

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН И РОСТ РАПСА НА НАЧАЛЬНЫХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА ПРИ ХЛОРИДНОМ ЗАСОЛЕНИИ*

М.В. Ефимова^{1,3}, Ж. Хасан^{2,3}, В.П. Холодова³,
Вл.В. Кузнецов^{2,3}

¹Кафедра физиологии растений и биотехнологии
Томский государственный университет
пр. Ленина, 36, Томск, Россия, 634050

²Кафедра ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

³Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
ул. Ботаническая, 35, Москва, Россия, 127276

В статье представлены результаты исследования действия разных концентраций NaCl (от 50 до 200 мМ) на прорастание семян и морфогенез проростков рапса и солезащитный эффект ряда брассиностероидов, различающихся по физиологической активности (брассинолида, эпибрассинолида и гомобрассинолида). Выдвинуто предположение, что протекторное действие брассиностероидов при засолении может быть обусловлено их способностью регулировать содержание стрессовых гормонов или вторичных мессенджеров, вовлеченных во внутриклеточную передачу стрессорного сигнала.

Ключевые слова: *Brassica napus L.*, хлоридное засоление, прорастание семян, проростки, ростовые показатели, брассиностероиды, брассинолид, эпибрассинолид, гомобрассинолид.

В настоящее время около одной трети всех земель относится к засушливым территориям. Эти территории зачастую подвержены засолению, которое связано с малым количеством осадков, избытком ионов натрия в ризосфере и высокой интенсивностью транспирации [1]. Дополнительной причиной интенсивного засоления почв, испытывающих водный дефицит, выступает постоянно возрастающая антропогенная нагрузка, которая приводит к нарушению водообмена между воздушной и почвенной средами.

* Исследования поддержаны грантом РФФИ (12-04-90716-моб_ст).

По данным Всемирной организации продовольствия и сельского хозяйства (FAO) ООН, общая площадь засоленных территорий в мире превышает 800 миллионов гектаров [2].

Засоление почв приводит к снижению продуктивности агро- и биоценозов, падению биоразнообразия и, как следствие этого, к значительным экономическим потерям [3; 4].

Изучение механизмов устойчивости растений к повреждающему действию абиотических факторов является одной из фундаментальных проблем современной биологии и имеет важное значение для сохранения продуктивности агроценозов в аридных регионах.

Изучение механизмов устойчивости имеет принципиальное значение для понимания стратегии выживания растений в экстремальных условиях, в том числе в условиях интенсивного засоления, и разработки технологии защиты растений от повреждающего действия неблагоприятных факторов среды [5].

В настоящее время становится все более очевидным, что повышение солеустойчивости растений во многом определяется факторами гормональной природы. В отличие от абсцизовой кислоты и этилена, механизмы стресс-протекторного действия стероидных фитогормонов (брассиностероидов), которые структурно подобны стероидным гормонам животных и насекомых, остаются в настоящее время практически не исследованными [6].

Вместе с тем брассиностероиды весьма перспективны для создания эффективных экологически безопасных регуляторов, повышающих урожайность растений в экстремальных условиях [7].

С тем, чтобы оценить эффект хлоридного засоления на рост растений на начальных этапах онтогенеза, нами были изучены интенсивность прорастания семян и ростовые показатели проростков рапса на фоне действия NaCl в широком диапазоне концентраций (от 25 до 200 мМ).

Стресс-протекторное действие брассиностероидов, различающихся по физиологической активности, исследовали в экспериментах по влиянию различных концентраций брассинолида, эпибрассинолида и гомобрассинолида на прорастание семян и морфогенез этиолированных проростков рапса в условиях хлоридного засоления.

Объект и методики исследования. Исследования проведены на проростках рапса *Brassica napus L.* сорта Вестар. Изучали действие разных концентраций NaCl (от 50 до 200 мМ) на прорастание семян и морфогенез проростков рапса в темноте. Процент проросших семян и ростовые показатели проростков (длина гипокотилиа и корня) анализировали по прошествии 3,5 и 7 суток от начала прорастания семян в условиях засоления. В качестве контроля использовали проростки в возрасте 3,5 и 7 суток, выращенные на дистиллированной воде в отсутствие освещения.

Для изучения влияния брассиностероидов на морфогенез проростков рапса при засолении семена проращивали на растворах следующих гормонов: эпибрассинолида (10^{-12} — 10^{-6} М), брассинолида (10^{-10} — 10^{-8} М) и гомобрассинолида (10^{-10} — 10^{-8} М).

Синтетические аналоги брассиностероидов (брассинолид, эпибрасинолид и гомобрассинолид) были любезно предоставлены чл.-корр. НАН Беларуси В.А. Хрипачем (лаборатория химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, Минск), за что авторы выражают ему искреннюю благодарность.

Длину гипокотилей и корней проростков рапса измеряли под лупой БМ-51-2 с точностью до 1 мм. Для каждого варианта брали пробы в 2—3-х биологических повторностях, каждая из которых содержала по 15 проростков. Эксперименты проводили не менее трех раз. Результаты экспериментов представлены на рис. 1—5 как средние арифметические и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение. Засоление ограничивает рост растений и снижает их продуктивность. Отрицательное воздействие засоления обусловлено низким осмотическим потенциалом почвенного раствора, токсичностью ионов и дисбалансом питательных компонентов [8].

Засоление нарушает физиолого-биохимические процессы (водный статус, ионный и окислительно-восстановительный гомеостаз, баланс фитогормонов, проницаемость мембран) и, как следствие, тормозит рост растений [9].

Наиболее губительный эффект NaCl оказывает на ранних этапах развития растений.

В данном исследовании показано, что хлоридное засоление значительно задерживало прорастание семян рапса (рис. 1).

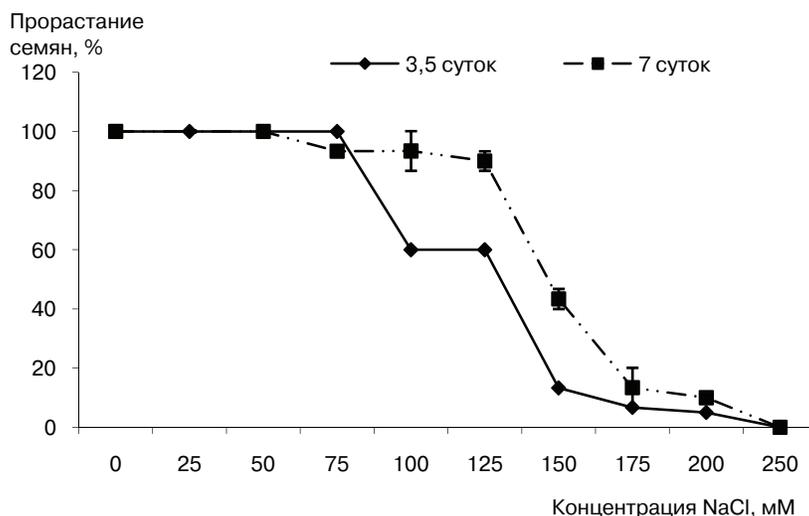


Рис. 1. Интенсивность прорастания семян рапса при засолении

Как следует из наших данных, подавление интенсивности прорастания семян на 60% наблюдалось через 3,5 суток воздействия при 100 и 125 мМ NaCl, тогда как через 7 суток действия тех же самых концентраций NaCl негативный эффект соли не обнаруживался.

Увеличение концентрации NaCl до 150 и 175 мМ снижало число проросших семян на 90% от контроля по прошествии 3,5 суток солевого воздействия и на 60 и 85% — на 7-е сутки воздействия соответственно (см. рис. 1).

Подобно влиянию на прорастание семян негативный эффект солевого шока (3,5 суток) на развитие проростков также был выражен значительно сильнее, чем длительное действие засоления (7 суток) (рис. 2, А и Б).

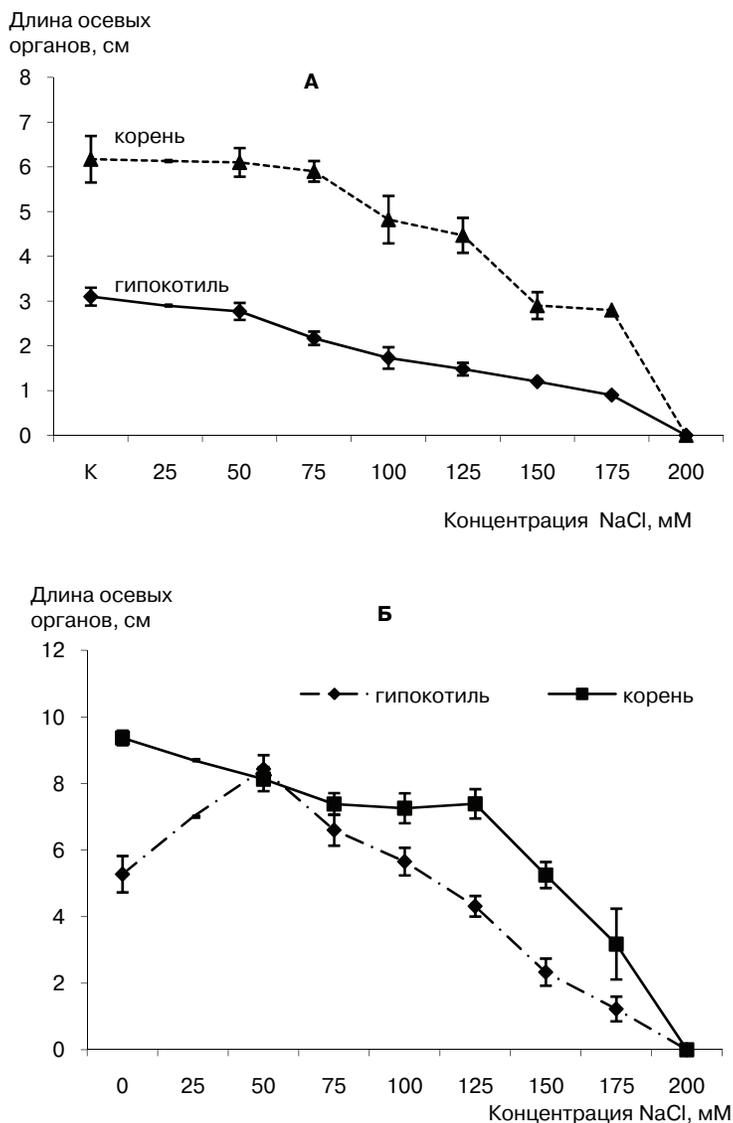


Рис. 2. Влияние засоления на ростовые показатели проростков рапса при продолжительности солевого воздействия 3,5 (А) и 7 (Б) суток

Представленные на рис. 2А данные показывают, что наибольшей чувствительностью к действию непродолжительного засоления отличался рост гипокотилей. Тенденция к ингибированию роста гипокотилей наблюдалась при 50 mM NaCl, достоверные же различия с контролем как для гипокотилей, так и для корней отмечались при 75 и 100 mM соответственно (рис. 2А).

При длительном воздействии низкие концентрации NaCl (50—75 mM) активировали удлинение гипокотыля на 30—60%, тогда как при 150 mM NaCl рост зародышевого стебля ингибировался в два раза (рис. 2Б).

В отличие от роста гипокотыля достоверное подавление роста корня обнаруживалось при всех анализируемых концентрациях соли.

Это означает, что при длительном засолении в первую очередь повреждается корневая система, и лишь затем — надземные органы. При этом процесс прорастания семян оказался достаточно резистентным к засолению. Отсюда следует заключение, что наличие соли в среде в первые 3,5 дня воздействия лишь замедляло процесс прорастания семян, а не вызывало их гибель.

Рапс представляет большой практический интерес как растение пищевого и технического назначения. Увеличение посевных площадей, занятых данной культурой, усиление интенсивности засоления этих площадей и относительно низкая солеустойчивость рапса делают целесообразным изучение путей повышения его устойчивости к хлоридному засолению.

Значительный интерес в качестве стресс-протектора растений при засолении представляют brassinosteroids [10, 11].

Наиболее активными представителями (среди 69 известных в настоящее время brassinosteroids) являются brassinolid, эпibrassinolid и гомобрassinolid [12—15].

На примере эпibrassinоида (ЭБЛ) нами было установлено положительное влияние данного гормона на ростовые показатели 7-суточных этиолированных проростков рапса (рис. 3).



Рис. 3. Влияние экзогенного эпibrassinоида на ростовые показатели проростков рапса

Высокую чувствительность к экзогенному ЭБЛ проявляли корни, рост которых стимулировался данным гормоном в диапазоне концентраций от 10^{-11} до 10^{-9} М, тогда как более высокие концентрации ЭБЛ (10^{-7} и 10^{-6} М) подавляли растяжение зародышевого корня.

В отличие от роста корня, рост гипокотилия в ответ на ЭБЛ изменялся незначительно: некоторая активация роста наблюдалось лишь при концентрациях гормона 10^{-7} и 10^{-6} М (см. рис. 3).

Результаты проведенных экспериментов по изучению влияния NaCl и эпибрасинолида на прорастание и рост проростков позволили определить диапазон анализируемых концентраций NaCl (150—250 мМ) и трех brassinosterоидов (10^{-10} — 10^{-8} М) — брасинолида (БЛ), эпибрасинолида (ЭБЛ) и гомобрасинолида (ГБЛ) — для исследования в последующих опытах потенциального стресс-протекторного действия гормонов.

Изучение прорастания семян при хлоридном засолении в присутствии brassinosterоидов показало, что гормоны повышали интенсивность прорастания семян при высокой концентрации NaCl (200 мМ). При этом наибольший стимулирующий эффект был отмечен для брасинолида, который полностью снимал ингибирующее действие соли на прорастание семян. Экзогенный гомобрасинолид (10^{-9} и 10^{-8} М) несколько активировал прорастание семян рапса при более интенсивном засолении (250 мМ NaCl) (рис. 4).

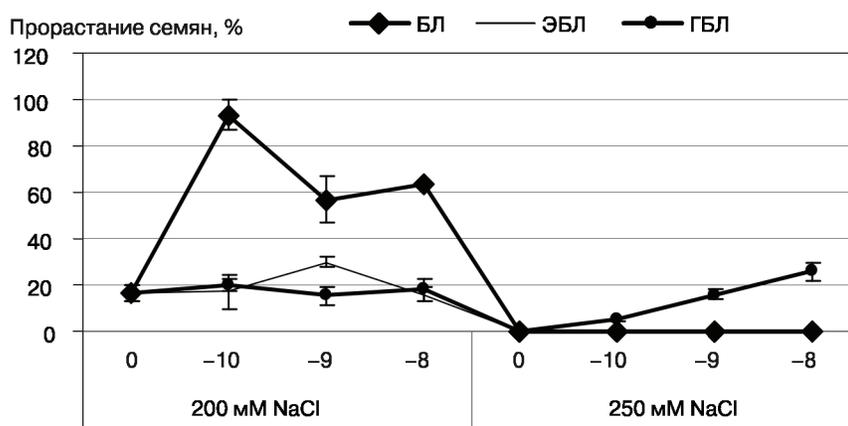


Рис. 4. Влияние экзогенных brassinosterоидов на интенсивность прорастания семян рапса при высоких концентрациях NaCl (на оси абсцисс представлены логарифмы концентраций гормонов в молях)

Brassinosterоиды оказывали солезащитный эффект не только на прорастание семян, но и рост осевых органов. Так, эпибрасинолид (10^{-10} и 10^{-9} М) демонстрировал высокую ростпротекторную активность при 150 мМ NaCl, что выражалось в частичном преодолении вызванного засолением ингибирования роста.

Существенно, что активация роста корня наблюдалась при самой низкой из использованных нами концентраций гормона (10^{-10} М) (рис. 5). Защитного действия эпибрасинолида при других, более высоких концентрациях NaCl (175, 200 и 250 мМ), в наших экспериментах обнаружено не было. Брасинолид и гомобрасинолид незначительно увеличивали ростовые показатели гипокотилей и корней при хлоридном засолении (данные не показаны).

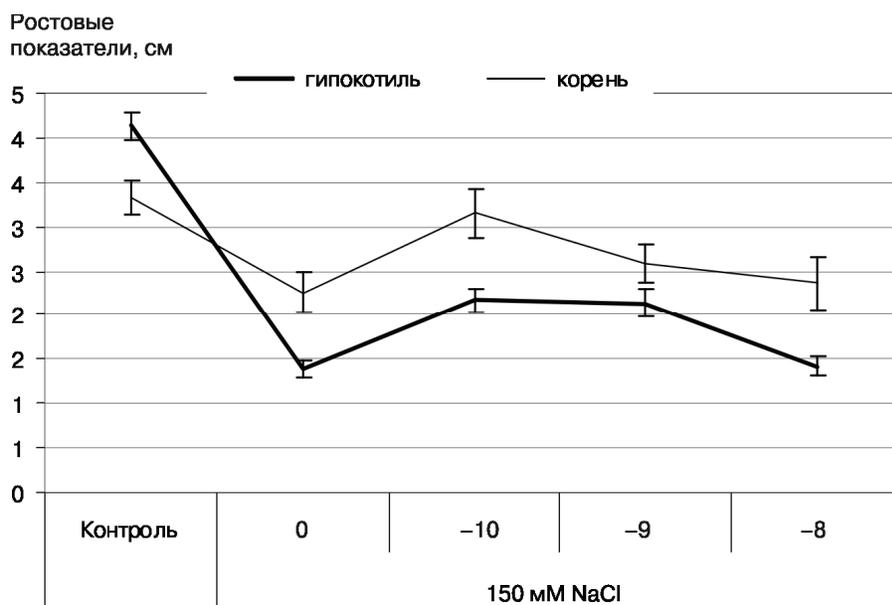


Рис. 5. Влияние экзогенного эпибрасинолида на ростовые показатели проростков рапса при засолении
(на оси абсцисс представлены логарифмы концентраций гормонов в молях)

Установленный в данной работе солезакщительный эффект brassinosterоидов на проростках рапса может быть обусловлен или способностью brassinosterоидов самостоятельно повышать стресс-устойчивость растений, или активировать синтез стрессорных фитогормонов, таких как этилен [16] и жасмоновая кислота [17], или стимулировать поступления кальция в цитозоль из «кальциевых депо» [18]. Известно, в частности, что экзогенный кальций в значительной мере снимает симптомы солевого стресса за счет снижения накопления ионов натрия и увеличения содержания ионов калия в корнях растений [19].

Таким образом, полученные нами экспериментальные результаты однозначно свидетельствуют о том, что процесс прорастания семян рапса более солеустойчив по сравнению с ростом корневой системы и гипокотыля. При этом реакция проростков рапса на различные концентрации соли в среде характеризовалась органоспецифичностью. Солевой шок (кратковременное действие NaCl) оказывает на проростки большее повреждающее воздействие, чем продолжительное засоление, что обусловлено формированием защитных механизмов в процессе адаптации проростков и повышением их солеустойчивости.

Продемонстрировано, что brassinosterоиды обладают стресс-защитным эффектом, повышая солеустойчивость процесса прорастания семян рапса и роста проростков в условиях хлоридного засоления.

Показана высокая солезакщительная активность брасинолида и гомобрасинолида на уровне прорастания семян, а эпибрасинолида — при снятии ингибирующего влияния соли на рост гипокотыля.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Pessarakli M., Szabolcs I. Soil salinity and sodicity as particular plant crop stress factors. — Handbook of plant and crop stress. — M. Pessarakli (ed.). — CRC Press Taylor & Francis Group. — P. 3—21.
- [2] FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. — Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service, 2005. URL: <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>
- [3] Kholodova V., Volkov K., Kuznetsov V.I. Plants under heavy metal stress in saline environments // Soil heavy metals. — Series “Soil Biology”. — 2010. — Vol. 19. — Heidelberg, Dordrecht, London New York: Springer-Verlag. — P. 163—183.
- [4] Гринин А.Л., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Сравнительный анализ физиологических механизмов солеустойчивости различных сортов горчицы // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия «Агрономия и животноводство». — 2010. — № 1. — С. 27—38.
- [5] Kuznetsov V.I., Shevyakova N.I. Polyamines and plant adaptation to saline environments. — Desert Plants. — Heidelberg, Dordrecht, London, New York: Springer-Verlag, 2010. — P. 261—298.
- [6] Gomes M.M.A. Physiological effects related to brassinosteroid application in plants. — Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone / S. Hayat, A. Ahmad (eds.). — Springer Science +Business Media B.V., 2011. — P. 193—242.
- [7] Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Karnachuk R.A. Chemical probes in biology. — Science at the interface of brassinosteroids: a new role of steroids as biosignaling molecules / M.P. Schneider (ed.). — Netherlands: Kluwer Academic Publishers. — NATO Science Series. — 2004. — Vol. 129. — P. 153—167.
- [8] Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance // Annu. Rev. Plant Biol. — 2008. — Vol. 59. — P. 651—681.
- [9] Guimarães F.V.A., de Lacerda C.F., Marques E.C., de Miranda M.R.A., de Abreu C.E.B., Prisco J.T., Gomes-Filho E. Calcium can moderate changes on membrane structure and lipid composition in cowpea plants under salt stress // Plant Growth Regul. — 2011. — Vol. 65. — P. 55—63.
- [10] Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses // Plant Physiology and Biochemistry. — 2009. — Vol. 47. — P. 1—8.
- [11] Houimli S.M., Denden M., Mouhandes B.D. Effects of 24-epibrassinolide on growth, chlorophyll, electrolyte leakage and proline by pepper plants under NaCl-stress // EurAsia J. BioSci. — 2010. — Vol. 4. — P. 96—104.
- [12] Bajguz A. Brassinosteroids — occurrence and chemical structures in plants. — Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone / S. Hayat, A. Ahmad (eds.). — Springer Science +Business Media B.V., 2011 — P. 1—28.
- [13] Ефимова М.В. Физиологическая роль brassinosterоидов в развитии проростков *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) на селективном свете // Вестник Томского государственного университета. — Биология. — 2010. — № 4 (12). — С. 106—116.
- [14] Ефимова М.В. Физиологическая роль brassinолида в развитии проростков *Arabidopsis thaliana* // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия «Агрономия и животноводство». — 2011. — № 2. — С. 39—46.
- [15] Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К., Барташевич Д.А. Карначук Р.А., Ковтун И.С., Кузнецов Вл.В. Особенности экспрессии пластидного генома и развития растений *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом brassinosterоидов // Физиология растений. — 2012. — Т. 59. — № 1. — С. 32—39.
- [16] Arteca R.N., Arteca J.M. Effects of brassinosteroid, auxin, and cytokinin on ethylene production in *Arabidopsis thaliana* plants // J. Exp. Botany. — 2008. — Vol. 59. — P. 3019—3026.

- [17] *Müssig C., Biesgen C., Lisso J., Uwer U., Weiler E., Altmann T.* A novel stress-inducible 12-oxo-phytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between brassinosteroid-action and jasmonic-acid synthesis // *J. Plant Physiol.* — 2000. — Vol. 17. — P. 143—152.
- [18] *Дубовская Л.В.* Метаболизм циклического гуанозин-3',5'-монофосфата в растительной клетке. Связь с процессами внутриклеточной сигнализации: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. — Минск, 2004.
- [19] *Li J., Wang X., Zhang Y., Jia H., Bi Y.* cGMP regulates hydrogen peroxide accumulation in calcium-dependent salt resistance pathway in *Arabidopsis thaliana* roots // *Planta.* — 2011. — Vol. 234. — P. 709—722.

THE INFLUENCE OF BRASSINOSTEROIDS IN RAPE SEED GERMINATION AND GROWTH ON EARLY STAGE OF ONTOGENESIS UNDER NaCl STRESS

M.V. Efimova^{1,3}, J. Hasan^{2,3}, V.P. Kholodova³,
Vl. V. Kuznetsov^{2,3}

¹Department of plant physiology and biotechnology
Tomsk State University
Lenin av., 36, Tomsk, Russia, 634050

²Department of botany, plant physiology and agrobiotechnology
Peoples' Friendship University of Russia
Miklucho-Maklay str., 8/2, Moscow, Russia, 117198

³Timirjazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science
Botanicheskaya str., 35, Moscow, Russia, 127276

The influence of different concentrations of NaCl (from 50 to 200 mM) on rape seedling germination and morphogenesis in darkness were investigated. It was supposed that protective effect of brassinosteroids under salt stress depended on the with ability of the phytohormones investigated to regulate contents of stress hormones or stress signal intermediates.

Key words: *Brassica napus L.*, chloride salinization, seeds germination, seedlings, growth parameters, brassinosteroids, brassinolide, epibrassinolide, homobrassinolide.