hormones, increased significantly during salinization. It was found that a 10-fold decrease in the level of endogenous BS in mutant *Arabidopsis thaliana* plants with impaired biosynthesis (*det2*) (or reception (*bri1*)) of phytochemicals leads to a decrease in their salt resistance, as evidenced by a decrease in the efficiency of photochemical processes of photosystem II (PSII) and inhibition of growth. The presented data confirm the idea of the involvement of endogenous BS in the formation of salt resistance of plants.

Keywords: brassinosteroids, chloride salinity, photosystem II, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum*