Сведения о выполненных работах в 2016 году
по проекту **«Физиологические механизмы регуляции стресс-устойчивости растений картофеля светом и брассиностероидами»,**
поддержанному Российским научным фондом

Соглашение № 16-14-10172

Руководитель канд. биол. наук Ефимова Марина Васильевна

Проект посвящен изучению стресс-протекторного действия брассиностероидов при интенсивном хлоридном засолении и загрязнении среды тяжелыми металлами с целью последующей разработки экономичного способа повышения продуктивности и устойчивости растений картофеля.

Нами были выделены апикальные меристемы ранних (с. Red Scarlett и с. Жуковский ранний) и среднеспелых (с. Накра и с. Луговской) сортов картофеля. Растения-регенеранты были многократно клонированы для получения их в необходимом количестве с целью проведения дальнейших экспериментов. Проведены опыты по влиянию растворов солей хлорида натрия в диапазоне концентраций от 50 до 150 мМ и ионов меди (10-200 мкМ) на рост и развитие микроклонов ранних сортов картофеля в условиях гидропоники. Степень устойчивости различных сортов картофеля оценивали по ростовым и физиологическим показателям. Учитывали накопление сырой и сухой биомассы, линейные размеры побега и корня, площадь листьев, количество столонов; содержание фотосинтетических пигментов, накопление ионов натрия, калия и меди в надземных и подземных частях растений, степень осмотического и окислительного стрессов.

Установлено, что вне зависимости от генотипа растения S. tuberosum проявляли высокую чувствительность к действию NaCl, начиная с минимальной из анализируемых концентраций (50 мМ). Площадь листьев, число столонов, масса надземных и подземных органов при засолении снижались примерно в два раза; при этом максимальный негативный эффект был отмечен для сорта Red Scarlett. Принципиально важным для поддержания оптимального водного статуса тканей растений при засолении является понижение их осмотического потенциала до уровня, способного обеспечить приток воды из среды в растение. Даже при незначительном засолении (50 мМ NaCl) осмотический потенциал тканей листьев картофеля снижался на 40 % относительно контрольных значений и в 4,5 раза - при интенсивном хлоридном засолении (150 мМ).

К негативному влиянию меди более чувствительным оказался, напротив, сорт Жуковский ранний, у которого при 25 мкМ CuSO4 длина корня и количество столонов уменьшалось на 20-25 %, концентрация фотосинтетических пигментов снижалась. Повышение концентрации ионов меди в растворе до 50 мкМ приводило к снижению продуктивности (количество столонов, площадь листовой поверхности, сырая и сухая масса надземных и подземных частей растений) растений картофеля

раннеспелых сортов, при этом максимальный негативный эффект был также отмечен для сорта Жуковский ранний.

Синтез фитогормонов 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассинолида осуществляли с использованием разработанных в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси методов. Для получения брассинолида разработан усовершенствованный метод синтеза на основе стигмастерина, который позволил повысить выход продукта в мультиграммовом синтезе (7,5 % на 16 стадий). Предложенный метод существенно превосходит существующие способы синтеза по технологичности и возможностям крупномасштабной реализации.

Нами проведено сравнение эффективности действия промышленного препарата «Эпин-экстра» и брассиностероидов, отличающихся как по количеству атомов углерода в молекуле, так и по конфигурации заместителей в боковой цепи, в диапазоне концентраций от 0,1 нм до 1 мкМ на рост и развитие микроклонов раннеспелых сортов картофеля Red Scarlett и Жуковский ранний при интенсивном засолении и избыточном содержании ионов меди. Защитный эффект стероидных гормонов зависел от того, когда обрабатывали брассиностероидами растения: до стрессорного воздействия, во время действия повреждающего фактора или на этапе восстановления.

Высокие концентрации (1,0 и 0,1 мкМ) брассиностероидов подавляли рост раннеспелых сортов картофеля. Стероидные гормоны (брассинолид, 24-эпибрассинолид и 28-гомобрассинолид) в концентрации 0,1 нМ оказывали стимулирующее влияние на рост растений (длина побега и сырая масса целых растений) сорта Жуковский ранний. Обработка 28-гомобрассинолидом ускоряла клубнеобразование. Среди анализируемых гормонов только брассинолид стимулировал увеличение суммарной листовой поверхности. Достоверных изменений по интенсивности ростовых процессов в ответ на обработку брассиностероидами для сорта картофеля Red Scarlet не отмечено. Промышленный препарат «Эпин-экстра» также не проявлял заметного влияния на рост и развитие микроклонов раннеспелых сортов картофеля.

В ходе реализации проекта нами был установлен протекторный эффект промышленного препарата «Эпин-экстра» и брассиностероидов (брассинолида, 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассинолида) в условиях стресса. Способность снимать негативное воздействие интенсивного хлоридного засоления и избыточного содержания ионов меди проявлялось не только на уровне ростовых, но и физиологических показателей. При хлоридном засолении протекторный эффект брассиностероидов выражался в регуляции уровня натрия в надземной и подземной частях растений, в накоплении пролина в побеге и снижении осмотического потенциала в клеточном экссудате. Наиболее эффективными гормональными препаратами для поддержания оптимальной концентрации ионов натрия в побеге являлись 24-эпибрассинолид и промышленный препарат «Эпин-экстра». Стероидные

гормоны, особенно 24-эпибрассинолид и 28-гомобрассинолид, ингибировали поступление ионов меди в корневую систему. Защитное действие стероидных гормонов при избыточном содержании ионов меди в среде заключалось в увеличении концентрации пролина и активности антиоксидантых ферментов (СОД и каталазы).

Защитный эффект стероидных гормонов при засолении в значительной степени определялся сортом картофеля – Жуковский ранний отвечал увеличением количества столонов и массы растений (сырой и сухой) на действие экзогенного брассинолида, Red Scarlet – 24-эпибрассинолида.

Впервые выявлено оптимальное сочетание способов воздействия (концентрация и время воздействия) брассиностероидов на устойчивость микроклонов раннеспелых сортов картофеля.

Сравнение эффективности действия брассиностероидов при интенсивном засолении в зависимости от времени обработки растений картофеля показало, что наибольший протекторный эффект гормона отмечен при его совместном действии со стрессором или на этапе восстановления.

При избыточном содержании ионов меди высокая эффективность отмечена при обработке растений 28-гомобрассинолидом (0,1 нМ); при этом предпочтительнее использовать гормон в период действия стрессора или на этапе репарации.

Подобраны праймеры, и определены размеры ампликонов для трех конститутивных (референсных) генов картофеля и 38 генов, кодирующих транспортеры тяжелых металлов, металлотионеины, ферменты синтеза низкомолекулярных хелаторов и металлошаперонов, индуцируемых в ответ на стрессорное воздействие; фоторецепторов и генов, кодирующих рецепторы и основные компоненты сигнальной цепи брассиностероидов.

Оптимизированы условия выделения эндогенных брассиностероидов на двух модельных объектах – картофеле (представитель двудольных растений) и ячмене (представитель однодольных растений). Отработаны иммуноферментные тест-системы для 24-эпибрассиностероидов (24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона), 24S-метилбрассиностероидов (брассинолида и кастастерона) и 28-гомобрассиностероидов (28-гомобрассинолида и 28-гомокастастерона). Было выявлено, что используемый метод экстракции стероидных гормонов является универсальным, по меньшей мере, для ячменя и картофеля.

В соответствии с темой проекта был проведен патентный поиск с глубиной проработки с 1994 по 2015 гг. Проанализированы патенты по использованию брассиностероидов и света при выращивании растений, в том числе картофеля, с целью повышения продуктивности сельскохозяйственных растений и повышения их стресс-устойчивости. Установлено, что исследованию устойчивости картофеля к различным стрессорным факторам посвящены единичные технические решения, причем российские патенты получены в основном зарубежными фирмами. На весьма

поверхностном уровне изучены и применяются на практике методы светового воздействия на культуру картофеля, что дает широкое поле для разработки новых эффективных методов, особенно при микроклональном размножении оздоровленных растений.