Сведения о выполненных работах в 2018 году
по проекту **«Физиологические механизмы регуляции стресс-устойчивости растений картофеля светом и брассиностероидами»,**
поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 16-16-04057

Руководитель канд. биол. наук Ефимова Марина Васильевна

В 2018 г. исследования в рамках проекта были посвящены изучению механизмов защитного действия стероидных гормонов растений и селективного света при интенсивном хлоридном засолении и избыточном содержании ионов меди в субстрате.

Проведен химический анализ состава почв с помощью атомно-эмиссионного спектрометра с индуктивно связанной плазмой ИСП-АЭС. В пробах было идентифицировано 26 химических элементов, среди которых Al, As, B, Ba, Ca,Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Rb, Si, Sr, Ti, V, Y, Zn, Zr. Поставлен ряд экспериментов по сравнению эффективности применения промышленного препарата «Эпин-экстра» и брассиностероидов, отличающихся как по количеству атомов углерода в молекуле, так и по конфигурации заместителей в боковой цепи для растений картофеля в почвенной культуре. Оценена структура урожая и параметры, отражающие продуктивность растений (количество и массу клубней в одном кусте). Замачивание миниклубней в 10 нМ растворе гормонов или промышленном препарате «Эпин-экстра» привело к увеличению продуктивности растений; максимальный эффект показан при использовании брассинолида. Обработка миниклубней картофеля раствором эпибрассинолида способствовало формированию более крупных гранул крахмала по сравнению с контрольным вариантом, что имеет важное значение для промышленного производства крахмала и его применения.

Выявлены биохимические и физиологические механизмы устойчивости ранне- и среднеспелых сортов картофеля к хлоридному засолению NaCl (50-150 мМ) и избыточным концентрациям ионов меди в среде (50-150 мкМ). Относительно высокую степень устойчивости к действию данных факторов проявлял среднеспелые сорта картофеля Накра и Луговской. Это проявлялось в меньшей интенсивности перекисного окисления липидов в листьях и стеблях растений, в снижении накопления пролина в ответ на действие стрессора по сравнению с другими сортами картофеля. Сорт Луговской отличался не значительным снижением оводнённости надземной и подземной частей, по сравнению, например, с растениями сорта Жуковский ранний. Одной из возможных причин этого может быть существование барьерных механизмов, ограничивающих поступление ионов натрия не только в корень, но и в надземную часть растения. Растения сорта Луговской также характеризовались высокой степенью устойчивости (по сравнению с Red Scarlett и Жуковский ранний) к действию избыточных концентраций ионов меди, несмотря на высокую интенсивность перекисного окисления липидов по сравнению с другими сортами в ответ на действие стрессора. При стрессе растениям сорта Луговской

удалось поддерживать содержание фотосинтетических пигментов на уровне контроля, вне зависимости от действующей концентрации ионов меди, что немаловажно для нормального функционирования ассимилирующего аппарата растений, содержание пролина также увеличилось в меньшей степени, по сравнению с другими сортами растениями.

Направленность протекторного эффекта кратковременной (4 часовой) обработки растений картофеля (сортов Жуковский ранний и Луговской) стероидными гормонами (10 пМ-10 нМ) была оценена на примере функционирования осмотической и антиоксидантной систем. Впервые показано, что брассиностероиды оказывали полифункциональный стресс-защитный эффект при хлоридном засолении. С одной стороны, гормоны снижали интенсивность перекисного окисления липидов, с другой стороны, уменьшали аккумуляцию пролина по сравнению с NaCl воздействием, что достигалось за счёт активации экспрессии гена деградации (PDH) пролина. Кроме того, кратковременная обработка растений гормонами способствовала снижению активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и пероксидазы), активность которых возрастала в ответ на действие соли.

В условиях избыточной концентрации ионов меди (100 мкМ) кратковременная обработка брассиностероидами снижала активность супероксиддисмутазы и увеличивала активность пероксидазы; последнее происходило, вероятно, за счёт повышения уровня экспрессии гена цитозольной пероксидазы.

Одним из значимых показателей водного статуса растений является уровень оводненности тканей. Протекторный эффект стероидных гормонов на фоне действия стрессора проявлялся в увеличении процентного содержания воды в растениях сорта Жуковский ранний. Максимальный эффект показан для гомобрассинолида и эпибрассинолида в концентрациях 10 и 100 пМ. Принципиально важным для сохранения водного статуса растений при засолении является понижение их осмотического потенциала до уровня, способного восстановить направление градиента водного потенциала и обеспечить поток воды из среды в клетки корня. Осмотический потенциал клеточного экссудата листьев картофеля обоих сортов в ответ на засоление снижался примерно в 2 раза. Предварительная обработка растений гормонами до действия стрессора частично снимала NaCl-индуцированное падение осмотического потенциала, наиболее эффективными были эпибрассинолид (100 пМ) и гомобрассинолид (10 пМ) для обоих сортов картофеля.

Решающую роль в формировании осмотического потенциала играют неорганические ионы, прежде всего ионы калия; в условиях засоления особая роль принадлежит ионам натрия. Снижение отрицательного эффекта NaCl на накопление ионов натрия в побегах и корнях растений для сорта Луговской показано при действии эпибрассинолида в концентрации 0,1 нМ и гомобрассинолида в концентрациях 1 и 10 нМ; для сорта Жуковский – при действии 10 пМ гомобрассинолида.

Влияние стероидных гормонов (эпибрассинолида или гомобрассинолида) на содержание ионов меди, калия и кальция в надземной и подземной частях растений картофеля в условиях повышенного содержания ионов меди в среде определялось

химической структурой гормона и способом воздействия до, во время или после действия стрессора. Показано, что эпибрассинолид снижал накопление ионов меди надземной и подземной частями растений, лучший эффект показан при использовании гормона до или после действия стрессора. Вероятно, эпибрассинолид снижал поглощение ионов меди корнями растений и замедлял их транспорт в надземную часть; возможно, ЭБЛ активировал синтез хелаторов меди в корнях растений.

Впервые показано, что предобработка стероидными гормонами корней оздоровленных растений-регенерантов картофеля сорта Луговской приводила к увеличению интенсивности фотосинтеза, мезофильной проводимости и снижению транспирации листьев в условиях аквакультуры. Выявлена концентрация эпибрассинолида, эффективная для снижения негативного воздействия хлоридного засоления на основные фотосинтетические показатели – максимальный (FV/FM) и эффективный (Y(II)) квантовый выход, относительную скорость транспорта электронов (ETR). Кратковременное (4 часа) и длительное (20 часов) воздействие гомобрассинолидом приводило к падению устьичной проводимости, характеризующей поток водяных паров из межклетников через устьица наружу, и как следствие, к снижению интенсивности транспирации. Возможно, это является одной из причин повышенной оводненности тканей растений на фоне хлоридного засоления.

Впервые установлено, что нарушение сигналинга стероидных гормонов или снижение их эндогенного уровня приводит к подавлению фотосинтетической активности растений, что указывает на значительную роль брассиностероидов в формировании адаптивных реакций к действию абиотических стрессов.

Для демонстрации влияния брассиностероидов и света в условиях солевого стресса и избыточного содержания ионов меди в среде нами была проведена методом ПЦР в реальном времени оценка экспрессии ряда генов, кодирующих основные ферменты метаболизма брассиностероидов (CYP90D1, CYP45085A1, CYP45090A1, CYP45090B1, DET2), рецепции брассиностероидов (BAK, SR160), рецепторов синего света (CRY, PHR); гены ключевых звеньев неферментативной и ферментативной защиты – пролина (P5CS, P5CR, PDH), пероксидазы (APX1, APX3), флавоноидов (CHS, PAL); гены транспортеров ионов меди (CCH) и натрий/водородного транспортера (SOS1). Всего в работе проведена оценка уровня экспрессии 18 целевых генов относительно двух референсных генов (гена фактора элонгации 1α и гена циклофилина).

Красный и синий свет вызывали снижение относительного уровня экспрессии генов сигналинга брассиностероидов, биосинтеза флавоноидов и метаболизма пролина. Дифференциация ответа растений на различный спектральный свет выражалась в степени подавления экспрессии того или иного гена. Хлоридное засоление (125 мМ NaCl) способствовало увеличению уровня экспрессии гена фоторецептора CRY1 и снижению уровней транскриптов генов SR160, CYP450 90D2, DET2, CHS1a и P5CS1. На белом свету и при досвечивании синим светом на фоне NaCl наблюдалось значительное повышение активности гена натрий/водородного антипортера (SOS1).

Влияние экзогенных брассиностероидов на экспрессию генов было опосредовано спектральными характеристиками света. Так, на синем свету в ответ на действие гормона увеличивалась экспрессия генов их рецепции, гена синтеза фенольных соединений и гена цитоплазматической пероксидазы; уровень экспрессии гена пероксисомальной пероксидазы снижался. На красном свету гормон способствовал подавлению экспрессии генов фоторецепторов, гена деградации пролина, гена синтеза флавоноидов и гена цитоплазматической пероксидазы. Изучаемые гены метаболизма брассиностероидов в ответ на экзогенный эпибрассинолид вне зависимости от условий освещения не изменяли уровень экспрессии.

В ответ на воздействие брассиностероидов на фоне хлоридного засоления на белом свету и при досвечивании красным светом наблюдалось увеличение уровня экспрессии генов рецепции брассиностероидов и гена натрий/водородного антипортера. В вариантах с досвечиванием красным и синим светом по сравнению с вариантом без досвечивания эпибрассинолид способствовал снижению уровня экспрессии генов синтеза флавоноидов относительно контрольных вариантов (в отсутствие и в присутствии стрессора). При досвечивании синим светом брассиностероид подавлял экспрессию генов метаболизма пролина, синтеза брассиностероидов и генов пероксидаз относительно контрольных вариантов; на белом свету активировалась экспрессия генов синтеза пролина и цитозольной пероксидазы; экспрессия гена деградации пролина и пероксисомальной пероксидазы подавлялась. Вне зависимости от световых условий эпибрасинолид снижал уровень экспрессии гена фоторецептора CRY1 относительно действия стрессорного фактора до значений контрольного варианта.

Присутствие ионов меди подавляло экспрессию генов биосинтеза брассиностероидов, пероксидаз, натрий/водородного антипортера и гена биосинтеза фенольных соединений (PAL). Достаточная для анализа активность гена, кодирующего транспортер меди (CCH), не была зафиксирована ни у одного из исследованных образцов. Кратковременная обработка растений картофеля эпибрассинолидом (0,1 нМ) и гомобрассинолидом (0,1 нМ) оказывала протекторное воздействие при действии повышенных концентраций ионов меди (100 мкМ). Так, уровень экспрессии генов рецепции брассиностероидов, биосинтеза брассиностероидов, синтеза фенольных соединений, гена цитозольной пероксидазы и натрий/водородного антипортера увеличивался.

Методом двухстадийного иммуноферментного анализа проанализировано содержание брассиностероидов (групп брассинолида, 24-эпибрассинолида, 28-гомобрассинолида, В-лактон- и 6-кето-производных) в растениях картофеля при хлоридном засолении и в ответ на кратковременное воздействие эпибрассинолидом. Эндогенный уровень брассиностероидов в ответ на хлоридное засоление определялся сортом картофеля. Так, содержание всех трёх групп гормонов (брассинолидов, эпибрассинолидов и гомобрассинолидов) в корнях и побегах растений снижалось у представителей среднеспелого сорта Луговской. Уровень гормонов группы брассинолидов в корнях и побегах растений картофеля сорта Жуковский ранний снижалось, в то время как

уровень групп эпибрассинолидов или гомобрассинолидов или увеличивался, или оставался неизменным в побегах и корнях соответственно.

В отсутствие хлоридного засоления в растениях картофеля сорта Луговской преобладали лактоны над кетонами (предшественники активных брассиностероидов); в ответ на действие стрессора во всех частях растений изменилось соотношение в пользу кетонов. В растениях сорта Жуковский ранний в норме и при стрессе содержание кетонов преобладало в побеге, лактонов – в корнях. В ответ на воздействие NaCl в побеге увеличивалось содержание лактонов и кетонов, в корнях оно снижалось.

В ответ на кратковременное воздействие эпибрассинолидом (предшествующим NaCl засолению) отмечено увеличение содержания эпибрассинолидной, гомобрассинолидной и брассинолидной фракций, по сравнению с более длительной гормональной обработкой; при этом содержание кетонов и лактонов и их соотношение не зависело от продолжительности прайминга.

Разработан новый метод стереоселективного синтеза α-метил кетонов - ценных промежуточных продуктов процесса формирования боковой цепи, содержащей все необходимые структурные элементы молекулы природного гормона (брассиностероида). Построение боковой цепи, содержащей четыре асимметрических центра, является наиболее сложной задачей в ходе синтеза большинства природных брассиностероидов и их биосинтетических предшественников. Метод основан на использовании в качестве ключевой стадии процесса реакции циклопропанирования сложных эфиров алкенами (реакция Кулинковича), приводящей к образованию замещенных циклопропанолов. Второй ключевой реакцией метода стало обнаруженное нами раскрытие промежуточных циклоропанолов в диастереомерно обогащенные α-метил кетоны под действием метилата магния. Возможности метода для синтеза брасиностероидов продемонстрированы на примере получения 6-деоксоказастерона – интермедиата биосинтеза наиболее активного представителя этого класса фитогормонов – брассинолида.

Была проведена Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты» на базе Национального исследовательского Томского государственного университета (ТГУ) с 10 по 13 апреля 2018 года. Доклады участников конференции были представлены в рамках следующих секций: (1) Поиск новых молекулярных инструментов для управления развитием картофеля на уровне генома и протеома; (2) Механизмы устойчивости растений картофеля к неблагоприятным факторам среды и биопатогенам; (3) Применение удобрений и регуляторов роста для повышения продуктивности картофеля; (4) Биотехнологические приемы оздоровления и повышения продуктивности картофеля; (5) Трансгенез, селекция и семеноводство картофеля. В рамках конференции состоялась сессия постерных докладов, которые, в большей части, были представлены молодыми учеными России и ближнего зарубежья. Всего в конференции приняли участие около 150 ученых. Для сотрудников департамента развития сельского хозяйства Томской области и индивидуальных

предпринимателей наиболее информативной частью мероприятия стало проведение круглого стола «Состояние и перспективы картофелеводства в России в условиях импортозамещения», модератором которого был проф. Е.А. Симаков (зав. отделом экспериментального генофонда картофеля ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха).

Результаты исследования, полученные в ходе выполнения проекта, были положены в основу разработок, представленных на четырёх Международных очных выставках: (1) Высокие технологии. Инновации. Инвестиции Hi-Tech-2018 (Санкт-Петербург); (2) II Евразийская научно-технологическая конференция «Сопряжение большого Евразийского партнерства и инициативы «Один пояс – один путь»: стратегии, программы, проекты, агропродовольственного партнерства» (Санкт-Петербург); (3) Международном биотехнологическом Форуме-выставке «РосБиоТех-2018» (Москва); (4) VI Международном форуме технического развития «Технопром-2018» (Новосибирск). Получено 4 золотых медали.

Во время отчётного периода участниками проекта было сделано 17 докладов на Международных или Всероссийских с международным участием конференциях. Среди них – 2 пленарных и 7 устных. Опубликовано четыре статьи в журналах, индексируемых в Web of Science или Scopus.

Информация о публикациях в СМИ, посвященных результатам проекта:

1. http://ofr.su/assets/files/bulletin/BulletenOFR_5(37).pdf
2. http://www.tsu.ru/news/novye-tekhnologii-pomogut-obespechit-rossiyan-bezo/?sphrase_id=184626