Сведения о выполненных работах в 2017 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

В 2017 г. исследования в рамках Проекта были посвящены изучению защитного действия стероидных гормонов (брассинолида, 24-эпибрассинолида и 28-гомобрассинолиа) и коммерческого препарата «Эпин-экстра» при интенсивном хлоридном засолении и избыточном содержании ионов меди на примере среднеспелых сортов картофеля Накра и Луговской.

Прежде всего, пробирочные растения Solanum tuberosum сортов (Жуковский ранний, Ред Скарлетт, Луговской, Накра) были протестированы на наличие РНК вирусов X, Y, M, L, S, A картофеля и вироида веретеновидности клубней картофеля (Potato spindle tuber viroid). Растения были также проверены на наличие заражения бурой и кольцевой гнилью картофеля, вызываемыми бактериями Ralstonia solanacearum (раса 3, bv.2) и Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicum. Было получено необходимое количество оздоровленных микроклонов и миниклубней ранне- и среднеспелых сортов картофеля для дальнейшего культивирования в гидропонной миниустановке, Биотехнологическом модуле «Картофельное дерево-10» и тестирования в полевых условиях.

Механизмы устойчивости растений картофеля (S. tuberosum L.) к 50-150 мМ NaCl и 25-200 мкМ CuSO4 изучали на примере районированных в России сортов Накра и Луговской. Реакцию растений на солевой стресс оценивали по ростовым (сырая и сухая биомасса надземной и подземной частей растений, линейные размеры побега и корня, площадь листовой поверхности, количество столонов) и физиологическим (уровень фотосинтетических пигментов, перекисное окисление липидов, осмотический потенциал клеточного экссудата, содержание пролина и активность антиоксидантных ферментов, оводнённость тканей, накопление ионов натрия, калия и кальция в надземных и подземных частях растений) показателям.

Нами показано, что с. Луговской отличался высокой чувствительностью к хлоридному засолению. Установлено, что растения с. Луговской отвечали на засоление значительным ингибированием роста, снижением содержания хлорофилла а и торможением образования столонов. Вместе с тем, при слабом и умеренном солевом стрессе растения сохраняли водный гомеостаз за счет эффективной осморегуляции, активно накапливали пролин, обладающий стресс-протекторным действием, и практически не обнаруживали развития окислительного стресса. Слабое увеличение интенсивности окислительного стресса в растениях при засолении не сопровождалось достоверными изменениями активностей ряда антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы).

Высказано предположение, что уровень солеустойчивости данного сорта лимитируется, по меньшей мере, двумя основными причинами (1) недостаточной «барьерной» функцией корневой системы удерживать Na+ и обеспечивать избирательный транспорт ионов в надземную часть и (2) низкой эффективностью системы загрузки Na+ из цитоплазмы клеток листа в центральную вакуоль с целью их внутриклеточной компартментации и снижения токсического эффекта.

Солеустойчивость сорта Накра была выше, чем с. Луговской. Причины этого заключаются в более низкой интенсивности накопления натрия в надземной и подземной частях растений с. Накра и способности поддерживать гомеостаз К+ при солевом стрессе.

На растения с. Луговской негативно влияла даже самая низкая из анализируемых нами концентраций CuSO4 (25 мкМ). При этом интенсивность роста побега снижалась на 20 %, количество столонов и суммарная площадь листьев уменьшались на 40 %. В то же самое время 25 мкМ CuSO4 у растений картофеля с. Накра вызывала лишь подавление роста листьев. С увеличением концентрации Cu2+ негативный эффект усиливался. При 200 мкМ CuSO4 число столонов снижалось в восемь раз у растений картофеля с. Луговской и только в два раза – у растений с. Накра. Накопление Cu2+ в растениях было органоспецифичным; в контрольных условиях концентрация меди в корнях в два раза превышала аналогичный показатель в побегах. При 25 мкМ CuSO4 в среде содержание Cu2+ в растениях зависело от анализируемого сорта картофеля. Максимальное накопление Cu2+ при 25 мкМ CuSO4 в среде наблюдалось в растениях с. Луговской. В надземной части содержание Cu2+ по сравнению с контрольным вариантом увеличивалось в 9 раз, в корнях – в 100 раз. В аналогичных условиях содержание Cu2+ в надземной части картофеля с. Накра увеличивалась в 4 раза, в корнях – в 66 раз.

Анализируя полученные данные, можно говорить о сортоспецифичности ответа растений на засоление и повышенные концентрации ионов меди. Полученные данные могут лечь в основу рекомендаций по выращиванию тех или иных сортов на неиспользуемых (засоленных/загрязнённых) территориях.

Впервые нами были выявлены стероидные гормоны с наибольшим защитным действием в условиях интенсивного засоления и избыточного содержания тяжелых металлов для ранне- и среднеспелых сортов картофеля. Так, при засолении для раннеспелых сортов картофеля наибольший защитный эффект проявляли 24-эпибрассинолид и коммерческий препарат «Эпин-экстра». Для среднеспелых сортов более эффективными препаратами оказались 24-эпибрассинолид и брассинолид.

Отрицательное влияние избыточных концентраций Cu2+ на растения картофеля раннеспелых сортов снижалось 24-эпибрассинолидом и 28-гомобрассинолидом; для среднеспелых – более эффективными были препарат «Эпин-экстра» и брассинолид.

Сравнение эффективности действия брассиностероидов при стрессе проводили в зависимости от способа гормонального воздействия - до начала действия стрессора

(этап предадаптации), одновременно с началом действия стрессора (период стресса) или после действия стрессора (этап восстановления).

Введение стероидных гормонов в среду при стрессе приводило к увеличению числа столонов, содержания фотосинтетических пигментов по сравнению с действием одного стрессора; осмотический потенциал клеточного экссудата приближался к контрольным значениям.

Наибольший положительный эффект брассиностероидов (брассинолида и промышленного препарата «Эпин-экстра») при интенсивном засолении для среднеспелых сортов картофеля наблюдался при действии гормона одновременно с действием стрессора или после окончания его действия (этап восстановления).

Максимальный защитный эффект на фоне повышенных концентраций ионов меди для брассинолида и эпибрассинолида показан при их добавлении в питательную среду до начала или во время действия стрессора; для промышленного препарата «Эпин-экстра» – на этапе восстановления. Для сорта Накра аналогичный эффект показан при добавлении в среду брассинолида в период стресса или на этапе восстановления; для эпибрассинолида – на этапе предадаптации.

Кроме того, впервые было показано, что кратковременная (4-х часовая) предобработка растений картофеля брассиностероидами (24-эпибрассинолидом или 28-гомобрассинолидом) приводила к способности растений отвечать на «отсроченный» солевой стресс аккумуляцией антиоксидантных соединений и повышением солеустойчивости.

При оценивании влияния спектрального света на водный статус и элементный гомеостаз растений среднеспелых сортов картофеля в условиях гидропоники при засолении и действии токсичных концентраций ионов меди было отмечено, что наибольший негативный эффект стрессоров был отмечен для растений, выращенных только при использовании люминесцентных ламп с преобладанием синей и красной областей спектра. Вероятно, присутствие зелёной области спектра положительно влияет на стрессе-устойчивость растений картофеля среднеспелых сортов.

Принципиально важным для сохранения водного статуса тканей 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. Наибольшее снижение осмотического потенциала при интенсивном засолении отмечено в листьях картофеля, выращенных на свету люминесцентных ламп с преобладанием синей и красной областей спектра.

При повышенных концентрациях в среде меди оводнённость тканей растения, осмотический потенциал клеточного экссудата и накопление Cu2+ в присутствии стрессора не зависели от условий освещения.

Установлена специфичность реакции растений картофеля с. Жуковский ранний на экзогенную обработку брассиностероидами в условиях гидропонного модуля «Картофельное дерево». Показано, что кратковременная однократная корневая обработка растений картофеля брассиностероидами в зависимости от химической

структуры соединения и действующей концентрации вещества ускоряет образование миниклубней и приводит к увеличению их выхода.

Показано, что процесс клубнеобразования у растений картофеля напрямую зависел от интенсивности света. Так, с повышением интенсивности света от 200 до 400 мкмоль/м2с увеличивался выход миниклубней у контрольных растений. Предобработка растений брассиностероидами вызывала увеличение клубнеобразования при низкой интенсивности света и снижение при высокой интенсивности света. Полученные данные можно в дальнейшем использовать для повышения выхода семенного материала, а также для компенсации недостатка света брассиностероидами.

Оптимизированы условия постановки полимеразной цепной реакции в реальном времени для изучения экспрессии стресс-индуцируемых генов (транспортеров тяжелых металлов, металлотионеинов, ферментов синтеза фитохелатинов и металлошаперонов; генов фоторецепторов, генов метаболизма и сигналинга брассиностероидов).

Методом двухстадийного иммуноферментного анализа проанализировано содержание брассиностероидов (группы брассинолида, 24-эпибрассинолида, 28-гомобрассинолида, В-лактон- и 6-кето-производных) в побегах и корнях образцов картофеля, выращенных из апикальной меристемы или боковой почки. Исследованы 4 сорта картофеля: раннеспелые – Ред Скарлет и Жуковский, а также среднеспелые Луговской и Накра.

Полученные данные свидетельствуют о том, что близкие по срокам созревания сорта имели сходный брассиностероидный профиль. Так, для сортов раннего срока созревания характерно наличие высокого уровня кетонов в побегах и высокого содержания лактонов - в корнях. При этом в с. Жуковский, который относится к очень ранним сортам, содержание лактонов сопоставимо с кетонами. Отличительной чертой является также присутствие в значительном количестве 24-эпибрассиностероидов в корнях и их отсутствие в побегах. Для среднеспелых сортов характерно также преобладание кетонов над лактонами в побегах, но в корнях это различие нивелируется (кроме с. Луговской, выращенного из апикальной меристемы). Следует отметить, что во всех изученных вариантах проростков среднеспелых сортов отсутствуют стероидные гормоны ряда 24-эпибрассинолида.

Разработана методология синтеза кастастерона (предшественник брассинолида), позволяющая получать граммовые количества целевого продукта. В основу положены известные методы синтеза. Повышение их эффективности достигнуто применением селективных реагентов, оптимизаций условий реакции, использованием специальных способов разделения изомерных смесей и выделения продуктов.

Информация о публикациях в СМИ, посвященных результатам проекта:

1. https://www.riatomsk.ru/article/20161220/kak-v-tgu-pomogayut-rasteniyam-pobeditj-stress/

2. http://www.tsu.ru/news/uchenye-tgu-nauchilis-zashchishchat-rasteniya-ot-n/