

УДК 573.6+577.17+581.1

СОДЕРЖАНИЕ И БАЛАНС ЭНДОГЕННЫХ БРАССИНОСТЕРОИДОВ
У МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ
ОРГАНОСПЕЦИФИЧНОСТЬЮ И СКОРОСПЕЛОСТЬЮ СОРТАМ. В. Ефимова^{1,*}, Р. П. Литвиновская², Ю. В. Медведева¹, О. К. Мурган¹,
А. Л. Савчук², член-корреспондент РАН Вл. В. Кузнецов^{1,3}, В. А. Хрипач^{1,2}

Поступило 03.12.2018 г.

Впервые показано, что профили brassinosterоидов (БС) в побегах и корнях растений картофеля являются органоспецифичными и зависят от скороспелости сорта. Установлено, что уровень всех анализируемых групп стероидных фитогормонов в корнях на порядок превышает их содержание в побегах, причём в корнях преобладают brassinosterоидные лактоны, а в побегах — их биогенетические предшественники, 6-кетоны. Скороспелость картофеля сорта Жуковский ранний характеризуется высоким содержанием в побегах практически всех групп БС, в первую очередь представителей группы brassinонида, и относительно высоким содержанием В-лактонов. Показано, что с возрастом у растений снижается содержание В-лактонов и увеличивается содержание В-кетонов.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., in vitro, ранне- и среднеспелые сорта, эндогенное содержание brassinosterоидов, brassинолид, 24-эпibrassinонилид, 28-гомобрassinонилид, лактон, кетон, органоспецифичность.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524851117-121>

Браassinosterоиды (БС), или стероидные фитогормоны, регулируют рост и развитие растений при сравнительно низких концентрациях [1]. Среди основных биологических функций БС можно отметить стимуляцию прорастания семян [2], усиление деления и растяжения клеток [3], регуляцию дифференцировки ксилемы и флоэмы [4], времени цветения, старения и светового развития растений, а также регуляцию экспрессии фотосинтетических генов [5]. Важным биологическим эффектом БС является их способность повышать устойчивость растений к биотическим [6] и абиотическим факторам [7, 8]. Возможно, полифункциональность БС опосредована высокой эффективностью функционирования транскрипционных факторов BZR1/BES1 через прямые и реципрокные взаимодействия с ключевыми регуляторами ответа на экзогенные и эндогенные факторы — DELLAs, PIFs, ARF6, PKL и JUB1 [9]. Перечисленные регуляторы контролируют экспрессию многочисленных генов, вовлечённых в метаболизм белков, мембранный транспорт, биосинтез

клеточной стенки, сигналинг, сборку цитоскелета и функционирование хроматина.

В основе структуры БС лежит 5 α -холестановый скелет, и их структурные различия обусловлены типом и положением функциональных групп в кольцах А/В и алкильных заместителей в боковой цепи. Условно природные БС, содержащие 2 α ,3 α - и 22R,23R-диольные группы, можно классифицировать в зависимости от характера функциональности в цикле В стероидной молекулы. Выделяют 7-окса-6-оксобрassinosterоиды (В-лактоны), 6-оксобрassinosterоиды (В-кетоны) и 6-дезоксобрassinosterоиды, не содержащие функциональности в цикле В (6-дезоксо-БС). В зависимости от типа заместителя при углеродном атоме С-24 боковой цепи различают 24R-метилбрассиностероиды (24R-метил-БС или группа 24-эпibrassinонилида), 24S-метилбрассиностероиды (24S-метил-БС или группа brassинолида) и 28-гомобрassinosterоиды (28-гомо-БС или группа 28-гомобрassinонилида). В настоящее время известно более 70 представителей класса БС, а содержание их в растениях составляет менее 10⁻⁵% [10, 11].

Регуляторное действие экзогенных БС во многом определяется видовой специфичностью растения и содержанием в нём эндогенных стероидных фитогормонов. Для создания эффективной технологии гормональной обработки растений в интересах

¹Национальный исследовательский
Томский государственный университет

²Институт биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси, Минск

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

*E-mail: stevmv555@gmail.com

аграрного производства представляются существенными не только знание органной локализации БС и оценка их химической структуры, но и выявление соотношения разных групп БС в ходе онтогенеза сельскохозяйственных культур, среди которых одной из важнейших является картофель. Подобные данные в настоящее время в литературе практически отсутствуют.

В настоящей работе мы впервые установили связь между сроками созревания картофеля и эндогенным содержанием разных групп БС в надземной и подземной частях растений, а также оценили возрастные изменения уровня БС и их соотношение у растений картофеля сорта Red Scarlett.

Работу проводили на растениях *Solanum tuberosum* L., различающихся сроками созревания: раннеспелые (Жуковский ранний и Red Scarlett) и среднеспелые (Луговской и Накра) сорта. Исходные оздоровлённые материнские микроклоны *S. tuberosum* были получены из Всероссийского научно-исследовательского института картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха. В дальнейшем провели потоковое клонирование растений-регенерантов дляработки нужного объёма исследуемого материала. Культивирование микрочеренков *in vitro* осуществляли на модифицированной агаризованной безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга (рН 5,8) с добавлением витаминов (тиамин, пиридоксин и никотиновая кислота — 1 мг/л) и сахарозы (30 мг/л). Продолжительность выращивания для сортов Жуковский и Луговской составила 23 сут, Red Scarlett — 23 и 37 сут, для сорта Накра — 30 сут. Эндогенный уровень стероидных гормонов определяли в побегах и корнях микроклонов картофеля, полученных из апикальной части побега (верхушечная почка с прилегающими к ней 2–3 листьями). Микроклоны выращивали под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora (“Osram”, Германия) при плотности потока квантов ФАР 200–250 мкмоль · м⁻² · с⁻¹ в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой 16 ± 2 °С.

Вирусная, виroidная и бактериальная инфекции широко распространены и вызывают сильное снижение продуктивности растений картофеля. В этой связи нам предстояло исключить вероятное влияние указанных выше биологических инфекций на функционирование генетического аппарата растений и их иммунитет, поскольку наличие инфекций приводит к изменению сортовых характеристик картофеля и в конечном итоге отражается на анализируемых показателях. Тем более ГОСТ 33996-2016 (<http://docs.cntd.ru/document/1200143601>) требует доказать

отсутствие инфекции в растениях картофеля. По этой причине мы провели предварительное тестирование микроклонов на наличие вирусной, виroidной и бактериальной инфекций. Присутствие вирусной нагрузки определяли с помощью ПЦР в реальном времени на ПЦР-амплификаторе Lightcycler’96 (“Roche”, Швейцария). Диагностику на наличие вирусной инфекции (X, Y, M, S, A и вирус скручиваемости листьев картофеля), виroidа веретеновидности клубней картофеля и бактериальной инфекции (бурой и кольцевой гнили картофеля) проводили с использованием коммерческих наборов реагентов ФИТОСКРИН (“Синтол”, Россия). Результаты показали отсутствие инфекции в тестируемых микроклонах картофеля используемых в эксперименте сортов (данные не представлены).

Для определения эндогенного уровня БС образцы картофеля (побеги и корни) фиксировали в жидком азоте и лиофильно высушивали. Лиофилизацию растительных образцов проводили под вакуумом с помощью сублимационной камеры VirTis 6211 (“LabX”, США). Лиофилизированные образцы взвешивали, измельчали, гомогенизировали в 3–5 мл буферного раствора (0,05 М трис, рН 7,4). Буферный экстракт центрифугировали в течение 20 мин на центрифуге BioSan LMC-4200R (“BioSan”, Латвия, 3000 об./мин). Полученный супернатант разводили и количественно анализировали в нём содержание стероидных гормонов группы брассинолида (24S-метил-БС), группы 24-эпибрассинолида (24-эпи-БС), группы 28-гомобрассинолида (28-гомо-БС), В-лактонов (В-лактон-БС) и В-кетонов (6-кето-БС) методом двухстадийного иммуноферментного анализа [12, 13].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

При исследовании микроклонов картофеля оценивали длину побега, объём корневой системы, количество междоузлий и суммарную площадь листовой поверхности микроклонов раннеспелых (Жуковский ранний и Red Scarlett) и среднеспелых (Луговской и Накра) сортов картофеля. Продолжительность культивирования микроклонов в условиях *in vitro* определялась их стадией развития, в частности числом междоузлий. Так, для растений картофеля сортов Жуковский, Red Scarlett и Луговской продолжительность культивирования составила 23 сут, а для сорта Накра — 30 сут, что было связано с его более медленным развитием. Число междоузлий (рис. 1) у растений варьировалось от 7 (сорт Red Scarlett) до 8 (остальные сорта). Максимальную

длину побега мы зарегистрировали у сорта Жуковский ранний, что в 1,5–2 раза превышало аналогичный показатель других сортов. Минимальный объём корневой системы и наименьшая площадь ассимилирующей поверхности были характерны для микроклонов картофеля сорта Red Scarlett. Растения картофеля этого сорта в возрасте 37 сут имели 12 междоузлий и самую большую площадь ассимилирующей поверхности, тогда как объём корневой системы растений сорта Red Scarlett был сопоставим с таковым корней растений других сортов с меньшим сроком культивирования (рис. 1).

Результаты исследования эндогенного содержания БС групп брассинолида (24S-метил-БС), 24-эпibrассинолида (24-эпи-БС), 28-гомобрассинолида (28-гомо-БС), В-лактонов (В-лактон-БС) и 6-кетонов (6-кето-БС) в побегах и корнях ранне- и среднеспелых сортов картофеля, полученные методом иммуноферментного анализа, представлены на рис. 2 и 3. Полученные результаты свидетельствовали прежде всего о том, что уровень всех анализируемых групп стероидных фитогормонов в корнях растений вне зависимости от срока созревания картофеля значительно превышал их содержание в побегах. Обращает на себя внимание тот факт, что в побегах растений отсутствовали (или находились за пределами чувствительности метода) БС группы 24-эпibrассинолида (рис. 2).

Анализируя внешний вид растения (рис. 1) и профиль БС в побегах картофеля (рис. 2), мы обнаружили, что сорт Жуковский ранний наряду с интенсивным развитием характеризовался высоким содержанием практически всех групп БС, особенно представителей группы брассинолида. Весьма ха-



Рис. 1. Внешний вид пробирочных растений *Solanum tuberosum*. Здесь и на рис. 2 и 3 (1) — Red Scarlett (возраст 23 сут), (2) — Red Scarlett (37 сут), (3) — Жуковский ранний (23 сут), (4) — Луговской (23 сут), (5) — Накра (30 сут).

рактерным признаком было также относительно высокое содержание в нём В-лактонов, представляющих заключительный этап биосинтеза гормонов, отличающихся высокой физиологической активностью и, вероятно, определяющих скороспелость сорта. По внешним признакам очень близки к нему были растения раннеспелого сорта картофеля Red Scarlett в возрасте 37 сут. Этот возраст был значительно выше, чем у других растений, а в профиле БС мы наблюдали очевидное преобладание БС-кетонов и рост количества БС ряда 28-гомобрассинолида. Из полученных данных можно сделать вывод, что на начальном этапе онтогенеза раннеспелые сорта характеризуются относительно высоким содержанием БС-лактонов и собственно брассинолида, уровни которых с возрастом снижались, изменяя соотношение в пользу БС-кетонов. Последнее, очевидно, связано со снижением скорости протекания стадии лактонизации в процессе биосинтеза гормонов и с относительным накоплением её исходных продуктов — В-кето-БС. Это особенно хорошо видно на примере сорта Red Scarlett, у которого с возрастом (от 23 до 37 сут) уменьшилось содержание БС-лактонов и увеличилось содержание БС-кетонов (рис. 2, 3).

Морфометрические показатели растений среднеспелых сортов — Луговской и Накра — были достаточно близки. При этом у побегов сорта Накра в профиле БС наблюдалось резкое увеличение содержания кетонов, что, по-видимому, определялось возрастным состоянием растений (рис. 2). Возможно, по этой же причине побеги растений сорта Накра были более развиты (рис. 1).

Профиль БС в корнях изученных растений значительно отличался от аналогичного профиля в побегах (рис. 3). Во-первых, его отличительной чертой было 6–7-кратное преобладание БС-лактонов над БС-кетонами (в меньшей степени это проявлялось лишь у сорта Накра). Во-вторых, у всех сортов мы обнаружили значительное превышение содержания БС группы 24-эпibrассинолида над представителями других групп БС (за исключением БС-лактонов).

У растений сорта Red Scarlett БС-профиль в корнях практически не зависел от возраста растений (от 23 до 37 сут): в возрасте 37 сут содержание 24-эпibrассинолида было ниже, но по-прежнему их уровень превышал содержание представителей других групп БС (рис. 3).

Содержание БС в растениях сорта Накра можно объяснить его особой селекцией. Во-первых, это сорт с высоким содержанием крахмала (18–22%, что на 4–8% выше стандарта), уровень которого, как

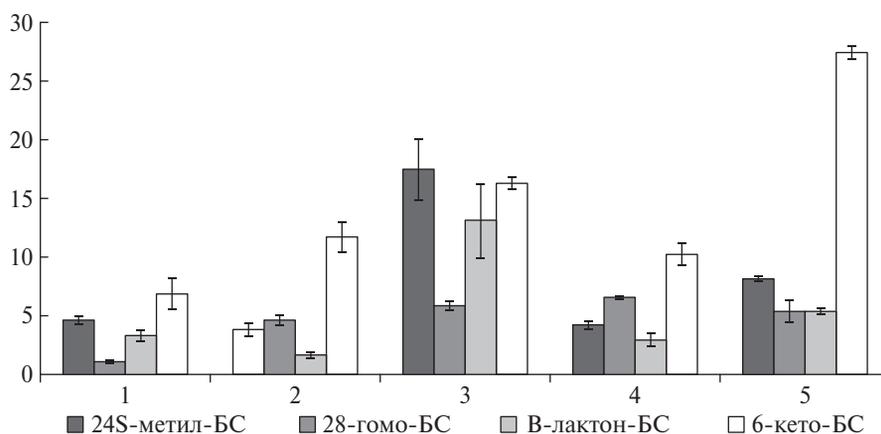


Рис. 2. Содержание эндогенных БС (нг/г лиофилизата) в побегах пробирочных растений картофеля. Здесь и на рис. 3 $M \pm 95\% CI$, $n = 3$.

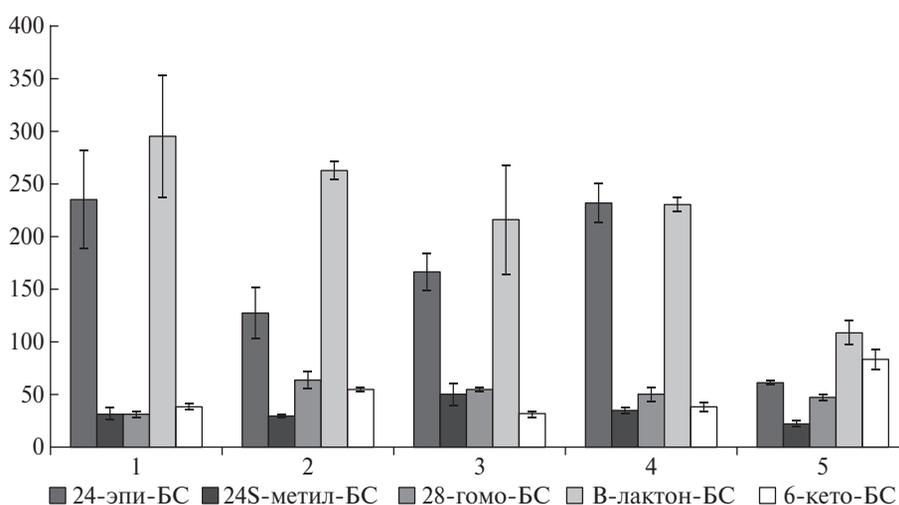


Рис. 3. Содержание эндогенных БС (нг/г лиофилизата) в корнях пробирочных растений картофеля.

известно [14], может регулироваться БС. Во-вторых, сорт Накра наиболее устойчив к некоторым расам фитофтороза, что также может быть связано с его особым БС-профилем [15].

Таким образом, исследование эндогенного уровня БС в корнях и побегах микроклонов картофеля *S. tuberosum* показало, что уровень всех анализируемых групп стероидных фитогормонов в корнях на порядок превышал их содержание в побегах, причём в побегах отсутствовали brassinosteroids группы 24-эпибрасинолида. В корнях преобладали brassinosteroidные В-лактоны, тогда как в побегах всех изученных сортов мы наблюдали значительное увеличение содержания В-кетон-БС. Скороспелость растений картофеля сорта Жуковский ранний характеризовалась высоким содержанием в побегах практически всех групп БС, в первую очередь представителей группы брасинолида, и относительно высоким содержанием В-лактонов. С увеличением возраста растений (сорт Red Scarlett) мы зарегистри-

ровали уменьшение содержания В-лактонов и увеличение содержания В-кетон-БС.

Полученные результаты расширяют представления о биологической роли разных групп БС, способствуют раскрытию механизмов их регулирующего и протекторного действия и предоставляют новые возможности для разработки рекомендаций по эффективному применению препаратов стероидных фитогормонов.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 16–16–04057.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khripach V.A., Zhabinskii V.N., de Groot A.* Brassinosteroids. A New Class of Plant Hormones. San Diego: Acad. Press, 1999. 456 p.
2. *Ali B.* // *Sci. Horticult.* 2017. V. 225. P. 15–21.
3. *Zhiponova M.K., Vanhoutte I., Boudolf V., Betti C., Dhondt S., Coppens F., Mylle E., Maes S., González-*

- García M.-P., Caño-Delgado A.I., Inzé D., Beemster G.T.S., De Veylder L.* // *New Phytol.* 2013. V. 197. P. 490–502.
4. *Saito M., Kondo Y., Fukuda H.* // *Plant Cell Physiology.* 2018. V. 59. P. 590–600.
5. *Efimova M.V., Vankova R., Kusnetsov V.V., Litvinovskaya R.P., Zlobin I.E., Dobrev P., Vedenicheva N.P., Sauchuk A.L., Karnachuk R.A., Kudryakova N.V., Kuznetsov V.V.* // *Steroids.* 2017. V. 120. P. 32–40.
6. *Song L.-X., Xu X.C., Wang F.-N., Wang Y., Xia X.-J., Shi K., Zhou Y.-H., Zhou J., Yu J.-Q.* // *Plant, Cell and Environ.* 2018. V. 41. P. 1113–1125.
7. *Ефимова М.В., Хрипач В.А., Бойко Е.В., Малофий М.К., Коломейчук Л.В., Мурган О.К., Видершпан А.Н., Мухаматдинова Е.А., Кузнецов В.В.* // *ДАН.* 2018. Т. 478. С. 723–726.
8. *Tanveer M., Shahzad B., Sharma A., Biju S., Bhardwaj R.* // *Plant Physiology and Biochemistry.* 2018. V. 130. P. 69–79.
9. *Li Q., Lu J., Yu J., Zhang Ch., He J., Liu Q.* // *BBA — Gene Regulatory Mechanisms.* 2018. V. 1861. P. 561–571.
10. *Khripach V., Zhabinskii V., De Groot A.* // *Ann. Bot.* 2000. V. 86. P. 441–447.
11. *Bajguz A.* *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone.* B.: Springer Science+Business Media B.V., 2011. P. 1–27.
12. *Pradko A.G., Litvinovskaya R.P., Sauchuk A.L., Drach S.V., Baranovsky A.V., Zhabinskii V.N., Mirantsova T.V., Khripach V.A.* // *Steroids.* 2015. V. 97. P. 78–86.
13. *Law B.* *Immunoassay. A Practical Guide.* Taylor & Francis e-Library. 2005. P. 133–192.
14. *Савельева Е.А., Карась И.И., Вакуленко В.В., Хрипач В.А., Жабинский В.Н., Литвиновская Р.П., Завадская М.И.* Пат. РФ № 3488 М.И. // *Оф. бюл.* 2000. № 3. С. 74.
15. *Савельева Е.А., Карась И.И., Кильчевский А.В., Титова С.Н., Хрипач В.А., Жабинский В.Н., Литвиновская Р.П., Завадская М.И.* Пат. РФ № 3400 // *Оф. бюл.* 2000. № 2. С. 75.

CONTENT AND BALANCE OF ENDOGENOUS BRASSINOSTEROIDS IN POTATO MICROCLONES IS DETERMINED BY THE ORGAN SPECIFICITY AND TERM OF RIPENING VARIETY

**M. V. Efimova, R. P. Litvinovskaya, Yu. V. Medvedeva, O. K. Murgan,
A. L. Sauchuk, Corresponding Member of the RAS V. V. Kuznetsov, V. A. Khripach**

Received December 03, 2018

The endogenous brassinosteroids content in the roots and shoots of early- and mid-season potato microclones was determined. Among the analyzed plant steroid hormones were representatives of brassinolide group, 24-epibrassinolide group, 28-homobrassinolide group, B-lactones and B-ketones. The level of all brassinosteroids in plant roots exceeded significantly that in shoots, irrespective of the potato term of ripening. Of interest is the fact that in plant shoots there were no BS groups of 24-epibrassinolide. We have first found a relationship between the terms of potato ripening and endogenous content of different BS groups in the aerial and underground plant parts; we have also assessed the age-related changes in the content of BSs, as well as their ratio in the potato plants of the Red Scarlett variety.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., in vitro, early and mid season varieties, endogenous brassinosteroid content, brassinolide, 24-epibrassinolide, 28-homobrassinolide, lactone, ketone, organ specificity.