

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

---

*На правах рукописи*



**МУРГАН**

**Ольга Константиновна**

**Сравнительное исследование физиологических механизмов защитного действия 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона у растений картофеля при солевом стрессе**

(1.5.21. Физиология и биохимия растений)

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель –  
кандидат биологических наук,  
доцент Ефимова Марина Васильевна

Томск – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Засоление как экологический фактор окружающей среды .....	13
1.1.1. Экологические аспекты возникновения засоленных территорий .....	14
1.1.2. Классификация растений по устойчивости к засолению .....	16
1.2. Физиологический ответ растений на действие засоления .....	18
1.2.1. Осмотический стресс.....	20
1.2.2. Нарушение клеточного ионного гомеостаза.....	23
1.2.3. Окислительный (вторичный) стресс.....	24
1.3. Роль brassinosterоидов в формировании защитных механизмов растений при солевом стрессе .....	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	31
2.1. Объект исследования .....	31
2.2. Методы исследования.....	31
2.2.1. Условия выращивания растений и постановки экспериментов .....	31
2.2.2. Морфометрические методы.....	37
2.2.2.1. Определение процентного содержания влаги в листьях, стебле и корнях растений.....	37
2.2.3. Биохимические методы со спектрофотометрией .....	37
2.2.3.1. Определение содержания основных фотосинтезирующих пигментов.....	37
2.2.3.2. Определение содержание свободного пролина .....	38
2.2.3.3. Определение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) .....	38
2.2.3.4. Определение активности антиоксидантных ферментов .....	39
2.2.3.5. Выделение общей ДНК, РНК и получение кДНК .....	40
2.2.3.6. Определение содержания эндогенных brassinosterоидов.....	41

2.2.4 Биофизические методы .....	42
2.2.4.1. Определение содержания неорганических ионов в тканях растений.....	42
2.2.4.2. Определение осмотического потенциала .....	42
2.2.4.3. Определение параметров фотохимической активности фотосистемы II....	42
2.2.4.4. Электрофорез РНК в агарозном геле.....	43
2.2.4.5. Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	43
2.2.5 Статистический анализ .....	44
3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	45
3.1. Анализ эндогенного содержания различных групп фитостероидов и влияние 24-эпибрасинолида и 24-эпикастастерона на физиологические процессы растений картофеля в культуре <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .....	45
3.1.1 Определение эндогенного содержания различных групп брассиностероидов в растениях картофеля .....	45
3.1.2. Влияние длительного воздействия брассиностероидов на ростовые процессы растений картофеля в культуре <i>in vitro</i> .....	49
3.1.3. Воздействие длительной обработки растений картофеля в культуре <i>in vitro</i> ЭБЛ и ЭПК на содержание пигментов, функционирование фотосистемы II и другие физиологические параметры .....	53
3.1.4. Влияние кратковременного действия 24-эпибрасинолида и 24-эпикастастерона на ростовые процессы растений картофеля в культуре <i>in vivo</i> .....	63
3.1.5. Влияние кратковременной обработки растений картофеля ЭБЛ и ЭПК в культуре <i>in vivo</i> на экспрессию генов биосинтеза БС.....	69
3.1.6. Влияние кратковременного воздействия ЭБЛ и ЭПК на содержание пигментов, эффективность фотосистемы II, активность антиоксидантных ферментов и другие физиологические параметры растений картофеля в культуре <i>in vitro</i> .....	70
3.2. Исследование физиологических ответных реакций растений картофеля на хлоридное засоление в динамике .....	77

3.2.1. Влияние различной продолжительности хлоридного засоления на ростовые процессы у растений картофеля.....	77
3.2.2. Влияние хлоридного засоления на накопление пигментов, функционирование фотосистемы II, содержание неорганических ионов и другие физиологические процессы у растений картофеля в динамике .....	82
3.2.3. Действие хлоридного засоления на уровень транскриптов стресс-протекторных генов растений картофеля во времени .....	92
3.3 Влияние brassinosterоидов на растения при последующем засолении (75 и 150 мМ NaCl).....	96
3.3.1 Защитное действие ЭБЛ и ЭПК на рост растений картофеля при длительной обработке и последующем засолении.....	96
3.3.2 Влияние длительного воздействия ЭБЛ и ЭПК в культуре <i>in vitro</i> на содержание пролина и пигментов, ионный гомеостаз и функционирование фотосистемы II и другие физиологические параметры растений картофеля при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ) .....	103
3.3.3 Защитное действие кратковременной обработки brassinosterоидов на рост растений картофеля при последующем засолении.....	122
3.3.4 Влияние кратковременного воздействия ЭБЛ и ЭПК в культуре <i>in vivo</i> на активность антиоксидантных ферментов, ионный гомеостаз, степень перекисного окисления липидов и другие физиологические параметры растений картофеля при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ) .....	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	138
ВЫВОДЫ .....	144
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	146

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АПО – Аскорбатпероксидаза;

АФК – Активные формы кислорода;

БС – Брассиностероиды;

ГБЛ – 28-гомобрассинолид;

ГПО – Гваяколзависимая пероксидаза;

Кетон-БС – кетонсодержащие брассиностероиды;

Лактон-БС – лактонсодержащие брассиностероиды;

СОД – Супероксиддисмутаза;

ТБК – Тиобарбитуровая кислота;

ТБК-АП – ТБК-активные продукты;

ТХУ – Трихлоруксусная кислота;

ПОЛ – Перекисное окисление липидов;

ЭБЛ – 24-эпибрассинолид;

ЭПК – 24-эпикастастерон.

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Площадь земель, доступных для сельского хозяйства, сокращается. Возможными причинами могут быть как глобальные – изменение климата, так и локальные – нарушение режимов орошения и использование воды низкого качества, приводящие к засолению пахотных территорий (Welle, Mauter, 2017). Выращивание сельскохозяйственных культур на засоленных территориях приводит к снижению продуктивности, что, в свою очередь, сопровождается серьезными экономическими потерями (FAO, 2005; Grieve, Grattan, 2012; Ефимова и др., 2014).

В рамках данной проблемы необходимо исследовать физиологию стресс-толерантности сельскохозяйственных культур и разработать новые технологии и препараты для развития устойчивого растениеводства в неблагоприятных условиях окружающей среды, таких как засоление. Одним из способов защиты растений от избыточной концентрации солей может быть обработка их брассиностероидами (БС), обладающими рядом преимуществ перед другими гормонами. Данные соединения хорошо себя зарекомендовали как регуляторы роста и устойчивости растений (Efimova *et al.*, 2018a). Известно, что физиологический эффект брассиностероидов характеризуется высокой степенью вариабельности и зависит от химической структуры гормона, его концентрации, продолжительности воздействия и способа обработки растений (Khripach *et al.*, 2003; Efimova *et al.*, 2018a; Siddiqui *et al.*, 2018a; Tanveer *et al.*, 2018; Sytar *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Коломейчук, 2020). Протекторное влияние брассиностероидов на растения проявляется в микро- и наномолярных концентрациях, что обеспечивает экономическую эффективность при использовании препаратов на их основе (Khripach *et al.*, 2000). Некоторые лактонсодержащие брассиностероиды (лактон-БС), 24-эпибрассинолид (ЭБЛ) и 28-гомобрассинолид (ГБЛ), уже входят в состав запатентованных препаратов сельскохозяйственного назначения (Аутко и др., 2010, Хрипач и др., 2015). Кетонсодержащие (кетон-БС) брассиностероиды, такие как

кастастерон, 24-эпикастастерон (ЭПК) и другие менее изучены (Bondarenko *et al.*, 2017, Kovtun *et al.*, 2021; Kolomeichuk *et al.*, 2021).

Исследование длительного воздействия БС на растения картофеля в условиях гидропонного выращивания проблематично из-за стимулирования гормоном развития неблагоприятной микрофлоры. На сегодняшний день имеются работы, направленные на оценку морфофизиологических ответных реакций растений при продолжительном воздействии БС в культуре *in vitro* в отсутствие стрессора или в условиях действия абиотического стресса (Verma *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2016). Однако до сих пор не известно, существует ли ростостимулирующий или защитный эффект при длительном влиянии БС на растения в культуре *in vitro* с последующим переносом картофеля в оптимальные или стрессовые условия произрастания.

Исследование механизмов защитного действия brassinosterоидов, в частности, 24-эпибрассинолида (лактон-БС) и 24-эпикастестерона (кетон-БС) на растениях картофеля на разных стадиях онтогенеза (растениях-регенерантах и 14-суточных проростках) в условиях последующего хлоридного засоления открывает широкие перспективы для разработки технологий выращивания сельскохозяйственных культур на полях, непригодных для земледелия, и позволяет получить фундаментальные знания по изучению механизмов памяти растений.

В качестве объекта исследования использовали растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Луговской. Данная культура является четвёртой по урожайности сельскохозяйственной культурой и вторым по значимости продуктом растениеводства в Российской Федерации (FAO, 2008). Однако доля семенного картофеля, получаемого внутри страны, составляет около 10% (Агроинвестр, 2020), что свидетельствует о необходимости получения новых сортов и исследования уже имеющихся для улучшения их морфофизиологических характеристик и повышения устойчивости к действию стрессоров.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы заключалась в изучении физиологических механизмов протекторного действия лактон- (24-

эпибрасинолида) и кетонсодержащих (24-эпикастестерона) brassinosterоидов на растениях картофеля при последующем солевом стрессе. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Показать влияние brassinosterоидов различной химической структуры (24-эпибрасинолида и 24-эпикастестерона) на физиологические процессы у растений картофеля при длительной (в культуре *in vitro*) и кратковременной (в культуре *in vivo*) экспозиции;

2. Исследовать ответные реакции растений картофеля при хлоридном засолении на уровне морфофизиологических показателей и экспрессии стресс-регулируемых генов в суточной динамике;

3. Сравнить физиологические механизмы защитного действия brassinosterоидов различной химической структуры на растениях картофеля при последующем хлоридном засолении, в зависимости от способа внесения фитогормонов (в культуре *in vitro* или *in vivo*).

**Научная новизна.** Впервые определено эндогенное содержание brassinosterоидов в микроклонах растений картофеля и показано, что суммарное количество лактон- и кетонсодержащих БС в целых микроклонах, полученных из боковых почек, практически не различается. В работе впервые обнаружено, что влияние разных по структуре БС (лактон- и кетон-БС в концентрации 10 или 1000 нМ) на морфофизиологические характеристики сохраняется через 19 суток после прекращения воздействия фитогормонов. Впервые охарактеризованы ростовые реакции растений картофеля в зависимости от химической структуры, концентрации и продолжительности действия БС. Показано, что лактонсодержащий brassinosterоид более активен, чем его кетонсодержащий аналог. Возможно, именно по этой причине, увеличение концентрации либо продолжительности воздействия лактонсодержащего brassinosterоида наблюдается его ингибирующий эффект, к примеру, на рост (при кратковременной и длительной обработке) или целостность мембран (при длительном воздействии).



Также продемонстрировано влияние хлорида натрия в широком диапазоне концентраций (50-200 мМ) на морфофизиологические параметры растений картофеля, как в суточной, так и часовой динамике. Показана регуляция накопления транскриптов стресс-регулируемых генов на фоне хлоридного засоления в суточной динамике.

Отмечено протекторное действие ЭБЛ на рост побега, и ЭПК на сохранение сырой массы при последующем хлоридном засолении. Показано регуляторное действие brassinosteroidов на содержание пролина при последующем хлоридном засолении (150 мМ), которое определялось химической структурой, концентрацией и продолжительностью воздействия. Длительная обработка растений ЭБЛ при последующем хлоридном засолении поддерживала высокий уровень экспрессии гена *CHS1a*, в то время как ЭПК увеличивал уровень транскриптов гена *NHX3*. Кратковременное воздействие гормонов напротив, вызывало снижение уровня транскриптов *NHX3* в ответ на действие ЭПК, и значительное повышение транскриптов гена *APX3*, что согласуется с данными об антиоксидантном статусе растений.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные в работе данные позволяют предложить новые технологии обработки растений brassinosteroidами разной химической структуры с целью повышения продуктивности важнейших сельскохозяйственных культур, в том числе, произрастающих на засоленных территориях.

Совокупность полученных экспериментальных данных и сделанные на их основе теоретические обобщения могут использоваться в лекционных и практических курсах «Физиология растений», «Биохимия», «Гормональная регуляция и сигнальные системы высших растений», «Физиологические основы устойчивости растений к факторам среды», «Экологическая физиология растений» и «Сигнальные системы высших растений» для бакалавров и магистрантов ВУЗов страны.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. 24-эпибрассинолид в большей степени, чем 24-эпикастастерон способствует сохранению водоудерживающей способности тканей растений картофеля (сорта Луговской) как при длительном, так и при кратковременном воздействии фитогормонов в контрольных условиях и при отложенном действии стрессора, что в свою очередь проявляется в большем накоплении осмопротекторов и в поддержании осмотического потенциала при солевом стрессе.

2. Оба сравниваемых фитогормона вовлекаются в регуляцию фотохимической активности фотосистемы II в норме и при солевом стрессе. При этом 24-эпикастастерон, в отличие от 24-эпибрассинолида, повышает накопление каротиноидов при длительном (10 нМ) и хлорофилла *a* - при кратковременном воздействии в отсутствии засоления.

3. Сравнимые брассиностероиды регулировали перекисное окисление липидов и активность антиоксидантных ферментов. Физиологический эффект гормонов зависит от используемой концентрации, продолжительности воздействия и структуры гормонов.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на IX Съезде общества физиологов растений России и Всероссийской школе для молодых ученых «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019 г.), на Международном биотехнологическом Форуме-выставке «РосБиоТех-2022» (Москва, 2022 г.), и на конференциях: Всероссийской научной конференции с международным участием "Физиология растений и феномика как основа современных фитобиотехнологий" (Нижний Новгород, 2022 г.), Всероссийской научной конференции «Физиология, биотехнология и биоинформатика растений и микроорганизмов – путь в будущее: к 85-летию Р.А. Карначук» (Томск, 2022 г.), 5-й и 6-й Международных научных конференциях «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (PlantGen2019, PlantGen2021) (Новосибирск, 2019, 2021 гг.); Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием «Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2018 г.).

**Публикации.** По материалам исследования опубликовано 27 печатных работ, в том числе 8 статей, входящих в базу цитирования ВАК, Scopus и /или Web of Science, и 17 – в РИНЦ. Получено 2 патента, подтверждающих интеллектуальную собственность.

**Гранты.** Исследование является продолжением магистерской работы и поддержано проектами: (1) РНФ 16-16-04057 "Физиологические механизмы регуляции стресс-устойчивости растений картофеля светом и брассиностероидами", (2) РНФ 23-44-10019 "Стероидные фитогормоны и их новые производные - природный нанобиотехнологический инструмент для высокопродуктивного экологического земледелия", (3) РФФИ 17-54-61016 Египет\_а "Протекторный эффект брассиностероидов и жасминовой кислоты при адаптации растений картофеля (*Solanum tuberosum*) к условиям солевого стресса и механическим повреждениям", (4) РФФИ 20-34-90094 Аспиранты "Влияние брассиностероидов на развитие растений картофеля в оптимальных условиях и при хлоридном засолении", (5) РФФИ 20-54-00013 Бел\_а "Стероидные фитогормоны как фактор защиты растений от полиметаллического стресса"; программами развития Томского государственного университета «Приоритет 2030» (6) «Физиологические и молекулярные механизмы индуцированного фитогормонами прайминга растений при хлоридном засолении», (7) «Фотосинтетические и молекулярные механизмы защитного действия мелатонина при солевом стрессе», (8) «Геномное редактирование как инновационная технология управления механизмами стресс-толерантности и повышения продуктивности растений в условиях неблагоприятных изменений природной среды и климата».

**Личный вклад соискателя.** Работа выполнена на кафедре физиологии растений, биотехнологии и биоинформатики Национального исследовательского Томского государственного университета, г. Томск, в лаборатории экспрессии

генома и лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (ИФР РАН), г. Москва. Из исследований, проведенных в соавторстве с коллегами, в исследовательскую работу включены и вынесены на защиту только те результаты, в получении которых автору принадлежит определяющая роль.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность коллективу лаборатории молекулярной биологии и биохимии и кафедры физиологии, биотехнологии растений и биоинформатики ТГУ и их заведующей – д.б.н., профессору Ольге Викторовне Карначук. Автор выражает искреннюю признательность коллективам лаборатории экспрессии генома и лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации ИФР РАН за методическую помощь в процессе выполнения работы и полезное обсуждение в ходе написания диссертации. Отдельно автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю – к.б.н., доценту Марине Васильевне Ефимовой за всестороннюю помощь в выполнении данной работы, анализе и обсуждении результатов. Автор выражает особую благодарность Медведевой Ю.В. за предоставление микрклонов растений; Глуховой Л.Б., Даниловой М.Н., Злобину И.Е. за помощь в освоении методов молекулярной биологии. Отдельная благодарность сотрудникам Института биоорганической химии НАН Беларуси: академику НАН Беларуси Владимиру Александровичу Хрипачу за предоставленные препараты brassinosteroidов и д.х.н. Раисе Павловне Литвиновской за проведение иммуноферментного анализа эндогенного содержания brassinosteroidов у растений-регенерантов картофеля.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Засоление как экологический фактор окружающей среды

Экологические факторы окружающей среды по происхождению условно можно разделить на природные и антропогенные (Kumar *et al.*, 2023; Домрачева и др., 2022); по физической природе - на абиотические и биотические. Под биотическими факторами подразумевают живые организмы, а под абиотическими – низкие и высокие температуры, засуху, избыточное засоление, соли тяжелых металлов, химический состав почв и др. (Dewi *et al.*, 2021).

При антропогенной нагрузке (подъёме грунтовых вод при нефтедобыче, неправильном орошении) и действии ряда абиотических (выветривание материнских пород и др.) факторов происходит деградация почв (Недбаев и Елсукова, 2021; Stavi *et al.*, 2021), в результате чего наблюдается аккумуляция ионов легкорастворимых солей ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , и др.) (Stavi *et al.*, 2021). Почвы считаются засоленными при накоплении в корнеобитаемом слое почвы 0.05-0.15% суммы токсичных солей, полученных методом водных вытяжек, или при содержании в 1 литре почвенного раствора более 3 грамм солей, или при удельной электропроводности (ЕС) фильтратов из насыщенных водой почвенных паст в 2-4 мСм/см (Варгас и др., 2017).

Площади загрязненных земель постоянно увеличиваются, как в России, так и во всём мире. Обширные территории засоленных почв встречаются на западе США, в Средней Азии и на юге Казахстана. Согласно государственному (национальному) докладу о состоянии и использовании земель в Российской Федерации на 2015 год, в структуре сельскохозяйственных угодий площадь пашни составляла 122.8 млн. га, из них более 20% – засоленные и солонцеватые (Росреестр, 2015). По результатам одного из последних мониторингов ФАО, в 2021 году была составлена карта засоленных почв для 118 стран (примерно 73% почвенных ресурсов Земли) (ФАО, 2021). Отмечено загрязнение 424 млн. га почвы

на глубине от 0 до 30 см и 833 млн. га на глубине от 30 до 100 см (Katarzyna *et al.*, 2022).

#### 1.1.1. Экологические аспекты возникновения засоленных территорий

По способу возникновения засоленных территорий различают два типа засоления: первичное и вторичное.

При первичном засолении, его также называют естественным, растворимые соли выветриваются из родительской породы и с грунтовыми водами поднимаются к верхним слоям почвы. Также в почву могут поступать соли по ветру от солончаков или от разбрызгивания морской воды.

К абиотическим факторам, обуславливающим засоление почв, относят климат, рельеф, дренированность территории, засоленность почвообразующих и подстилающих пород и наличие минерализованных грунтовых вод. Так, в районах, где для климата характерно большое количество атмосферных осадков, соли обычно вымываются в нижележащие слои почвы и уносятся подпочвенными грунтовыми водами в моря или океаны. Однако, в районах с недостаточным количеством атмосферных осадков, соли могут накапливаться на поверхности почвы. В нижележащих равнинных районах легкорастворимые соли концентрируются не только в верхних слоях почвы, но и в подпочвенных грунтовых водах. Значительное превышение расхода воды над ее поступлением и затрудненность стока наземных и подземных вод являются основной причиной возникновения засоления почвы. Вследствие этого, последнее наиболее широко распространено в полупустынях и пустынях (Stavi *et al.*, 2021).

Вторичное засоление почв – это почти всегда результат неправильного режима орошения в растениеводстве. Оно возникает в результате избыточных поливов, которые повышают уровень соленых грунтовых вод. Другой причиной, вызывающей развитие вторичного засоления почв, является применение оросительных вод повышенной минерализации, а также техногенное загрязнение территории минерализованными буровыми и сточными водами (Blaylock, 1994; Иванов и др., 2008). По данным ФАО, во всем мире процессам вторичного

засоления и осолонцевания подвержено около 30% всех орошаемых земель (FAO, 2005).

Классификация почв с признаками засоления основана на разделении по глубине залегания легкорастворимых солей. В отечественных системах классификации выделяют: солончаковые (соли на глубине 0–30 см), солончаковатые (соли на глубине 30–100 см) и глубокосолончаковатые (соли на глубине 100–200 см) виды разных почв. В западных системах границами служат 0.5 и 1 м (Pankova *et al.*, 2018).

В зависимости от свойств почв и концентрации присутствующих в них солей, засоленные почвы подразделяют на три группы:

1. Засоленные (или солончаки) почвы характеризуются высоким содержанием катионов кальция, магния, натрия, а также сульфат-, хлорид- и нитрат-анионов. Данные почвы имеют белую соленую корку на поверхности, хорошую проницаемость для воды и воздуха, pH ниже 8.5. В основном, встречаются в засушливых или полузасушливых регионах, где мало осадков и высокая скорость испарения.

2. Натриевые почвы (щелочные почвы или солонцы) содержат больше ионов натрия по сравнению с ионами кальция и магния. В составе данной группы почв преобладают соли карбоната натрия и бикарбоната натрия, что приводит к увеличению значений pH до 8.5–10.0. Также натриевым почвам характерен черный цвет и плохая проницаемость для воды и воздуха.

3. Солёно-щелочные почвы являются переходными между солончаками и солонцами с pH превышающим 8.5. Данная группа почв, образована в результате сочетанных процессов засоления и ощелачивания, в результате чего они превращаются в натриевые (Kumar, Sharma, 2020; Stavi *et al.*, 2021).

Фильтраты, полученные при насыщении почв влагой, также могут стать основанием для классификации. Концентрация солей в воде, извлеченной из насыщенной почвы, определяет соленость этой почвы. Выделяют четыре градации засоления (Brouwer *et al.*, 1985):

1. Отсутствие засоления, при 0-3 г/л солей в фильтрате;
2. Слабосоленый фильтрат, при 3-6 г/л;
3. Среднесоленый – 6-12 г/л;
4. Сильносоленый фильтрат содержит более 12 г/л солей.

Засоление территорий происходит повсеместно, что неблагоприятно отображается на экологических и экономических показателях многих стран. Данная проблема является глобальной для всего мира, в связи с чем, распространение засоления подробно исследуют страны, входящие в состав ФАО (Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций), среди них и Российская Федерация.

#### 1.1.2. Классификация растений по устойчивости к засолению

Избыточное хлоридное засоление оказывает негативный эффект на рост и развитие растений, что, в конечном итоге, отражается на их продуктивности и приводит к значительным экономическим потерям (Stavi *et al.*, 2021).

Прикреплённый образ жизни растений, произрастающих на засоленных территориях, способствует формированию конститутивных механизмов, обуславливающих их солеустойчивость. В зависимости от условий обитания, все растения принято условно подразделять на две большие экологические группы:

1. гликофиты – растения пресных местообитаний, испытывающие нарушение метаболизма и физиологических процессов при содержании солей натрия более 0.01%. На долю гликофитов приходится 98% всей наземной флоры. В их число также входит большинство растений сельскохозяйственного назначения.

Урожайность сельскохозяйственных культур во многом зависит от степени засоления почвы. Солеустойчивость культур определяется порогом электропроводности, при котором наблюдается начальное значительное снижение урожайности и процентом ожидаемого снижения урожайности на единицу увеличения засоления над пороговым значением (Grieve, Grattan, 2012).



Изначально, данную классификацию предложили Maas и Hoffman (1977). Позднее они расширили свою классификацию; последняя версия вошла в доклад FAO (Tanji, Kielen, 2002). В Таблице 1 приведён фрагмент классификации для некоторых культур семейства *Solanaceae* и *Brassicaceae*.

Почти одновременно с ними, в 2000 году Katerji с соавторами предложили усовершенствованную классификацию солеустойчивости культур на примере дневного индекса водного стресса. Согласно этому показателю, кукуруза, подсолнечник и картофель были включены в перечень устойчивых к засолению видов (Katerji *et al.*, 2000).

Таблица 1. Солеустойчивость сельскохозяйственных культур (Tanji, Kielen, 2002)

Наименование культуры	Солеустойчивость
<i>Brassica oleracea</i> L. (Botrytis Group)	Умеренно чувствительная
<i>B. oleracea</i> L. (Gemmifera Group)	Умеренно чувствительная
<i>B. oleracea</i> L. (Capitata Group)	Умеренно чувствительная
<i>Brassica oleracea</i> L. (Botrytis Group)	Умеренно чувствительная
<i>Solanum melongena</i> L. var <i>esculentum</i> Nees.	Умеренно чувствительная
<i>Brassica oleracea</i> L. (Acephala Group)	Умеренно чувствительная
<i>Brassica oleracea</i> L. (Gongylodes Group)	Умеренно чувствительная
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Умеренно чувствительная
<i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.) Karst. ex Farw. [syn. <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.]	Умеренно чувствительная
<i>L. lycopersicum</i> var. <i>Cerasiforme</i> (Dunal) Alef.	Умеренно чувствительная
<i>Brassica rapa</i> L. (Rapifera Group)	Умеренно чувствительная / Умеренно устойчивая

2. галофиты (греч. *galas* – соль, *phyton* – растение) – растения, способные не только выживать при высоком содержании солей в почве (до 20%), но и успешно завершать свой онтогенез.

Возможно, галофиты обладают более высоким уровнем экспрессии генов или активности ферментов, вовлеченных в механизм устойчивости к засолению, по

сравнению с гликофитами (Himabindu *et al.*, 2016; Mishra, Tanna, 2017). Исследование галофитов позволяет выявить важнейшие механизмы солеустойчивости, которые были сформированы в процессе эволюции. В зависимости от морфофизиологических особенностей и путей адаптации к засолению различают несколько групп галофитов – эугалофиты, криногалофиты, гликогалофиты, псевдогалофиты и галомезофиты (Слонов, 1997). Существуют и другие классификации галофитов: а) условная – солеаккумулирующие, соленепропускающие и солевыводящие, и б) по Cushman (2001) – облигатные, факультативные и безразличные галофиты.

Имеется ряд доказательств того, что все растения характеризуются сходными механизмами регуляции солеустойчивости, а различия между галофитами и гликофитами скорее количественные, а не качественные (Bartels, Dinakar, 2013; Shabala, Pottosin, 2014; Mishra, Tanna, 2017).

## 1.2. Физиологический ответ растений на действие засоления

В силу прикрепленного образа жизни в растениях сформировались комплексы защитных механизмов, направленные на избегание или адаптацию растений к изменяющимся условиям окружающей среды. Поэтому, как у гликофитов, так и у галофитов, данные механизмы направлены на «нейтрализацию» повреждающего действия избыточного засоления.

Для выявления защитных механизмов, в первую очередь, необходимо определить негативное действие хлорида натрия на морфофизиологическое состояние растений. Интенсивное засоление влияет на протекание всех основных физиологических процессов у растений. В первую очередь, негативное действие высоких концентраций соли вызывает нарушение осмотического статуса и ионного гомеостаза растений, следствием чего является проявление токсического действия неорганических ионов на клеточный метаболизм (Munns, Tester, 2008). Помимо этого, засоление вызывает генерацию активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса. АФК приводят к инактивации ферментов, повреждению

белков и нуклеиновых кислот, нарушению функционирования мембран. В зависимости от степени засоления данные физиологические реакции могут отличаться как направленностью, так и степенью выраженности (Jaarsma *et al.*, 2013; Harb *et al.*, 2017; Efimova *et al.*, 2018b; Derkaoui *et al.*, 2022).

Резкое понижение водного потенциала почвенного раствора в условиях засоления приводит к снижению способности клеток корня поглощать воду и к падению тургора. Наличие влаги в клетках листьев необходимо не только для осуществления фотосинтеза – ключевого процесса растений, но и остальных физиологических процессов. Поступление влаги от корней к фотосинтезирующим тканям происходит за счёт процессов транспирации, которые регулируются, в том числе, величиной осмотического потенциала. Снижение способности поглощать и транспортировать влагу приводит к нарушению водного баланса и, как следствие, к развитию осмотического стресса уже в первые сутки действия засоления (Munns, Tester, 2008; Kolomeichuk *et al.*, 2020). Инициация и развитие осмотического и окислительного стрессов вызывает повреждение структуры фотосинтетического аппарата и, как следствие, снижение продуктивности растений (Gao *et al.*, 2015)

Ионный стресс возникает в результате проявления токсического эффекта ионов натрия и хлора внутри растительной клетки. Высокие концентрации ионов натрия в цитоплазме блокируют поглощение других ионов, в большей степени одновалентных, например калия, что оказывает негативное воздействие на метаболические пути и функционирование ферментов и макромолекулярных процессов (Jaarsma *et al.*, 2013; Toscano *et al.*, 2023).

Нарушение водного баланса и общего метаболизма внутри клеток приводит к повышению генерации активных форм кислорода и, как следствие, формированию окислительного стресса.

К молекулам АФК относятся соединения с высокой реакционной способностью – гидроксид-радикал, пероксид водорода и супероксид-анион. АФК в низкой концентрации могут функционировать как сигнал, который активирует

защитные реакции ответа на солевой стресс. В то время, высокие уровни АФК повреждают белки, липиды, ДНК и углеводы (Yang, Guo, 2018; Sharif *et al.*, 2019).

### 1.2.1. Осмотический стресс

Первой адаптивной стратегией в растениях при осмотическом стрессе является синтез совместимых осмолитов (осмопротекторов), которые защищают белки и другие клеточные мембраны от различных повреждающих факторов, влияющих на клеточный метаболизм (Sharma *et al.*, 2019; Gupta, Seth, 2022). Накопление растворимых осмолитов способствует повышению вязкости цитоплазмы (Shahid, 2020) и растения повышают способность удерживать воду внутри клеток. Данные метаболические реакции являются общими для всех стимулов осмотического стресса, вызывающих в растении водный дефицит (засуха, засоление и т.д.) (Yang, Guo, 2018).

Совместимые осмолиты могут снижать потерю воды при кратковременном осмотическом стрессе, либо усиливать клеточный тургор, а также растяжение клеток при длительном стрессе, сохраняя рост растений при солевом стрессе (Yang, Guo, 2018) и выравнивают осмотический статус между двумя основными клеточными компартментами – вакуолью и цитоплазмой. Кроме того, осмолиты удаляют активные формы кислорода и ингибируют перекисное окисление липидов, тем самым предотвращая повреждение на клеточном уровне (Shahid, 2020).

Совместимые осмолиты, синтезируемые при солевом стрессе, видо- и тканеспецифичны (Sharif *et al.*, 2019). К данным осмопротекторам относятся: аминокислоты (прежде всего, пролин), четвертичные амины (глицин бетаин,  $\beta$ -аланин бетаин, холин-О-сульфат), сахара и сахароспирты (маннит, сорбит, сахара, включая сахарозу и фруктозу), у водных организмов важную роль может играть глицерин (Yang, Guo, 2018).

В работе Suprasanna с соавторами приведены данные по типу осмолитов и направленности их защитных механизмов (Таблица 2) (2016).

Таблица 2. Механизмы защиты совместимых осмолитов (Suprasanna *et al.*, 2016)

Осмолиты	Механизм защиты
Пролин, глицин бетаин	Сохранение целостности белка, удаление АФК и способность гасить синглетный кислород
Трегалоза	Обратимая водопоглощающая способность, повышение термостабильности, защита мембраны
Полиолы	Стабилизация ферментов или не нравятся начало мембранных структур, поддержание окислительно-восстановительного баланса
$\gamma$ -аминомасляная кислота	Метаболизм азота и регуляция сигнальных путей, опосредующих взаимодействие растений и микробов
Метиламины	Противодействовать ингибированию неорганических ионов

Среди совместимых (растворимых, органических) осмолитов, синтезируемых растениями в ответ на хлоридное засоление, наиболее изученным является иминокислота пролин. Пролин является производным глутамата (Рисунок 1), тот, в свою очередь, восстанавливается до глутамат-полуальдегида ферментом пирролин-5-карбоксилатсинтетазой (P5CS) и спонтанно превращается в пирролин-5-карбоксилат. Далее пирролин-5-карбоксилат-редуктаза (P5CR) дополнительно восстанавливает промежуточное соединение пирролин-5-карбоксилат до пролина. В условиях засоления P5CS1 накапливается в хлоропластах, что способствует усилению биосинтеза пролина. У большинства видов растений P5CS кодируется двумя генами, а P5CR кодируется одним (Szabados, Savouré, 2010).

Дегградация пролина происходит в митохондриях путём последовательного действия пролиндегидрогеназы или пролин-оксидазы (PDH или POX), продуцирующих пирролин-5-карбоксилат из пролина, и пирролин-5-карбоксилат-дегидрогеназы (P5CDH), которая ускоряет превращение пирролин-5-карбоксилата в глутамат. Пролиндегидрогеназа PDH кодируется двумя генами, тогда как только один ген *P5CDH* идентифицирован в *Arabidopsis* и табаке (*Nicotiana tabacum*) (Sachdev *et al.*, 2023).

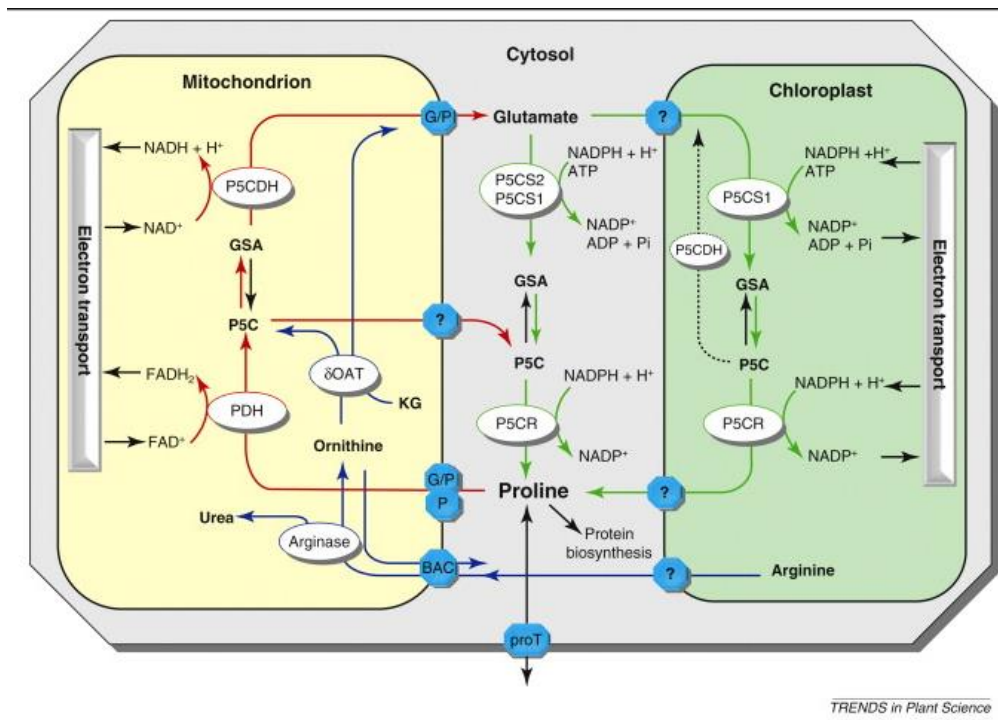


Рисунок 1. Предполагаемая модель метаболизма пролина в растительной клетке. Ферменты изображаются в виде эллипсов; транспортные белки – в виде голубых восьмиугольников. Сокращения: BAC, основной переносчик аминокислот, вовлеченный в обмен аргинина и орнитина; Glu, глутамат; G/P, митохондриальный глутамат/пролин-антипорттер; KG, альфа-кетоглутарат; P, транспортер митохондриального пролина; Pi, неорганический фосфат; ProT, переносчик пролина плазматической мембраны; ?, предполагаемые переносчики (Szabados, Saviouré, 2010).

В качестве альтернативного пути пролин может быть синтезирован из орнитина, который сначала трансаминируется орнитин-дельта-аминотрансферазой (OAT), продуцирующей глутамат-полуальдегид и пирролин-5-карбоксилат, далее он превращается в пролин (Szabados, Saviouré, 2010). Орнитиновый путь начинается с аргинина, из которого синтезируются пирролин-5-карбоксилат и глутамат в митохондриях. Митохондриальный пирролин-5-карбоксилат может транспортироваться в цитозоль, где восстанавливается до пролина с помощью P5CR.

У гликофитов в оптимальных условиях содержание пролина поддерживается на низком уровне, в ответ на засоление оно сильно возрастает (Gupta, Seth, 2022; Efimova *et al.*, 2023; Sachdev *et al.*, 2023).

### 1.2.2. Нарушение клеточного ионного гомеостаза

Для восстановления градиента водного потенциала между почвенным раствором и клетками корня растение, как правило, активно поглощает неорганические ионы, и секвестрирует их в центральной вакуоли, что, в свою очередь, может способствовать нарушению ионного гомеостаза и осмотического статуса между вакуолью и цитоплазмой. Поддержание последнего является важной адаптивной особенностью солеустойчивых растений. Аккумуляция ионов натрия и хлора в цитозоле клеток оказывает токсическое влияние на метаболизм клеток.

Поддержание соотношения количества ионов калия ( $K^+$ ) к количеству ионов натрия ( $Na^+$ ) в цитоплазме при хлоридном засолении возможно за счёт снижения концентрации цитоплазматического  $Na^+$  и увеличения цитоплазматического  $K^+$ . Основные механизмы для снижения содержания  $Na^+$  в цитоплазме – это ограничение поступления ионов натрия в клетку, увеличения их оттока в апопласт или перенос  $Na^+$  в вакуоль (Yang, Guo, 2018).

Снижение поступления ионов натрия из почвы/питательного раствора может осуществляться за счёт аккумуляции ионов калия в цитоплазме клеток корня (Shabala, Pottosin, 2014).

На снижение поступления ионов натрия в клетки корня и их дальнейший транспорт по ксилеме влияет организация апопластного барьера. При засолении его функция заключается в удержании  $Na^+$  в апопласте и межклеточном пространстве. В исследовании Омельченко с соавторами показан вклад удержания ионов натрия в межклеточном пространстве корней относительно транспорта  $Na^+$  в клетки листа (2009).

Хорошо описанным переносчиком ионов натрия из цитозоля в апопласт является  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортер SOS1. Предположительно, он также участвует в переносе  $\text{Na}^+$  в ксилему (Shi *et al.*, 2002, Saibi, Brini, 2021, Chen *et al.*, 2023).

Перенос ионов натрия в вакуоль позволяет снизить их отрицательное влияние на процессы, проходящие внутри цитоплазмы и других органеллах. Этот транспорт осуществляют белки-антипортеры  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  семейства NHX(1-7). Для транспортера NHX1 показано участие в транспорте не только ионов натрия, но и калия (Saibi, Brini, 2021). Сверхэкспрессия *NHX1* повышает устойчивость культур (Saibi, Brini, 2021), возможно, именно за счёт накопления ионов калия внутри клеток.

### 1.2.3. Окислительный (вторичный) стресс

При осмотическом стрессе происходит нарушение транспирации и закрытие устьиц – сокращается поступление углекислоты и нарушаются процессы фотосинтеза. При этом ионы натрия блокируют поступление ионов калия в хлоропласты и митохондрии. Всё это способствует повышению уровня АФК внутри клеток и приводит к формированию вторичного (окислительного) стресса.

В ответ на развитие окислительного стресса и нарушение метаболизма растение отвечает формированием клеточной антиоксидантной системы, которая включает антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные органические соединения, обладающие антиоксидантными свойствами (Yang, Guo, 2018).

Среди антиоксидантных ферментов выделяют супероксиддисмутазу (СОД), аскорбатпероксидазу (АПО), каталазу (КАТ), гваяколпероксидазу (ГПО), дегидроаскорбатредуктазу (ДГАР), монодегидроаскорбатредуктазу (МДАР), глутатионпероксидазу (ГР).

СОД является наиболее эффективным антиоксидантом; этот фермент находится на первой линии защиты от повреждений, вызванных АФК. СОД генерирует  $\text{H}_2\text{O}_2$  из  $\text{O}_2$ ; перекись водорода далее восстанавливают до  $\text{H}_2\text{O}$  с помощью АПО, КАТ и ГПО (Yang, Guo, 2018). Некоторые ферменты необходимы



для синтеза неферментативных антиоксидантов. ДГАР, МДГАР и ГР участвуют в регенерации окисленных молекул аскорбиновой кислоты и глутатиона (Рисунок 2).

К неферментативным антиоксидантам относят аскорбиновую кислоту, алкалоиды, каротиноиды, флавоноиды, глутатион, фенольные соединения и токоферол (витамин E), неструктурные углеводы.

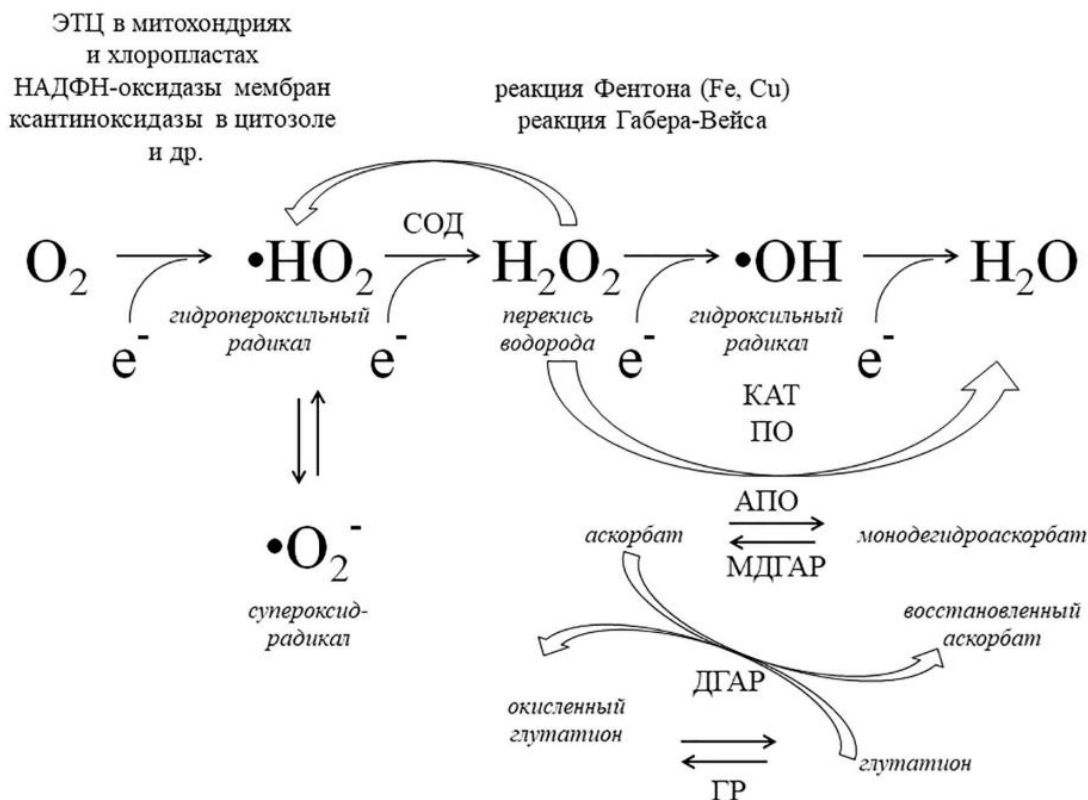


Рисунок 2. Взаимодействие АФК и компонентов антиоксидантных систем (Никерова и др., 2021)

### 1.3. Роль brassinosterоидов в формировании защитных механизмов растений при солевом стрессе

Фитогормоны способны регулировать морфофизиологические показатели растений во время солевого стресса, индуцируя формирование или стимулируя активность защитных механизмов. Среди известных фитогормонов протекторными свойствами в условиях абиотического стресса обладают абсцизовая кислота (АБК), этилен, жасмонаты (ЖК), салицилаты, гиббереллины и brassinosterоиды (БС). Относительно защитной роли цитокининов при стрессе нет единого мнения,

однако в работах Azzam и Raza с соавторами их также относят к этой группе гормонов (Azzam *et al.*, 2022; Raza *et al.*, 2022).

По мнению многих авторов, brassinостероиды способны регулировать функционирование других фитогормонов в период абиотического стресса. Так, экзогенный brassinостероид – BB16 (аналог полигидроксилированного спирофанового brassinостероида) в растениях риса при хлоридном засолении способствовал существенному росту концентрации эндогенной АБК и, в меньшей степени, ЖК (Hussain *et al.*, 2023).

Brassinостероиды являются стероидными фитогормонами, они присутствуют во всех растениях и выполняют ключевую роль в развитии растений, включая деление и растяжение клеток, регуляцию фотоморфогенеза, репродуктивного развития, старения листьев и др. (Kovtun *et al.*, 2021; Raza *et al.*, 2022; Litvinovskaya *et al.*, 2022).

В работе Zullo и Vajguz (2019) описано 97 brassinостероидов, среди которых 15 предшественников активных БС и 19 изомеров. Различия в химическом строении БС определяются разветвлениями в боковой цепи и степенью оксигенации колец А и В (Рисунок 3; Zullo, Vajguz, 2019).

Активность БС определяется химической структурой. Так, по строению боковой цепи (зелёные линии на рисунке 3), brassinостероиды ряда «24-эпи-» менее активны чем, 22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -дигидроксиbrassinостероиды и 28-гомоbrassinостероиды, но проявляют сходную активность с 28-норbrassinостероидами (Zullo, Vajguz, 2019).

Наибольшее количество вариаций brassinостероидов определяется строением кольца А (синие линии на рисунке 3), из которых brassinостероиды ряда «2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -дигидрокси-» обладают большей активностью по сравнению с «3 $\beta$ -гидрокси-» и «3 $\alpha$ -гидрокси-».

Структурные вариации в кольце В отражают основные этапы биосинтеза brassinостероидов (Рисунок 3, красные линии). С увеличением степени окисления, последовательно от «6-деоксо-» к «6 $\alpha$ -гидрокси-» и к «6-оксо-» (кетон-БС) и к «7-

оксалактоновым» (лактон-БС) типам, БС повышают свою активность (Zullo, Bajguz, 2019).

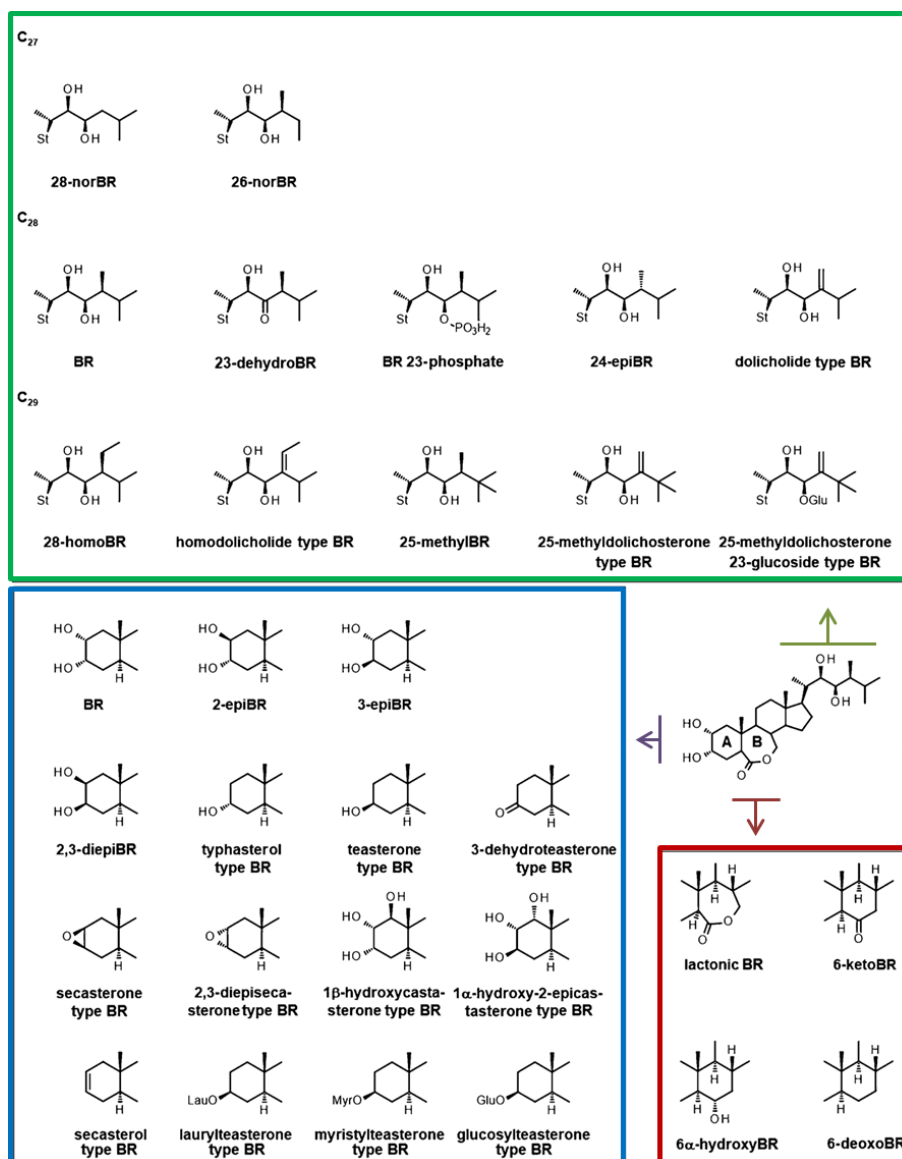


Рисунок 3. Классификация brassinостероидов (Zullo, Bajguz, 2019) с модификациями

Из трёх составляющих структуру и, как следствие, регулирующих активность БС (строение боковой цепи, колец А и В), 24-эпибрасинолид (ЭБЛ), по двум параметрам, является наиболее активным соединением. В связи с этим, он наиболее часто используется при проведении экспериментальных работ.

На сегодняшний день известно, что экзогенная обработка растений 24-эпибрасинолидом в отсутствие стрессорного фактора стимулирует накопление биомассы, фотосинтезирующих пигментов, вторичных метаболитов, эфирных

масел, белка и сахаров, усиливает рост осевых органов (Shahbaz, Ashraf, 2007; Ali, 2019; Parrey *et al.*, 2023a). Кроме того, показано, что ЭБЛ регулирует активность антиоксидантных ферментов, содержание пролина, степень перекисного окисления липидов и водный баланс (Khalid, Aftab, 2016).

При этом, в большинстве случаев, для ЭБЛ отмечено его положительное влияние на фотосинтез, в частности, на функционирование фотосистемы II (ФС II), а также на активность фермента РУБИСК/О (RuBisCO) (Siddiqui *et al.*, 2018b). В публикации Mahati и Padmasree (2023) было показано, что обработка протопластов клеток мезофилла листьев арабидопсис брассинолидом способствовала увеличению параметров фотосинтетической ассимиляции углерода и дыхания. Кроме того, наблюдалось значительное увеличение активности цитохромоксидазы и альтернативной оксидазы одновременно с увеличением общего уровня пирувата и активных форм кислорода в клетках (Mahati, Padmasree, 2023).

Брассиностероиды демонстрируют протекторный эффект в условиях хлоридного засоления. Экзогенные БС при солевом стрессе положительно регулируют ростовые процессы, снижая негативный эффект NaCl на длину осевых органов и площадь листовой поверхности; улучшают процессы фотосинтеза, усиливая синтез пигментов, активность фермента РУБИСК/О, и, как следствие, ассимилируя больше молекул углекислого газа. Кроме того, БС повышают антиоксидантный статус растения, дополнительно активируя синтез молекул-антиоксидантов (Efimova *et al.*, 2018a; Kolomeichuk *et al.*, 2020; Gupta, Seth, 2022; Raihan *et al.*, 2023).

В настоящее время проведено относительно малое количество исследований, направленных на сравнение биологической активности БС, различающихся по химической структуре. Так, в 1998 году Bajguz и Czerpak опубликовали работу, показывающую зависимость интенсивности роста и развития водорослей от структуры молекулы БС. Они предложили распределить БС по их биологической активности в следующей последовательности: брассинолид > 24-эпибрассинолид > гомобрассинолид > кастастерон > 24-эпикастастерон > гомокастастерон.

Для высших растений, зачастую, проводят сравнение двух лактонсодержащих БС – 28-гомобрассинолида (ГБЛ) и 24-эпибрассинолида (ЭБЛ). Sirhindi с соавторами (2009) показали наибольшую эффективность 28-ГБЛ на стадии прорастания горчицы (*Brassica juncea* L.) по его способности нейтрализовать свободные радикалы; 24-ЭБЛ был эффективен только как стимулятор роста побега. На том же объекте, но применяя другой способ внесения фитогормона (опрыскивание листьев), Siddiqui с коллегами (2018a) показали наибольшую эффективность ЭБЛ, в сравнении с ГБЛ. Ефимовой с соавторами (2018a) на растениях картофеля был продемонстрирован положительный эффект от обработки корней растворами ГБЛ и ЭБЛ в широком диапазоне концентраций при последующем хлоридном засолении. При этом, ЭБЛ снимал негативное действие соли на рост и содержание фотосинтезирующих пигментов, в то время как ГБЛ стимулировал дополнительное накопление пролина, обладающего стресс-протекторным эффектом.

Однако сравнение биологической активности лактон- и кетонсодержащих-брассиностероидов начали изучать относительно недавно. В работе Бондаренко с соавторами (2017) показано ингибирование ростовых процессов корней яровой пшеницы при 8 суточном воздействии кетон- и лактонсодержащими БС (ЭПК, ЭБЛ, ГБЛ). В исследовании отмечено различие дозозависимых эффектов между лактонсодержащими БС – ГБЛ и ЭБЛ и сходство для ГБЛ и ЭПК.

Также показаны эффекты ЭБЛ и ЭПК на старение листьев и процессы фотосинтеза (Kovtun *et al.* 2021). В данной статье отмечено, что кетонсодержащий БС проявлял высокую биологическую активность и, по ряду показателей, в частности при задержке старения, был более эффективен, чем лактон-БС. В работе Kolomeichuk с соавторами (2021) показан эффект обработки корней рапса в растворе с ЭПК или ЭБЛ при последующем засолении. В данном исследовании было продемонстрировано, что анализируемые БС, в разной степени, стимулировали активность антиоксидантных ферментов. Zlobin с соавторами (2023) продемонстрировали протекторный эффект 28-гомобрассинолида (лактон-

БС) и 28-гомокастестерона (кетон-БС) на растениях ячменя при полиметаллическом стрессе. При этом, впервые было отмечено положительное влияние гомокастестерона на содержание фотосинтетических пигментов.

Некоторые исследователи высказывают предположение, что brassinosteroids, в том числе кетонсодержащие, весьма перспективны в сельском хозяйстве для повышения урожайности и стимуляции роста культурных растений в оптимальных условиях и при стрессе (Parrey *et al.*, 2023b; Swain *et al.*, 2023). Это делает актуальным сравнительное изучение физиологических механизмов протекторного действия лактон- (24-эпибрассинолида) и кетонсодержащих (24-эпикастестерона) brassinosteroids на растениях картофеля при последующем (отсроченном) солевом стрессе.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объект исследования

В качестве объекта исследования использовали оздоровленные растения-регенеранты семейства *Solanaceae* – *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской, который относится к столовым среднеспелым сортам (идентификатор 8301891). Исходные оздоровленные материнские микроклоны *S. tuberosum* были получены из Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха» (п. Коренёво, Россия). В дальнейшем было проведено потоковое клонирование растений-регенерантов для увеличения количества исследуемого материала. При черенковании использовали сегмент побега длиной около 10 мм с боковой пазушной почкой и прилегающим листом.

Данная культура отличается ценными овощными, продовольственными, кормовыми качествами, является четвёртой по урожайности в мире и второй по значимости культурой растениеводства в Российской Федерации (FAO, 2008).

### 2.2. Методы исследования

#### 2.2.1. Условия выращивания растений и постановки экспериментов

Культивирование микрочеренков оздоровленных растений картофеля в культуре *in vitro* осуществляли на 50% модифицированной агаризованной безгормональной питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) (рН = 5.8) с добавлением витаминов (тиамин, пиридоксин и никотиновая кислота – 1 мг/л) и сахарозы (25 мг/л). Микроклоны выращивали под люминесцентными лампами L36W/77 Fluora («Osram», Германия) при плотности потока квантов ФАР 200-250 мкмоль•м<sup>-2</sup>с<sup>-1</sup> в фитотроне с 16-часовым фотопериодом и температурой (16 ± 2) °С (Ефимова и др., 2019). Выращивание растений в агаризованной среде продолжалось в течение 21 суток (первый этап).

Второй этап роста растений – адаптация к жидкой 50% среде МС и атмосфере фитокамеры в течение 14 суток. Моделирование условий засоления происходило на третьем этапе выращивания: в жидкую 50% среду МС добавляли 2.9 г/л (50 мМ раствор), 4.4 г/л (75 мМ), 8.8 г/л (150 мМ) или 11.7 г/л (200 мМ) хлорида натрия (Рисунок 4).

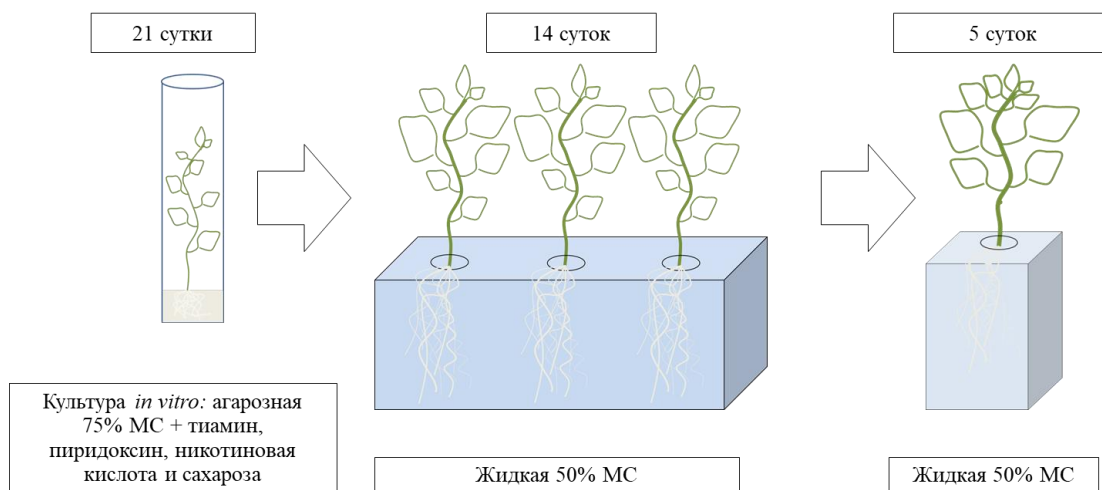


Рисунок 4. Общая схема экспериментов

Ростовые показатели растений оценивали с помощью линейки и аналитических весов Adventure (Ohaus, США). Отдельно образцы листьев фиксировали в жидком азоте для определения физиологических показателей: содержания фотосинтетических пигментов, осмолитов, в том числе свободного пролина, и активных продуктов с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), активности ферментов (супероксиддисмутаза и гваякол-пероксидаза), и уровня экспрессии стресс-регулируемых генов. До постоянной массы высушивали (при 60 °С, термостат FD53 Binder, Германия) листья, стебли и корни для определения содержания воды и концентрации неорганических ионов. Лиофильно высушенный растительный материал использовали для определения эндогенного содержания brassinosteroidов.

*Исследование представлено несколькими сериями экспериментов:*

В первой серии экспериментов растения картофеля после выращивания на агаризованной питательной среде (1 этап, 21 сутки) в культуре *in vitro* одну часть



микрклонов фиксировали. В то время как, вторую часть переносили в условия гидропоники на жидкую питательную среду (2 и 3 этап, 19 суток). Затем растения также были зафиксированы. Далее в зафиксированных пробах определяли эндогенное содержание brassinosterоидов (Рисунок 5).

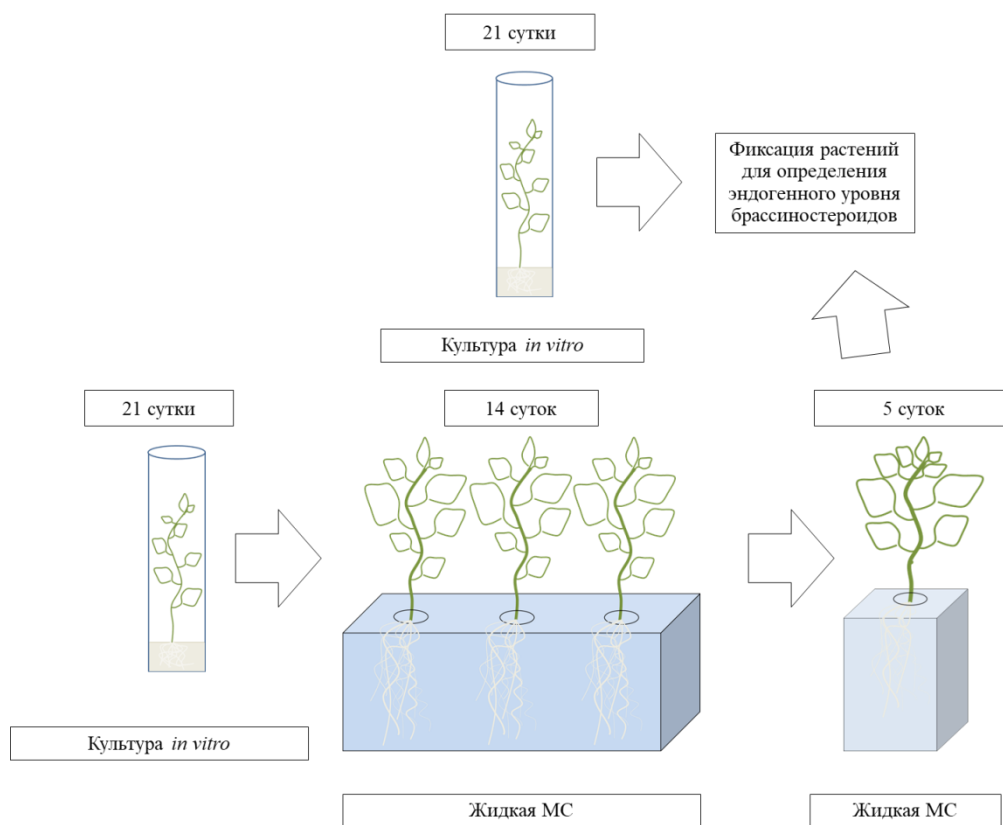


Рисунок 5. Схема первой серии экспериментов

Вторая серия экспериментов была направлена на поиск оптимальной концентрации brassinosterоидов при их длительном воздействии (Рисунок 6). На первом этапе (выращивание *in vitro*) в питательную среду вносили brassinosterоиды (24-эпибрассинолид (ЭБЛ) или 24-эпикастестерон (ЭПК)) в концентрации 10 или 1000 нМ. Затем растения выращивали последующие два этапа (14 и 5 суток) и растительный материал фиксировали.

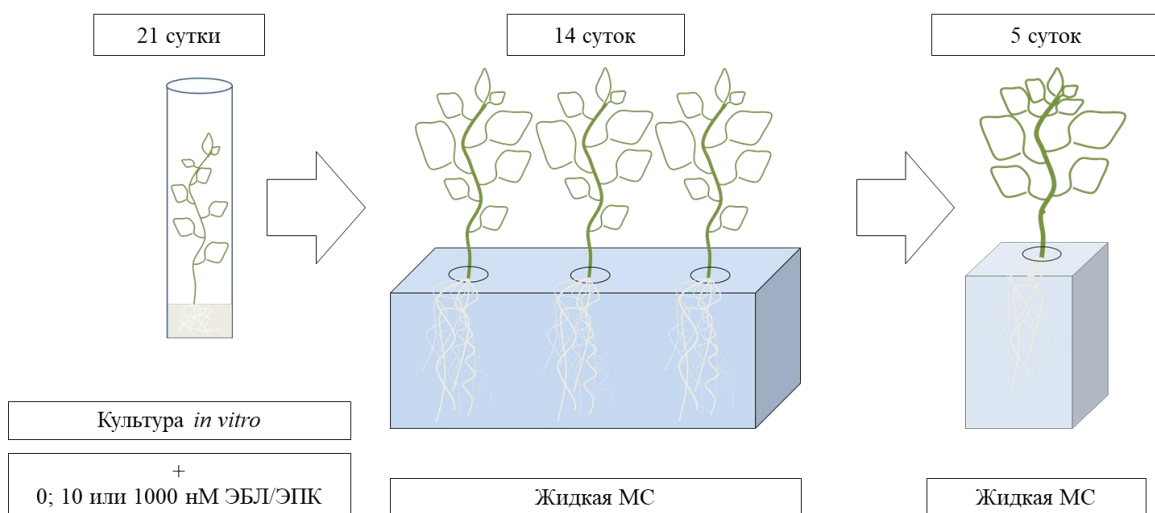


Рисунок 6. Схема второй серии экспериментов

Третья серия экспериментов была нацелена на определение действующих концентраций brassinosterоидов и изучение реакции растений на кратковременное воздействие гормонов (Рисунок 7). После второго этапа в питательную среду вносили БС (ЭБЛ или ЭПК) в концентрациях 0,1, 10 или 1000 нМ, продолжительность обработки составляла 1, 4 или 12 часов. Далее растения доращивали 5 суток (третий этап) и фиксировали.

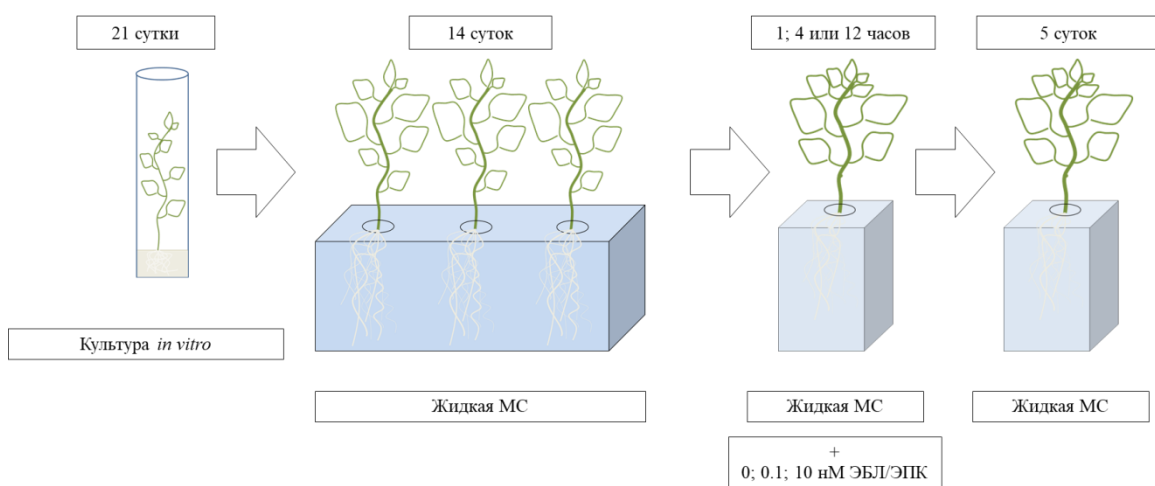


Рисунок 7. Схема третьей серии экспериментов

В четвертой серии экспериментов нами были выбраны концентрации хлорида натрия для последующего моделирования условий засоления (Рисунок 8). На третьем этапе выращивания растений картофеля вносили NaCl в концентрации

50, 75, 150 или 200 мМ в питательную среду и фиксировали растения через 1, 3 и 5 суток.

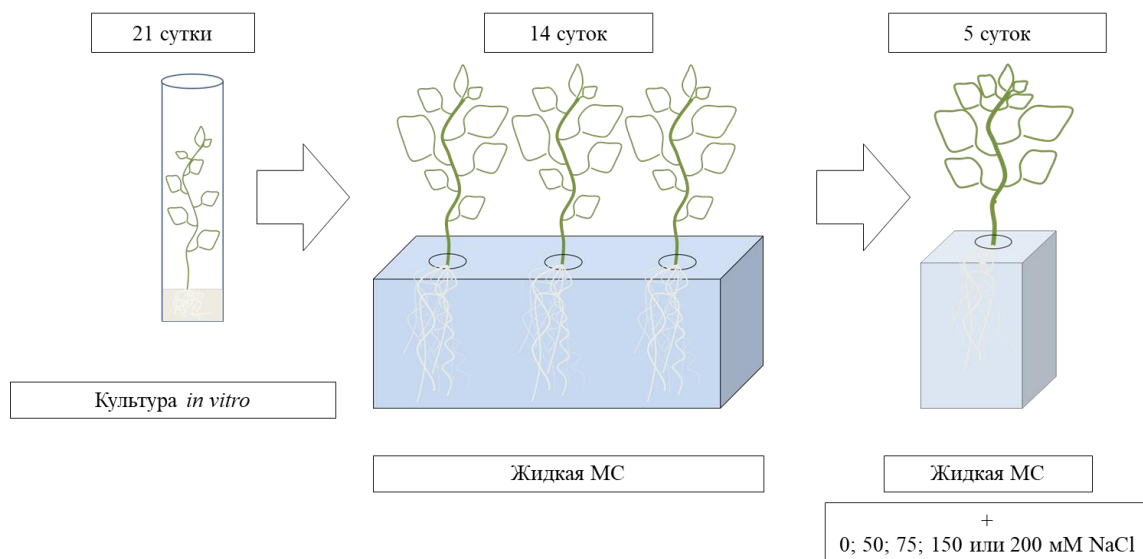


Рисунок 8. Схема четвёртой серии экспериментов

В пятой серии экспериментов мы осуществляли сравнение защитного эффекта длительного воздействия лактон- (ЭБЛ) и кетонсодержащих (ЭПК) brassinosterоидов при последующем хлоридном засолении (Рисунок 9). На первом этапе (выращивание *in vitro*) в питательную среду экспериментальной группы растений вносили brassinosterоиды (24-эпибрассинолид или 24-эпикастестерон) в концентрации 10 или 1000 нМ; на третьем этапе каждая группа была разделена ещё на 3 группы – контрольную, с добавлением 75 или 150 мМ хлорида натрия. Через 1, 3 и 5 суток растения фиксировали.

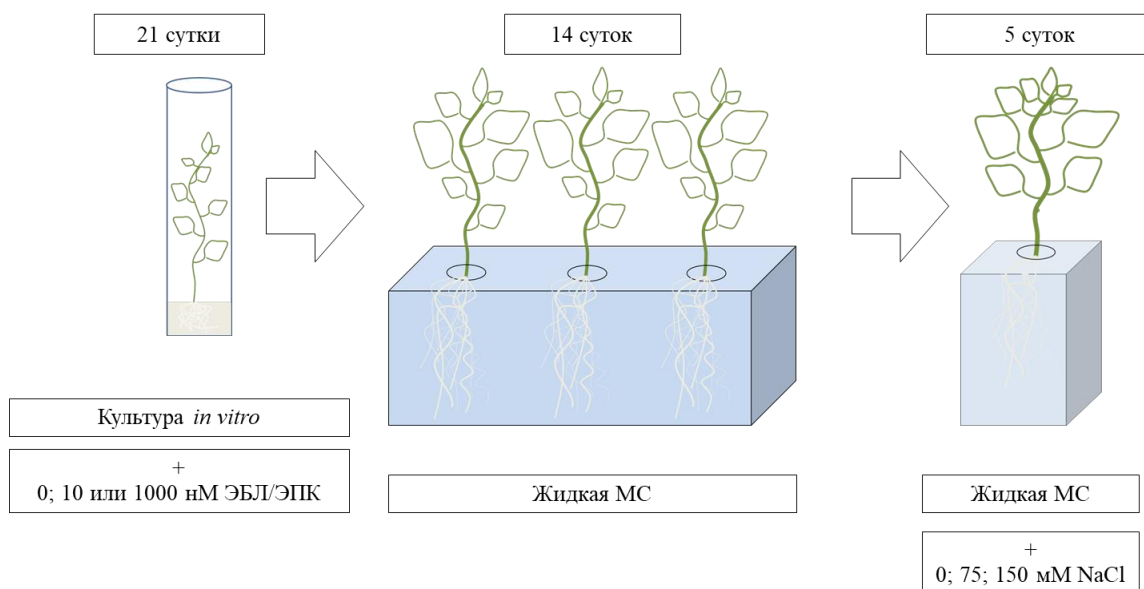


Рисунок 9. Схема пятой серии экспериментов

В шестой серии экспериментов мы проводили сравнение защитных эффектов кратковременного воздействия лактон- (ЭБЛ) и кетонсодержащих (ЭПК) brassinостероидов при последующем хлоридном засолении (Рисунок 10). После второго этапа выращивания, растения разделяли на 3 группы – контрольную, обработанную ЭБЛ или ЭПК (10 нМ, 4 часа). На третьем этапе растения были разделены ещё на 3 группы – контрольную, с внесением 75 или 150 мМ хлорида натрия. Через 1, 3 и 5 суток растения фиксировали.

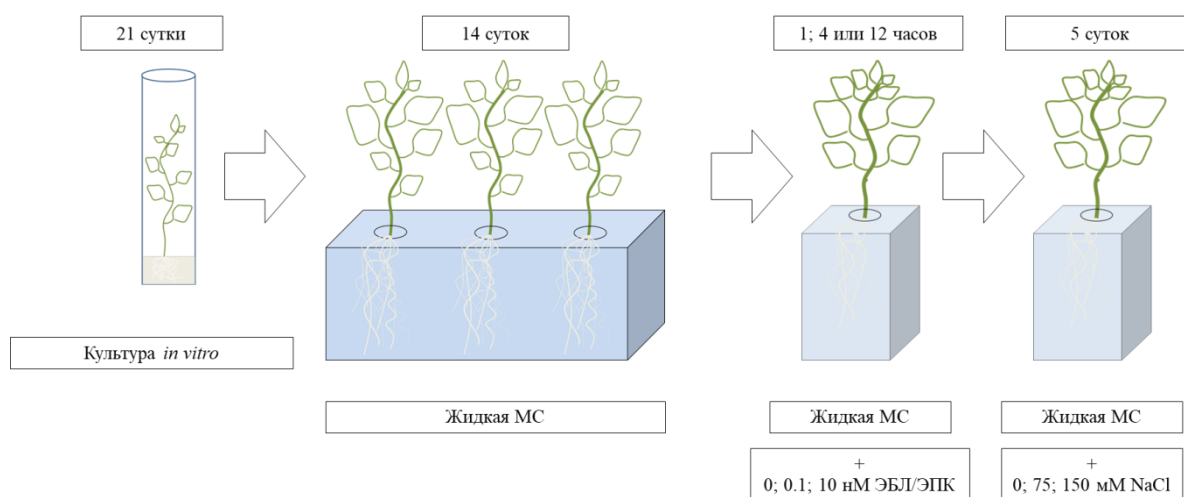


Рисунок 10. Схема шестой серии экспериментов

## 2.2.2. Морфометрические методы

Линейкой измеряли длину осевых органов растений (побег, корень). Подсчёт числа листьев, узлов и столонов проводили вручную.

### 2.2.2.1. Определение процентного содержания влаги в листьях, стебле и корнях растений

Для определения процентного содержания воды часть растения (листья, стебель, корни) взвешивали. Затем их помещали в бумажные конверты и высушивали в термостате FD53 (Binder, Германия) при 60 °С до постоянной массы. После высушивания материал повторно взвешивали. Процентное содержание воды рассчитывали по следующей формуле:

$$RW = \frac{(FW-DW)}{FW} \times 100\% , \text{ где}$$

RW – процентное содержание воды, %;

FW – сырая масса части растения, г;

DW – сухая масса части растения, г.

## 2.2.3. Биохимические методы со спектрофотометрией

### 2.2.3.1. Определение содержания основных фотосинтезирующих пигментов

Экстракцию фотосинтезирующих пигментов осуществляли 96% этаноловым спиртом. Пробы растирали в керамических ступках с добавлением жидкого азота и переносили около 0.010 г в пробирки Эппендорфа объёмом 2 мл. В пробирки добавляли 2 мл 96% спирта для экстракции пигментов. Затем растительный материал осаждали на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) в течение 8 минут при 8000 g. Оптическую плотность надосадочного раствора измеряли на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, Германия) при длине волн: 470.0, 648.6 и 664.2 нм. В качестве контрольного образца использовали 96% спирт. Для расчёта количества фотосинтетических пигментов использовались формулы, предложенные Lichtenthaler (1987).

### 2.2.3.2. Определение содержание свободного пролина

Экстракцию и определение свободного пролина проводили по модифицированному методу Bates с соавт. с использованием нингидринового реактива (Bates *et al.*, 1973). Фиксированную пробу листьев растирали в керамических ступках с добавлением жидкого азота и переносили около 0.030 г в пробирки Эппендорфа объёмом 1.5 мл. Перемешивали на центрифуге-вортексе Микроспин (Biosan, Латвия) и нагревали 30 минут при 98 °С в термостате Термит (ДНК-Технологии, Россия). Далее образец осаждали в центрифуге 5430R (Eppendorf, Германия) 15 минут, при 12000 g × 4°С. В стеклянные пробирки отбирали по 200 мкл супернатанта. В контрольные образцы вместо супернатанта добавляли соответствующий объём дистиллированной воды. Далее в пробирки вносили по 800 мкл дистиллированной воды; 1 мл нингидринового реактива (1.25 г нингидрина, 20 мл 6М H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 30 мл ледяной уксусной кислоты) и 1 мл ледяной уксусной кислоты. Пробирки плотно закрывали фольгой, чтобы уменьшить интенсивность испарение реакционной смеси. Реакцию проводили в течение часа при 98°С на водяной бане LB-163 (ЛЮИП, Россия). Оптическую плотность полученных окрашенных растворов измеряли на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США) при длине волны 520 нм. Содержание пролина рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с использованием L-пролина (Диаэм, Россия).

### 2.2.3.3. Определение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ)

Зафиксированные в жидком азоте листья растирали в керамических ступках с добавлением жидкого азота, около 0.100 г переносили в пробирки Эппендорфа объёмом 2 мл и добавляли 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Полученную пробу перемешивали на вортексе Микроспин (Biosan, Латвия) и осаждали на центрифуге 5430R (Eppendorf, Германия) 15 минут, при 12000 g × 4 °С. В стеклянные пробирки отбирали по 500 мкл супернатанта. В контрольные образцы вместо супернатанта добавляли равный объём ТХУ – 500 мкл. Далее в пробирки

вносили по 1.5 мл 0.5% тиобарбитуровой кислоты (ТБК) в ТХУ. Пробирки плотно закрывали фольгой, чтобы снизить интенсивность испарения реакционной смеси.

Реакция с образованием окрашенного комплекса (ТБК-активных продуктов, ТБК-АП) проходила при нагревании на водяной бане LB-163 (ЛЮИП, Россия). Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США) при длинах волн 532 и 600 нм. Концентрацию ТБК-АП рассчитывали по формуле (Buege, Aust, 1978).

#### 2.2.3.4. Определение активности антиоксидантных ферментов

Зафиксированные в жидком азоте листья растений растирали в керамических ступках с добавлением жидкого азота. К гомогенизированным образцам (около 0.100 г) добавляли буфер (0.05M MOPS (Диаэм, Россия), 25 г/л нерастворимый поливинилполипирролидон (CDH, Индия), 0.5M дитиотрейтол (Диаэм, Россия), 0.1M фенилметилсульфонилфторид в диметилсульфоксиде (Диаэм, Россия)), pH = 7.4, перемешивали на вортексе Микроспин (Biosan, Латвия) и осаждали на центрифуге 5430R (Eppendorf, Германия). Из полученного супернатанта отбирали аликвоты для определения активности супероксиддисмутазы (СОД), гваяколзависимой пероксидазы (ГПО) и содержания белка.

Общую активность СОД определяли по методу (Beauchamp, Fridovich, 1971). Реакционная смесь объемом 2 мл содержала: 250 мкл супернатанта, 1.75 мл 50 мМ Трис-НСl-буфера (pH=7.8), 0.2 мл 0.1M DL-метионина (Applichem, США), 0.063 мл 1.7 мМ нитросинего тетразолия (Диаэм, Россия), 0.047 мл 1%-ого Тритона X-100 (Applichem, США), и 0.060 мл 0.004%-ного рибофлавина (Applichem, США). Реакцию проводили при освещении светодиодными лампами ( $I = 232 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) в течение 30 минут. Поглощение раствора оценивали при 560 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США).

Активность ГПО определяли по методу Шевяковой и др. (2002). Реакционная смесь содержала 10 мкл супернатанта, 970 мкл 0.05M MOPS (pH=7.4), 100 мкл 7 мМ гваякола, 120 мкл 0.01M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Поглощение раствора измеряли при

470 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США) в течение трёх минут.

Концентрацию белка в полученных ферментных препаратах оценивали по методу (Esen, 1978). Полученный супернатант наносили на хроматографическую бумагу (Whatman, Англия) и окрашивали с помощью красителя Кумасси R250. После окрашивания листы промывались дистиллированной водой. Пятна с пробами вырезали из бумаги, помещали в химические пробирки и заливали 1% додецилсульфатом натрия (SDS) (Helicon, Россия). Оптическую плотность измеряли при 600 нм на спектрофотометре Genesys 10S UV-Vis (ThermoScientific, США).

#### 2.2.3.5. Выделение общей ДНК, РНК и получение кДНК

Для получения ДНК использовали набор для выделения геномной ДНК фирмы ThermoScientific (США).

Получение суммарной РНК осуществляли методом, описанным Manickavelu с соавторами и модифицированным Злобиным И.Е. (Manickavelu *et al.*, 2007; Murgan *et al.*, 2020; Zlobin *et al.*, 2020).

К гомогенизированной в жидком азоте ткани листа добавляли экстракционный буфер (0.1 М Tris-HCl (pH = 9.0), 0.1 М LiCl, 1 мМ ЭДТА (pH = 8.0), 1% SDS). Отделение суммарной РНК от гомогената осуществляли добавлением смеси фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (ФХИ) в соотношении 25:24:1. Осаждение РНК осуществляли 3 часа. Процедуру осаждения повторяли 2 раза. Итоговый осадок, содержащий РНК, растворяли в воде.

Концентрацию и качество выделенных нуклеиновых кислот оценивали на нанофотометре P330 (Implen, Inc, США).

Тотальную РНК перед обратной транскрипцией обрабатывали ДНКазой (EN0521) для удаления молекул ДНК согласно протоколу ThermoScientific (США).

Синтез первой цепи ДНК осуществляли с помощью обратной транскриптазы (ThermoScientific, США) и праймеров Oligo(dT) (Евроген, Россия).



### 2.2.3.6. Определение содержания эндогенных brassinosteroidов

Лиофилизированные образцы картофеля измельчали, после чего из них экстрагировали спирторастворимые соединения метанолом (15 мл) в течение 24 ч при комнатной температуре. Метанольный экстракт упаривали досуха, остаток порционно распределяли между циклогексаном (7 мл) и 80% водным метанолом (3×4 мл). Объединенную воднометанольную фракцию упаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл метанола и наносили на препаративную пластинку (20×20 см) с силикагелем. В качестве элюента использовали смесь хлороформ: метанол (88:12). Собирали зону с  $R_f = 0.4-0.6$ , переносили ее на фильтр, элюировали метанолом, после чего растворитель упаривали. Полученный остаток растворяли в 2 мл буферного раствора (0.05 М Трис, pH 7.4, содержащий 0.9% NaCl, 0.1% БСА, 0.02% Твин<sup>TM</sup> 20). Буферный экстракт центрифугировали (12000 об./мин, 10 мин), супернатант разводили в 2-4 раза и использовали для анализа.

Определение содержания 24-эпибрасиностероидов (суммарное содержание 24-эпибрасинолида и 24-эпикастастерона), 24S-метилбрасиностероидов (суммарное содержание брасинолида и кастастерона) и 28-гомобрасиностероидов (суммарное содержание 28-гомобрасинолида и 28-гомокастастерона) осуществляли двухэтапным иммуноферментным методом (Khrpach *et al.*, 2011; Pradko *et al.*, 2015), разработанным в лаборатории Института биоорганической химии НАН Беларуси, эффективность метода была доказана ВЭЖХ методом. Оптическую плотность раствора во всех лунках измеряли при 450 нм. Для расчетов использовали метод интерполяции по калибровочному графику. Для калибровочных проб в координатах “logit-log” строили график зависимости показателя  $V/V_0 \times 100\%$  от концентрации брасиностероида в калибровочных пробах (нмоль/л), где  $V$  и  $V_0$  – значения оптической плотности продукта ферментативной реакции в присутствии свободного брасиностероида (при наличии конкуренции нативного и меченого гормона за связывание с антителами) и в его отсутствие (происходит только связывание меченого гормона) соответственно.

## 2.2.4 Биофизические методы

### 2.2.4.1. Определение содержания неорганических ионов в тканях растений

Определение элементного состава растительных образцов проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-МС), с использованием масс-спектрометра Agilent-7700x (Agilent Technologies, Germany). В стандартных условиях измерения проводили с использованием импортных эталонных образцов.

Определение концентрации ионов в образцах растений методом ICP-МС основано на следующем: анализируемый образец распыляли совместно с потоком аргона на высокотемпературную плазму, где происходила ионизация большинства атомов. Часть образовавшихся в плазме ионов попадала в вакуумную камеру, в которой происходило их ускорение и фокусировка с помощью ионных линз. Далее ионный пучок попадал в неоднородное электромагнитное поле квадруполь, где происходило пространственное разделение ионов по массам. При сканировании электромагнитного поля квадруполь на ионный детектор последовательно попадали ионы определенной массы и регистрировались с помощью электроизмерительных устройств. Полученные сигналы обрабатывались на специализированном программном обеспечении компьютера.

### 2.2.4.2. Определение осмотического потенциала

Образцы растирали в пробирках Эппендорфа до выделения клеточного сока. Затем их центрифугировали при 8000 g 10 минут (5430R Eppendorf, Германия). Надосадочную жидкость (40 мкл) переносили в специальную пробирку для осмометра. Концентрацию осмотически-действующих веществ определяли на осмометре Осмомат 030 (Gonotec, Германия). Осмотический потенциал выражали в МПа.

### 2.2.4.3. Определение параметров фотохимической активности фотосистемы II

Параметры фотохимической активности фотосистемы II (ФС II): максимальный ( $F_v/F_m$ ) и эффективный ( $Y(II)$ ) фотохимический квантовый выходы

ФС II, относительную скорость транспорта электронов (ETR), фотохимическое (qP и qL) и нефотохимическое (qN и NPQ) тушение, квантовые выходы нерегулируемого (Y(NO)) и регулируемого (Y(NPQ)) рассеяния энергии определяли с помощью PAM-флуориметра Junior-PAM и PAM-II (Heinz-Walz, Германия). Предварительная инкубация растений в темноте составляла 20 минут.

#### 2.2.4.4. Электрофорез РНК в агарозном геле

С целью определения качества экстрагированных образцов РНК проводили электрофорез в агарозном геле. К 40 мл 1.5% агарозного геля на основе TBE буфера (Tris основной, борная кислота, ЭДТА, pH = 8.0, вода MiliQ) добавляли 2.5 мкл бромистого этидия (10 мг/мл) и заливали в камеру для электрофореза. В каждую лунку помещали смесь пробы с 2 мкл буфера для нанесения образцов (6X DNA Loading Dye, Fermentas, Латвия). Определяли относительную молекулярную массу разделенных фрагментов, с помощью одновременно внесённых маркерных макромолекул с известными молекулярными массами. Электрофорез проводили в течение часа при мощности 65 Вт и силе тока 100 мА.

#### 2.2.4.5. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

В планшеты из низкопрофильного прозрачного пластика (SSI, США) добавляли смесь из кДНК, 5X qPCRmix SYBRGreen I (Евроген, Россия) и высокоспецифичных праймеров (прямого и обратного) (Таблица 3). Накопление транскриптов целевых генов определяли по уровню флюоресценции интеркалирующего красителя с помощью амплификатора с детекцией флюоресценции Lightcycler`96 (Roche, Франция).

Расчёт относительного количества транскриптов производили по формуле:

$$A = \frac{\sqrt{E_{R1}^{CqR1} \times E_{R2}^{CqR2}}}{E_T^{CqT}}$$

где, A – уровень экспрессии целевого гена (Т);

E – эффективность прохождения реакции для пары праймеров в идеальной модели равно 2;

Cq – пороговый цикл;

R<sub>1,2</sub> – конститутивные (референсные) гены;

T – целевой ген.

Таблица 3. Список используемых пар праймеров и их последовательности

Ген	ID гена	5'→3' прямой праймер	5'→3' обратный праймер
<i>Eflα</i>	AB061263	ATTGGAATGGATATGCTCCA	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA
<i>Cyclophilin</i>	AF126551	CTCTTCGCCGATACCACTCC	TCACACGGTGGAAAGGTTGAG
<i>P5CS1</i>	102582423	GTGAAGAACGTGAAACGAGTGA	CGCTCCTAATCTTCCAAGTGCT
<i>P5CR</i>	102580560	TCACGACAAGATTCGGAGACC	GCCTTATCAGCAGTTCTATTCCAC
<i>PDH</i>	102588726 102588395	ATAACTGCAATTTGTACACCA	GCGAAAAGTGGAAAGCG
<i>PAL</i>	102596891	TCGCTGAAGTGATGAACGGAA	ATTGTGGAGATGTTCCGGAGA
<i>CHS1</i>	102577871	CTTGTCCCCGATAGCGAA	AAATAGAGAGTTCAGTCAGAT
<i>APX1</i>	102586145	CTGGTGTTCGTTGCTGTTGAA	AAGATAAGAGGATTGGCGGTC
<i>APX3</i>	102597356	CCTTCTTTAGGGATTACGCCAT	AGCCACAACAACACCTACAGCA
<i>SOS1</i>	102602690	TTGCCTCACCATTCATTG	TGATGCTTCTGTGTTGTGGAAG
<i>NHX1</i>	102578176	TGTTGATCCCTTTCGACCAT	CCAAATAGGGGTCGCATAAA
<i>NHX2</i>	102605641	TGTTACTGGCATTCTGGTTTAC	AATAGACAGAACAGTGACAGGA
<i>NHX3</i>	102589621	TGTTGATCCCTTTCGACCAT	CCAAATAGGGGTCGCATAAA
<i>DET2</i>	102583495	CCACTACACAAATCGGACAATAA	CCACTCATCAGAATCATACTCAGC
<i>CYP450 85A1</i>	102603315	TGGAGAGATTTGTAGGATGC	TTCGTGATTATGTTAGCGGGA
<i>CYP450 90A1</i>	102604556	TCTCATCCACCTACCGCAA	CTACTAATCCCAACGCCTCC
<i>CYP450 90B1</i>	102603786	CTTCTAGGTTGGGTTCTGA	GCCAGCAAAGAGCAAA

В качестве конститутивных (референсных) генов использовали рекомендованные последовательности (Nicot *et al.*, 2005): ген, кодирующий фактор элонгации (*Eflα*) и ген, кодирующий циклофилин.

#### 2.2.5 Статистический анализ

Достоверность полученных значений анализировали при помощи критерия Стьюдента. Для расчётов использовали программное обеспечение MS Excel 2010.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Анализ эндогенного содержания различных групп фитостероидов и влияние 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона на физиологические процессы растений картофеля в культуре *in vitro* и *in vivo*

Брассиностероиды (БС) являются ростостимулирующими фитогормонами, наибольшая концентрация которых отмечается в молодых тканях. В настоящее время известно более 70 представителей класса БС, их содержание в растениях составляет менее  $10^{-5}\%$  (Khripach *et al.*, 2011).

3.1.1 Определение эндогенного содержания различных групп брассиностероидов в растениях картофеля

Прежде чем сравнивать защитное действие 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона в условиях хлоридного засоления, нами было определено эндогенное содержание некоторых групп брассиностероидов в побегах и корнях молодых растений картофеля сорта Луговской.

В основе структуры БС лежит  $5\alpha$ -холестановый скелет, их различия обусловлены типом и положением функциональных групп в кольцах А/В и алкильных заместителей в боковой цепи.

Методом иммуноферментного анализа мы определили количественное содержание БС, различающихся по типу оксигенации В кольца (лактон-БС и кетон-БС) или разветвлённости углеродного скелета - (24-эпи-БС, 24S-метил-БС и 28-гомо-БС).

Для получения микроклонов картофеля использовали сегмент побега длиной 10 мм родительских растений-регенерантов с верхней боковой пазушной либо апикальной почкой и прилегающим листом (Рисунок 11). Культивирование микроклонов осуществляли на агаризованной питательной среде 21 сутки (1 этап), далее растения лиофильно высушивали и определяли в них содержание 24-эпибрассиностероидов (суммарное содержание 24-эпибрассинолида и 24-

эпикастастерона), 24S-метилбрасиностероидов (брасинолид и кастастерон) и 28-гомобрасиностероидов (28-гомобрасинолид и 28-гомокастастерон), а также В-лактон- (брасинолид, 24-эпибрасинолид, 28-гомобрасинолид) и В-кетон-содержащих БС (кастастерон, 24-эпикастастерон, 28-гомокастастерон). Содержание БС оценивали в побегах и корнях растений, полученных из апикальной и верхних (2-4-го узлов) боковых почек.



Рисунок 11. Схематичное изображение родительского микроклона растений картофеля

Полученные данные показали, что в корнях растений уровень всех исследуемых групп БС был выше, чем в побегах (Таблица 4). Однако органоспецифичность эндогенного содержания брасиностероидов в микроклонах определялась типом экспланта. Микроклоны, полученные из апикальной почки, обладали суммарно более высоким содержанием БС. Последнее определялось преобладанием в корнях 24-эпи-БС и лактон-БС, в 2.6 и 4.7 раз соответственно. В связи с чем, суммарное содержание лактон-БС в целом растении превышало количество кетон-БС в 4.8 раз.

В то время как в побегах растений-регенерантов, полученных из боковой почки, содержание кетон-БС, лактон-БС, 28-гомо-БС было почти в 2 раза выше; содержание брасиностероидов группы 24S-метил было выше в 5 раз (Таблица 4).

При этом, суммарное содержание лактон- и кетонсодержащих БС в целых микроклонах, полученных из боковых почек, было сходным (Efimova *et al.*, 2019).

Это позволило нам проводить дальнейшие исследования на растениях, полученных из боковой почки, используя при этом экзогенные гормоны в эквимоллярных концентрациях.

Продолжение роста растений в культуре гидропоники (*in vivo*) способствовало накоплению в побегах БС группы 24-эпи и снижению содержания 28-гомо (Таблица 4). В то время как, уровень 24-эпи, 24S-метил и 28-гомо БС в корнях не изменялся. Примечательно, что в более взрослых растениях картофеля содержание лактон-БС возрастало в 3.2 и 2 раза для побега и корня соответственно, а кетон-БС снижалось на 47% в надземной части растения.

Таблица 4. Содержание brassinosterоидов в побегах и корнях микроклонов картофеля, нг/г лиофильно высушенной массы

Почка	Образец	24-эпи-БС	24S-метил-БС	28-гомо-БС	Лактон-БС	Кетон-БС
После этапа роста <i>in vitro</i>						
Апикальная	Побег	–	4.2±0.5	6.5±0.2	2.92±0.5	10.2±1.0
	Корень	231.8±19.2	34.6±3.7	49.9±6.0	229.6±5.5	38.9±4.8
Боковая	Побег	–	20.6±2.8	10.6±0.9	5.5±0.2	22.4±1.5
	Корень	87.6±2.1	50.0±2.3	34.5±5.4	49.0±4.5	33.6±3.4
После этапа роста <i>in vivo</i>						
Боковая*	Побег	31.9±2.3	6.15±0.8	16.7±0.2	17.8±0.2	12.0±1.6
	Корень	87.9±7.3	43.4±6.4	37.7±5.0	100.8±3.3	40.7±6.0

Примечание: 24-эпи-БС – содержание 24-эпибрасиностероидов, 24S-метил-БС – 24S-метилбрасиностероидов, 24-гомо-БС – 28-гомобрасиностероидов, Лактон-БС – 7-окса-6-оксобрасиностероидов, Кетон-БС – 6-оксобрасиностероидов, «–» – значения ниже фиксируемого уровня

\* – Данные получены совместно с Коломейчук Лилией Викторовной

Существует несколько способов воздействия фитогормонов на растения, например, через внесение гормона в почву/питательную среду на разных этапах онтогенеза, опрыскивание листьев, а также кратковременная обработка путем замачивания семян, корней или черенков (Janeczko, Swaczynová, 2010; Khalid, Aftab, 2020a; Khalid, Aftab, 2020b; Kolomeichuk *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

В исследовании Janeczko и Swaczynová (2010) на пшенице показано, что экзогенное применение БС повышало их эндогенный уровень, который зависит от способа внесения фитогормона и специфики генотипа. Наибольший эффект отмечен для растений, подвергнутых воздействию на ранних этапах онтогенеза (обработка корней трёхдневных проростков). Предполагают, что транспорт БС из корня в надземную часть осуществляется по ксилеме (Janeczko, Swaczynová, 2010). Помимо этого известно, что внесение БС в питательную среду оказывает положительное влияние на всё растение, снимая негативный эффект дефицита БС в мутантных линиях арабидопсис (Ефимова, 2011).

Наиболее изученные brassinosteroids относятся к группе лактонсодержащих (брасинолид, 24-эпибрасинолид, 28-гомобрасинолид) стероидных фитогормонов. Во многих работах показано их ростостимулирующее и защитное действие, что послужило основанием для создания на их основе агропрепаратов – «Эпин» (действующее вещество – ЭБЛ), «Эпин плюс» (композиция с лактонсодержащими БС – брасинолидом, 24-эпибрасинолидом и 28-гомобрасинолидом) (Аутко и др., 2010, Хрипач и др., 2015). Влияние экзогенных кетонсодержащих (кастастерона, 24-эпикастастерона, 28-гомокастастерона) БС, являющихся предшественниками лактонсодержащих (брасинолид, 24-эпибрасинолид, 28-гомобрасинолид) БС на растения, изучено слабо (Kolomeichuk *et al.*, 2021; Kovtun *et al.*, 2021).

Для дальнейших экспериментов мы применяли прикорневое гормональное воздействие, так как корень первым сталкивается с токсичным действием хлорида натрия, кроме того, внесение гормона в питательную среду позволяет строго контролировать его концентрацию в растворе. Из группы brassinosteroids были



выбраны представители БС ряда 24-эпиБС, которые присутствуют в растениях картофеля - лактон- (ЭБЛ) и кетонсодержащие (ЭПК) БС.

### 3.1.2. Влияние длительного воздействия brassinosteroidов на ростовые процессы растений картофеля в культуре *in vitro*

Экспериментально мы убедились в том, что добавление БС в питательную среду при его длительном воздействии стимулирует бактериальное загрязнение, в связи с чем, постановку подобного рода опытов проводили в стерильных условиях. С этой целью микрклоны картофеля выращивали 21 сутки в культуре *in vitro* на агаризованной среде с добавлением 10 или 1000 нМ БС после чего растения переносили на жидкую безгормональную 50% питательную среду МС (культура *in vivo*) на 19 суток. Длину осевых органов и количество листьев растений оценивали после выращивания в культуре *in vitro*, морфофизиологические показатели (длину осевых органов, число столонов и листьев, сырую и сухой массу целого растения) оценивали повторно, после 19 суток выращивания в культуре *in vivo*.

Полученные результаты показали, что присутствие БС в питательной среде замедляло рост как надземной, так и подземной частей растения (Рисунок 12). Наибольшее ингибирование отмечено при использовании ЭБЛ в концентрации 1000 нМ: рост стебля был подавлен в 2 раза (Рисунок 12А), корня – в 5 раз (Рисунок 12Б). Применение более низкой концентрации гормона – 10 нМ приводило к 2-х кратному подавлению роста только корня. Присутствие ЭПК в питательной среде, вне зависимости от концентрации, замедляло рост побега на 30%, однако негативный эффект на рост корня оказывала только концентрация 1000 нМ. После перемещения растений на жидкую безгормональную питательную среду (условия гидропоники – *in vivo*) почти все ростовые показатели растений восстанавливались до контрольных значений, при этом длина корня увеличилась относительно контрольного варианта, несмотря на то, что растения ранее были обработаны 1000 нМ ЭБЛ. Количество листьев уменьшалось в ответ на действие

ЭПК на этапе роста в культуре *in vitro*; и на этапе восстановления (в гидропонной культуре *in vivo*) при предварительном воздействии 1000 нМ ЭБЛ (Рисунок 12В).

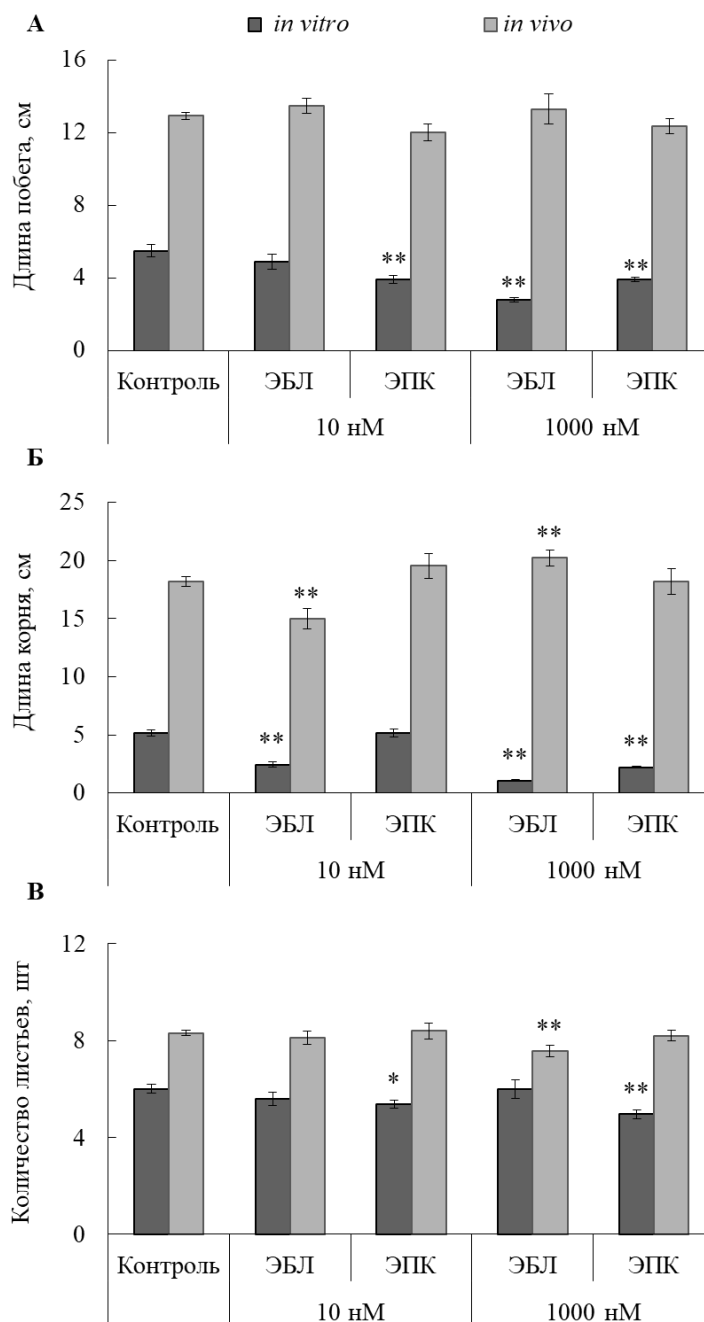


Рисунок 12. Влияние длительной обработки растений картофеля БС (10 и 1000 нМ) на длину побега (А), корня (Б) и число листьев (В). *in vitro* – фиксация растений после окончания этапа культивирования на агаризованной среде с БС; *in vivo* – фиксация растений после окончания этапа гидропонного выращивания на безгормональной среде. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

В исследованиях, проведённых нами ранее, было показано, что столоны формируются через 1-2 недели роста микроклонов в условиях гидропоники. Растения картофеля, выращенные на агаризованной среде с добавлением 10 нМ ЭПК, к окончанию третьего этапа роста характеризовались достоверно меньшим числом столонов (Рисунок 13).

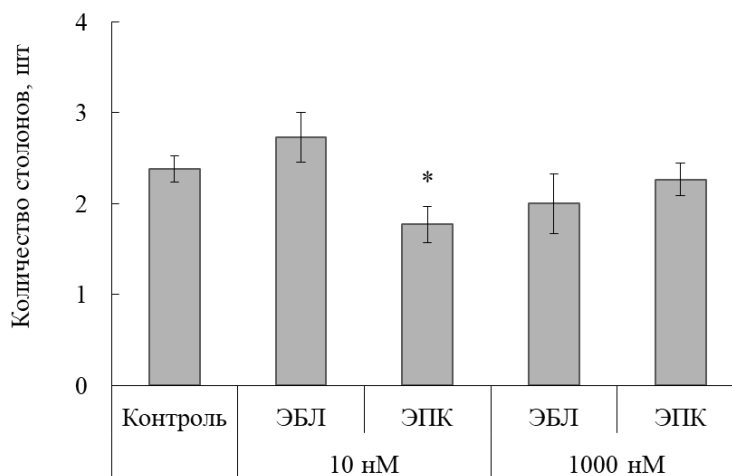


Рисунок 13. Влияние длительной обработки БС (10 и 1000 нМ) растений картофеля на число столонов (после окончания этапа гидропонного выращивания на безгормональной среде). \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о разнонаправленном ингибирующем действии длительной обработки БС на подземную часть растений. Так, 10 нМ снижал рост корня, а 10 нМ замедлял формирование столонов.

Длительное воздействие брассиностероидов не оказывало выраженного эффекта на накопление сырой и сухой массы (Рисунок 14А, Б) растений картофеля через 19 суток после прекращения действия БС. Исключением являлось достоверное снижение сырой (на 28%) и сухой (на 22%) массы растений в ответ на действие высокой концентрации лактонсодержащего БС.

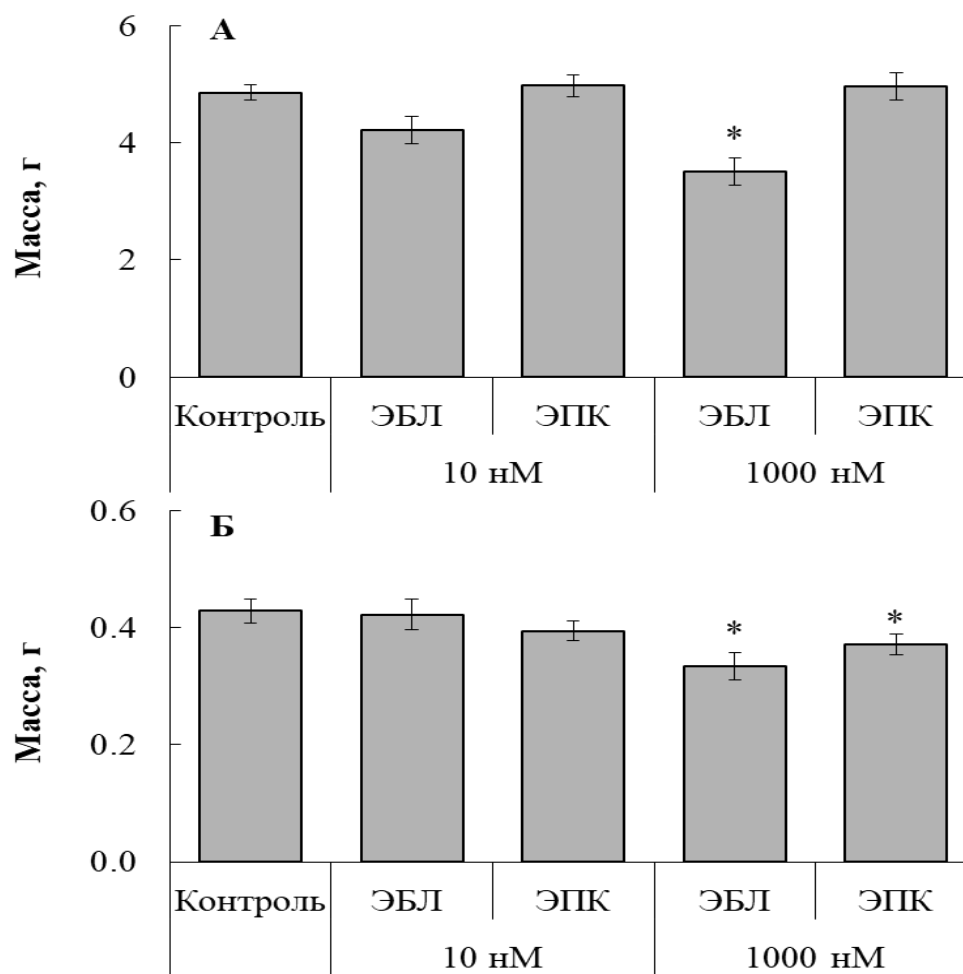


Рисунок 14. Влияние длительной обработки БС (10 и 1000 нМ) растений картофеля на накопление сырой (А) и сухой (Б) биомассы. Массу растений определяли через 19 дней после прекращения гормональной обработки и выращивания растений на жидкой питательной среде. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Содержание воды в разных частях растений картофеля (лист, стебель, корень) зависело от концентрации и химической структуры гормона (Таблица 5). Нами показано, что 1000 нМ ЭБЛ стимулировал оводненность тканей листа и корня; интересно, что аналогичная концентрация ЭПК, снижала процентное содержание воды в стебле, но увеличивала в корне. При этом стоит отметить, что более низкая концентрация брассиностероидов (10 нМ) не влияла на накопление воды в тканях растения картофеля.

Таблица 5. Влияние длительной обработки БС (10 и 1000 нМ) растений картофеля на процентное содержание воды (%) в тканях листа, стебля и корня (оводненность тканей оценивали после окончания этапа гидропонного выращивания растений в течение 19 дней на безгормональной среде)

Вариант		Лист	Стебель	Корень
<b>Контроль</b>		<b>87.17±0.55</b>	<b>92.43±0.16</b>	<b>92.98±0.18</b>
10 нМ	ЭБЛ	87.76±0.15	92.05±0.24	93.42±0.20
	ЭПК	87.47±0.35	92.35±0.19	92.99±0.20
1000 нМ	ЭБЛ	89.27±0.47 <sup>**</sup>	93.09±0.42	94.07±0.33 <sup>**</sup>
	ЭПК	86.75±0.32	91.41±0.30 <sup>**</sup>	93.49±0.13 <sup>*</sup>

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Таким образом, нами показано наиболее выраженное влияние длительного воздействия БС в концентрации 1000 нМ на рост растений картофеля через 19 суток после прекращения гормональной обработки. Так, действие лактонсодержащего БС проявлялось в удлинении корня, повышении оводненности тканей листа и корня, но, при этом, уменьшении числа листьев и, как следствие, общей массы растения. При этом, в отличие от ЭБЛ, ЭПК почти не оказывал влияния на ростовые параметры растений, что может свидетельствовать о меньшем эффекте кетон-БС на «память» микроклонов.

3.1.3. Воздействие длительной обработки растений картофеля в культуре *in vitro* ЭБЛ и ЭПК на содержание пигментов, функционирование фотосистемы II и другие физиологические параметры

На следующем этапе исследования нами было оценено влияние БС на некоторые физиологические параметры растений картофеля (содержание фотосинтетических пигментов, эффективность функционирования ФСII, содержание пролина, ТБК-АП и неорганических ионов, а также величина осмотического потенциала). Гормональная обработка проводилась в течение 21 дня во время выращивания растений на агаризованной среде, физиологические параметры измерялись через 19 суток роста растений на жидкой безгормональной среде.

Известно, что экзогенные brassinosteroids положительно регулируют процессы фотосинтеза, повышая содержание пигментов и эффективность процессов транспорта электронов второй фотосистемы (Siddiqui *et al.*, 2018a).

Как видно из рисунка 15, длительное воздействие 10 нМ БС проявлялось в регуляции содержания основных фотосинтетических пигментов (хлорофилла *b* и каротиноидов), спустя 19 суток после окончания гормональной обработки. При этом сравниваемые гормоны обнаруживали разнонаправленные эффекты. Стимулирующее действие на накопление хлорофилла *b* оказывал ЭБЛ, подавляющее – ЭПК. ЭБЛ не изменял содержание каротиноидов, в то время как ЭПК усиливал их накопление.

ЭБЛ (лактонсодержащий БС) в высокой концентрации (1000 нМ) вызывал достоверное уменьшение содержания хлорофилла *b* и каротиноидов, тогда как ЭПК (кетонсодержащий БС) не влиял на содержание пигментов (Рисунок 15).

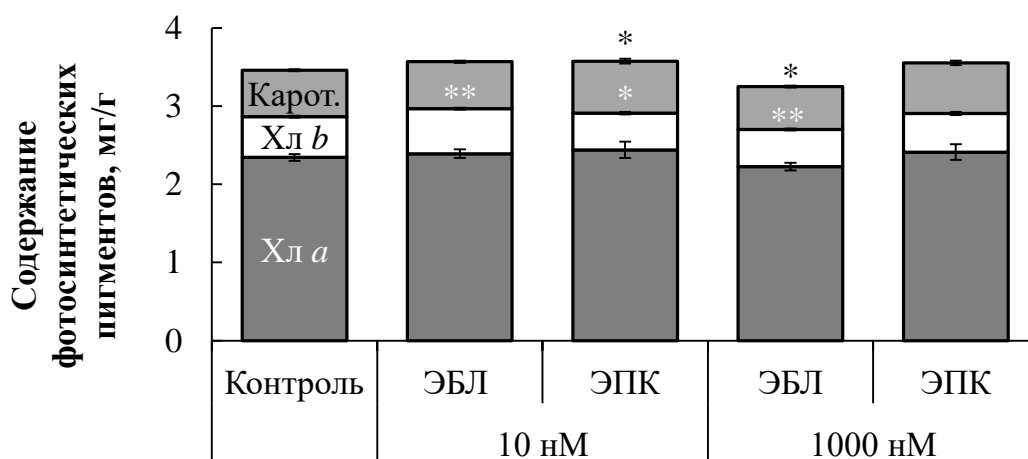


Рисунок 15. Влияние длительной обработки растений картофеля БС (10 и 1000 нМ) на содержание основных фотосинтетических пигментов (мг/г сырой массы). \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Известно, что для многих растений, обработанных ЭБЛ, характерно увеличение суммы зелёных пигментов (Siddiqui *et al.*, 2018b; 2019), которое достигается за счет изменения содержания хлорофилла *a* и/или *b*. Это, в свою

очередь, отражается на смещении соотношения хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* в сторону второго (Yuan *et al.*, 2012), либо в сторону первого (Sousa *et al.*, 2022).

В таблице 6 приведены соотношения [хлорофилла *a*]/ [хлорофиллу *b*] и [суммы зелёных пигментов]/ [каротиноидам]. Эти соотношения для контрольных растений составляли 4.54 и 4.84 соответственно. Все варианты экзогенного воздействия БС, за исключением 10 нМ ЭБЛ, демонстрировали преобладание хлорофилла *a* над хлорофиллом *b*. Также наблюдалось смещение соотношения в большую сторону для суммы зелёных пигментов относительно каротиноидов после длительного воздействия ЭБЛ и в меньшую сторону – после ЭПК, вне зависимости от их действующей концентрации.

Таблица 6. Влияние длительного воздействия ЭБЛ и ЭПК (10 и 1000 нМ) на соотношение основных фотосинтетических пигментов в листьях растений картофеля

Вариант	[Хлорофилл <i>a</i> ]/ [Хлорофилл <i>b</i> ]	([Хлорофилл <i>a</i> ] + [Хлорофилл <i>b</i> ]) / [Каротиноиды]
<b>Контроль</b>	<b>4.54±0.05</b>	<b>4.84±0.03</b>
10 нМ	ЭБЛ 4.16±0.09 <sup>**</sup>	4.95±0.04 <sup>*</sup>
	ЭПК 5.18±0.09 <sup>**</sup>	4.40±0.07 <sup>**</sup>
1000 нМ	ЭБЛ 4.69±0.04 <sup>*</sup>	4.93±0.05
	ЭПК 4.89±0.09 <sup>**</sup>	4.51±0.04 <sup>**</sup>

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Брассиностероиды увеличивают эффективность захвата света растениями, а также индуцируют транскрипцию генов и трансляцию ферментов, участвующих в биосинтезе хлорофилла (Behnamnia *et al.*, 2009). Это, очевидно, приводит к повышению эффективности фотосинтеза и, как следствие, к усилению синтеза ассимилятов (Siddiqui *et al.*, 2018b).

В связи, с чем мы оценивали эффективность работы фотосистемы II. Как следует из таблицы 7, выращивание растений на агаризованной питательной среде с 10 нМ БС в течение 21 суток увеличивает максимальный фотохимический квантовый выход (Fv/Fm). При этом наблюдается тенденция к повышению

коэффициента нефотохимического тушения (NPQ) в ответ на 10 нМ ЭБЛ и 1000 нМ ЭПК.

Таблица 7. Влияние длительного воздействия ЭБЛ и ЭПК (10 и 1000 нМ) на параметры фотосистемы II (%) растений картофеля

Вариант		qP	NPQ	Fv/Fm
<b>Контроль</b>		<b>100±3</b>	<b>100±8</b>	<b>100±1</b>
10 нМ	ЭБЛ	107±2	121±10	103±0 <sup>**</sup>
	ЭПК	104±2	93±8	103±0 <sup>**</sup>
1000 нМ	ЭБЛ	106±2	104±1	102±1
	ЭПК	102±1	123±2 <sup>*</sup>	101±0

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Далее мы оценивали влияние БС на степень перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Рисунок 16). Как следует из представленных данных, оба БС вне зависимости от химической структуры, в концентрации 1000 нМ активировали перекисное окисление липидов, примечательно, что ЭПК проявлял эффект в меньшей степени. Возможно, это свидетельствует о нарушении целостности мембран и формировании окислительного стресса.

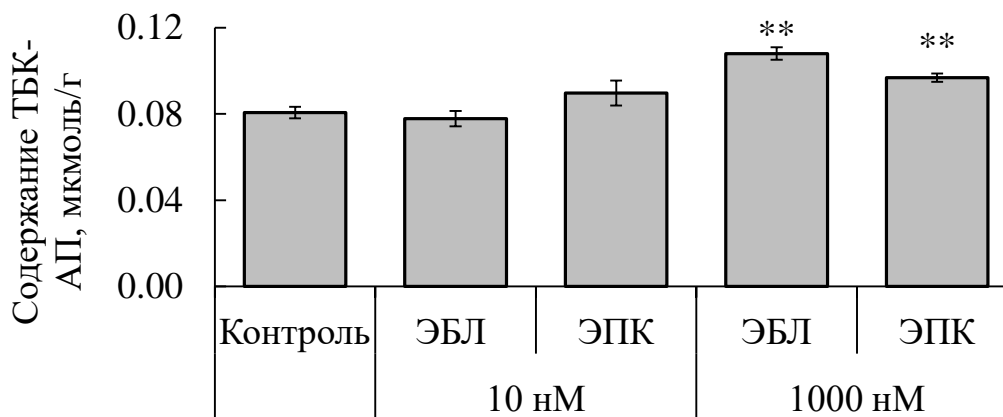


Рисунок 16. Влияние длительной обработки ЭБЛ и ЭПК (10 и 1000 нМ) на перекисное окисление липидов (ТБК-АП) в листьях растений картофеля. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

На накопление пролина ЭПК не оказывал влияния, вне зависимости от используемой концентрации. В то время как 10 нМ ЭБЛ повышал накопление



пролина на 38%, при этом, с увеличением концентрации гормона до 1000 нМ, его содержание возрастало на 76% относительно контроля (Рисунок 17).

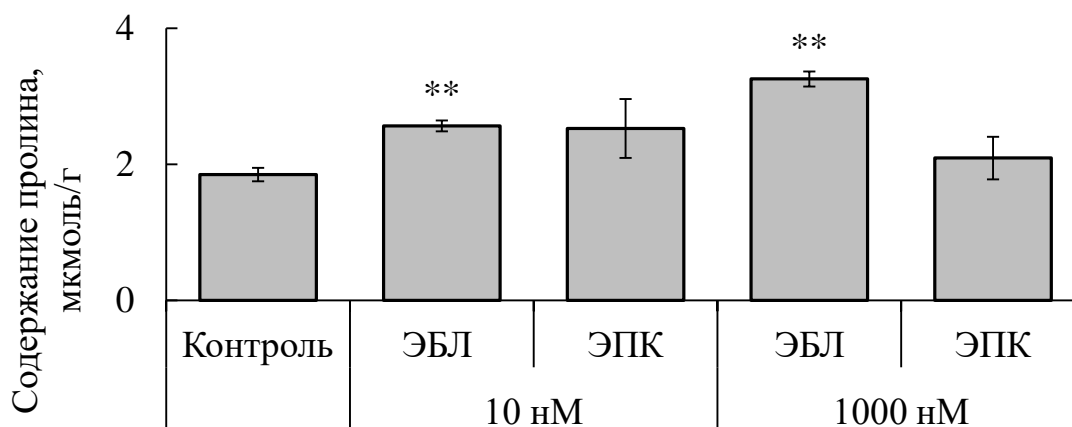


Рисунок 17. Влияние длительного воздействия ЭБЛ и ЭПК (10 и 1000 нМ) на содержание пролина в листьях растений картофеля. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Одновременно с изменением содержания пролина, экзогенный ЭБЛ понижал осмотический потенциал, достоверно только для 10 нМ, на 26%, а ЭПК, напротив, повышал на 13%, вне зависимости от действующей концентрации (Рисунок 18).

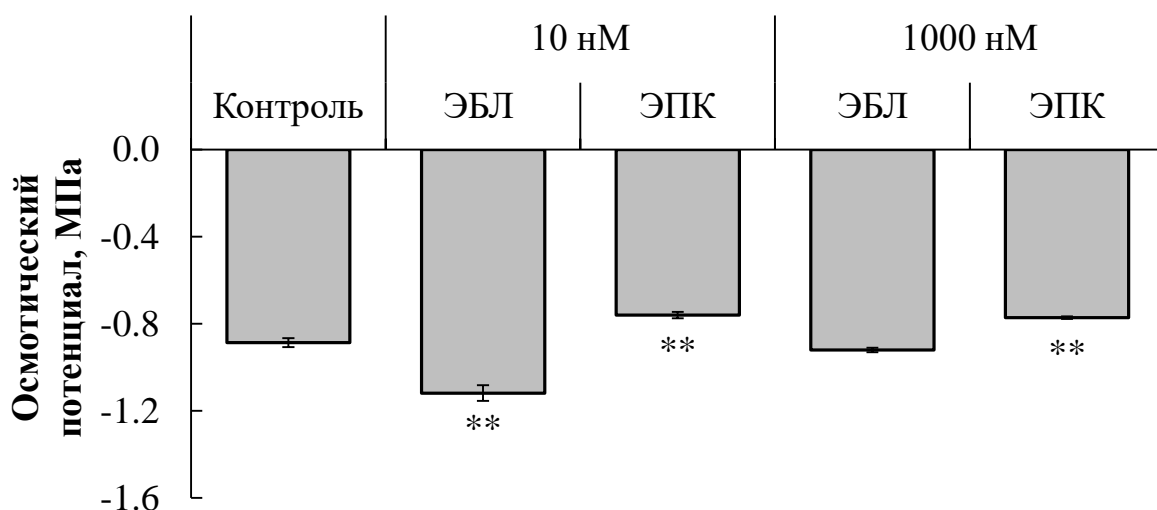


Рисунок 18. Влияние длительной обработки ЭБЛ и ЭПК (10 и 1000 нМ) на величину осмотического потенциала листьев растений картофеля \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Важным фактором, влияющим на величину осмотического потенциала, является аккумуляция растением неорганических ионов. В таблице 8 приведены значения содержания ионов натрия, калия, кальция и магния в ответ на длительное воздействие разных по структуре БС в концентрациях 10 и 1000 нМ, спустя 19 суток после окончания гормональной обработки.

Растения, обработанные ЭБЛ, накапливали дополнительно около 30% ионов натрия вне зависимости от используемой концентрации фитогормона. Одновременно с этим, воздействие 1000 нМ ЭБЛ в 2 раза снижало содержание ионов натрия в корнях. Длительное влияние ЭПК, напротив, снижало содержание ионов натрия (достоверно для 10 нМ) в листьях, а также незначительно в корнях. Поступление другого одновалентного иона – калия регулировалось только эпикастастероном, и было в листьях разнонаправленным относительно поступления натрия.

Таблица 8. Влияние длительной обработки ЭБЛ и ЭПК (10 и 1000 нМ) растений картофеля на содержание неорганических ионов (мг/г сухой массы, % от значений контрольного варианта)

Вариант	Натрий (Na)		Калий (K)		Кальций (Ca)		Магний (Mg)		
	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	
<b>Лист</b>									
<b>Контроль</b>	<b>0.33±0.06</b>	<b>100</b>	<b>49.95±0.22</b>	<b>100</b>	<b>2.89±0.17</b>	<b>100</b>	<b>1.92±0.21</b>	<b>100</b>	
10 нМ ЭБЛ	0.46±0.02*	139	51.85±2.81	104	2.69±0.15	93	2.17±0.12	113	
10 нМ ЭПК	0.19±0.01**	58	57.51±3.12*	115	2.74±0.15	95	2.15±0.12	112	
1000 нМ ЭБЛ	0.43±0.02*	131	49.06±2.66	98	3.76±0.20*	130	2.31±0.13	121	
1000 нМ ЭПК	0.41±0.02	124	42.60±2.31**	85	3.61±0.20*	125	2.15±0.12	112	
<b>Корень</b>									
<b>Контроль</b>	<b>0.82±0.18</b>	<b>100</b>	<b>43.28±6.97</b>	<b>100</b>	<b>2.81±0.47</b>	<b>100</b>	<b>2.27±0.24</b>	<b>100</b>	
10 нМ ЭБЛ	1.00±0.05	122	46.51±2.52	107	2.96±0.16	105	2.38±0.13	105	
10 нМ ЭПК	0.78±0.04	94	39.77±2.16	92	2.53±0.14	90	2.63±0.14	116	
1000 нМ ЭБЛ	0.41±0.02**	51	45.15±2.45	104	2.71±0.15	96	2.51±0.14	110	
1000 нМ ЭПК	0.70±0.04	86	39.57±2.15	91	2.69±0.15	96	2.54±0.14	112	

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Примечательно, что на накопление ионов кальция, очевидно, влияла не химическая структура БС, а используемая концентрация. Так, БС в концентрации

1000 нМ стимулировали накопление дополнительно 25-30% ионов кальция в листьях по сравнению с контрольными растениями. Что соответствует представлениям о действии БС на кальциевые каналы, как сообщалось в работе Straltsova с соавторами (2015), 24-эпибрассиолид, как и 24-эпикастастерон, в равной степени, стимулировали временное повышение содержания ионов кальция в цитозоле. При этом, вне зависимости от химической структуры и концентрации фитогормонов, через 19 суток после длительного воздействия БС эффект на содержание ионов магния не был выявлен.

Изменение накопления неорганических ионов в органах растений может быть обусловлено их избирательным межорганным транспортом. Мы рассчитали коэффициент селективного транспорта ионов калия и кальция относительно ионов натрия по формуле  $S_{K^+,Na^+} = [\text{соотношение ионов калия и натрия в листьях}] / [\text{соотношение ионов калия и натрия в корнях}]$  и  $S_{Ca^{++},Na^+} = [\text{соотношение ионов кальция и натрия в листьях}] / [\text{соотношение ионов кальция и натрия в корнях}]$  (Таблица 9).

Таблица 9. Влияние длительной обработки ЭБЛ и ЭПК (10 и 1000 нМ) растений картофеля на избирательный транспорт неорганических ионов

Вариант	$[K^+]/[Na^+]$ в листьях	$[K^+]/[Na^+]$ в корнях	$[Ca^{++}]/[Na^+]$ в листьях	$[Ca^{++}]/[Na^+]$ в корнях	$S_{K^+,Na^+}$	$S_{Ca^{++},Na^+}$	
<b>Контроль</b>	<b>151.36±6.51</b>	<b>52.73±2.11</b>	<b>8.76±0.34</b>	<b>3.42±0.13</b>	<b>2.87±0.21</b>	<b>2.56±0.19</b>	
10 нМ	ЭБЛ	113.26±4.87*	46.62±1.86*	5.88±0.23*	2.97±0.12*	1.98±0.07	
	ЭПК	300.05±9.96**	51.28±2.05	14.31±0.56**	3.26±0.12	5.85±0.50*	4.38±0.38**
1000 нМ	ЭБЛ	113.86±4.90*	108.81±4.35**	8.73±0.34	6.53±0.23**	1.05±0.08*	1.34±0.10**
	ЭПК	103.99±4.47**	56.16±2.25	8.80±0.34	3.82±0.16	1.85±0.07*	2.30±0.17

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* при  $p \leq 0.05$ .

ЭПК в концентрации 10 нМ увеличивал в 2 и 1.6 раз соотношения  $[K^+]/[Na^+]$  и  $[Ca^{++}]/[Na^+]$  в листьях, не влияя при этом на соотношения ионов в корнях. Соотношения  $[K^+]/[Na^+]$  и  $[Ca^{++}]/[Na^+]$  в корнях повышались в 2 и 1.9 при действии 1000 нМ ЭБЛ. Данные закономерности были обусловлены снижением содержания ионов натрия, примерно в 2 раза, в листьях (ЭПК) или корнях (ЭБЛ) и

отобразились на значениях коэффициентов селективного транспорта. Возможно, это демонстрирует способность растений, обработанных ЭПК, удерживать ионы натрия в структурах проводящих тканей стебля, предположительно за счёт функционирования семейства натрий-калиевых транспортеров НКТ. Ионы натрия из ксилемы транспортируются в паренхиму, что является одним из механизмов солеустойчивости (Horie *et al.*, 2005). В то время как, у обработанных ЭБЛ растений дополнительно усиливался отток ионов натрия по ксилеме из корня.

ЭПК в концентрации 1000 нМ, в большей степени, из всех вариантов длительного воздействия, снижал соотношение ионов калия к натрию в листьях, что отображалось достоверным снижением  $S_{K^+,Na^+}$ . И, возможно, было вызвано уменьшением специфичности калиевых каналов и транспортом по ним ионов натрия. Остальные три соотношения были минимальными при 10 нМ ЭБЛ. Что обуславливалось равным повышением содержания  $Na^+$  корнях и листьях и не отображалось на коэффициентах межорганного транспорта.

Ранее, по литературным данным, была обнаружена способность brassinosterоидов, изменять уровень экспрессии генов семейства *OsHKT* для растений риса (Hussain *et al.*, 2022). К окончанию шестичасового воздействия БС отмечено накопление транскриптов части генов (*OsHKT1*, 3, 4, 7) а также снижение экспрессии *OsHKT8*. В связи с чем, мы предполагаем, что длительное воздействие 10 нМ ЭПК и 1000 нМ ЭБЛ могло способствовать значительному накоплению транскриптов  $K^+/Na^+$  транспортёров.

Таким образом, длительное (21 сутки) воздействие ЭБЛ и ЭПК на растения картофеля в культуре *in vitro* оказывало малозначительный эффект на ростовые процессы. Растения, обработанные БС, после переноса на безгормональную среду в целом восстанавливали ростовые показатели через 19 суток. При этом изменяли суммарное содержание фотосинтетических пигментов, за счёт каротиноидов и хлорофилла *b* (Рисунок 19). Эффективность ФС II (Fv/Fm) в результате гормональной обработки (10 нМ) была достоверно выше. Длительное воздействие ЭБЛ (10 нМ) и ЭПК (1000 нМ) на растения сопровождалось увеличением

коэффициента нефотохимического тушения (NPQ). ЭБЛ стимулировал дополнительное накопление ионов натрия в тканях листа и осмопротектора пролина и, как следствие, вызывал снижение осмотического потенциала. ЭПК, напротив, регулировал в большей степени селективность поступления одновалентных ионов, в зависимости от используемой концентрации фитогормона, и не оказывал влияния на накопление осмопротектора, вызывая повышение осмотического потенциала.

Высокая концентрация сравниваемых БС усиливала интенсивность ПОЛ и накопление ионов кальция, что может свидетельствовать о формировании окислительного стресса.

Представленные в обобщенной форме данные (Рисунок 19) позволяют предположить, что длительное воздействие БС оказывало разнонаправленный эффект в зависимости от химической структуры гормона.

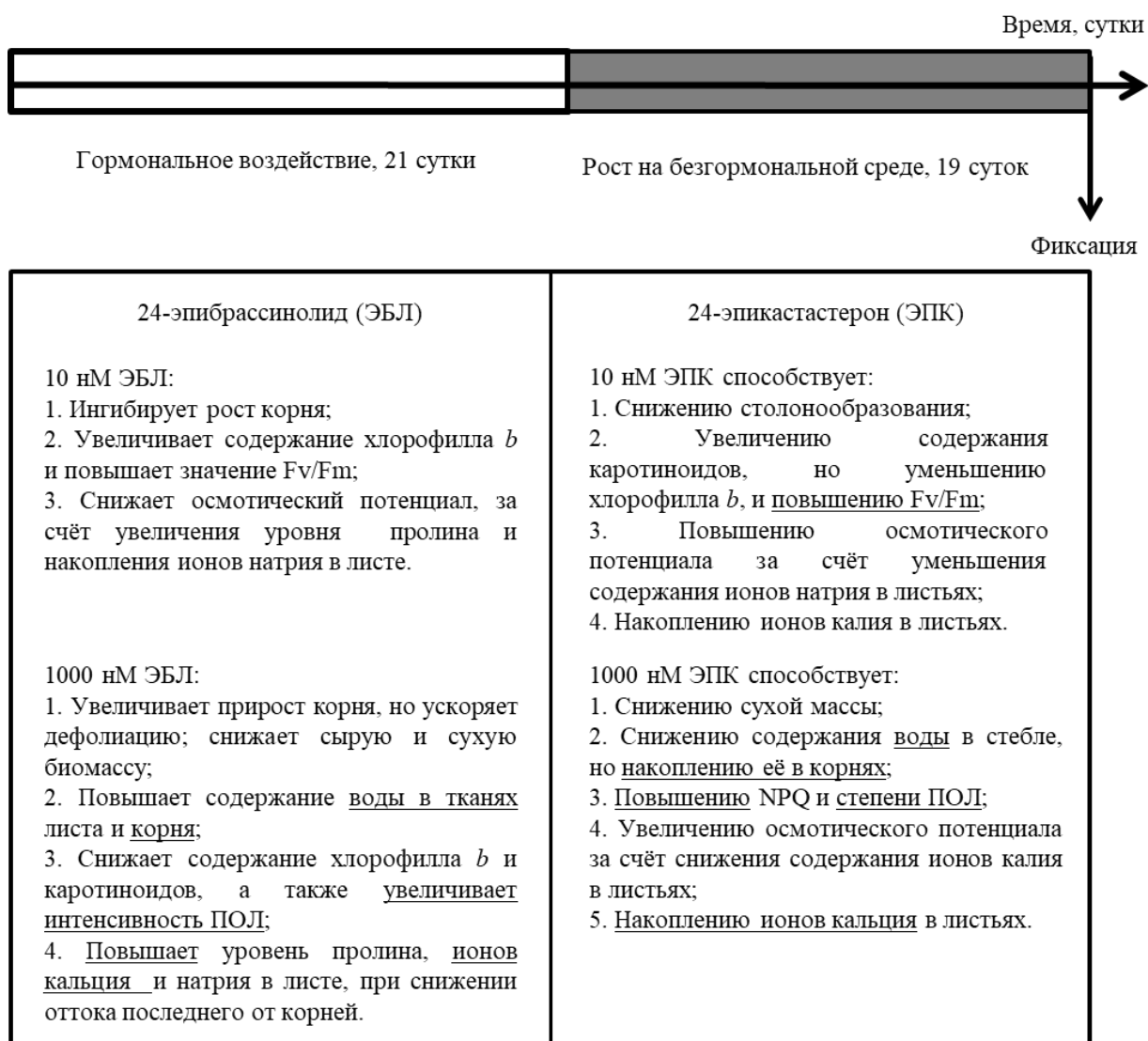


Рисунок 19. Схематическое изображение действия 10 нМ и 1000 нМ БС.

Так, ЭБЛ регулировал осмотический статус растений, но при этом способствовал снижению содержания фотосинтетических пигментов. В то время как, влияние ЭПК на растения картофеля через 19 суток после прекращения воздействия был менее выражен. ЭПК, в отличие от ЭБЛ, повышал осмотический потенциал и увеличивал содержание пигментов. При этом выявлены общие эффекты экзогенного внесения БС, в зависимости от действующей концентрации. При 10 нМ наблюдалось повышение максимального квантового выхода второй фотосистемы, а при 1000 нМ – повреждение мембран и нагнетание вторичного посредника – ионов кальция в листьях.

### 3.1.4. Влияние кратковременного действия 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона на ростовые процессы растений картофеля в культуре *in vivo*

Оценку кратковременного воздействия брассиностероидов, различающихся по химической структуре – ЭБЛ и ЭПК, мы проводили на растениях картофеля после их микроклонального культивирования (1 этап, 21 сутки) и адаптации к гидропонным условиям выращивания (2 этап, 19 суток). Цель проведения данной серии экспериментов заключалась в том, чтобы выявить быстрые ответные реакции растений картофеля на воздействие различающихся по химической структуре брассиностероидов. Для подбора оптимальных условий гормонального воздействия, нами были оценены, прежде всего, ростовые реакции растений (длины осевых органов, число узлов, столонов и листьев, сухая и сырая масса целого растения) при разных концентрациях (0.1, 10 или 1000 нМ) гормонов в зависимости от продолжительности обработки (1, 4 или 12 часов).

Полученные данные показали, что кратковременное воздействие БС приводило к стимуляции роста надземной части растений картофеля (Рисунок 20А). ЭБЛ стимулировал рост побега в низких концентрациях – 0.1 и 10 нМ в течение 4 или 12 часов воздействия или в высокой концентрации (1000 нМ) при сокращении длительности обработки до 1 или 4 часов.

Влияние ЭПК на рост побега при 1 и 4 часах обработки (Рисунок 20Б) проявлялось в меньшей степени, чем у ЭБЛ, и зависело от концентрации гормона. В данном случае, с увеличением продолжительности экспозиции, ростостимулирующий эффект ЭПК при концентрациях 0.1 и 10 нМ сохранялся. Длительное (12-часовое) воздействие эпикастастерона, как и эпибрассинолида в концентрации 1000 нМ не сопровождалось стимуляцией роста.

Максимальный эффект ЭБЛ на рост побега (24%) был отмечен для концентрации гормона 0.1 нМ при 12-часовом воздействии или 1000 нМ при 1-часовой обработке растений. В случае с ЭПК наибольший прирост (27-29%) побега наблюдался при обработке растений растворами низких концентраций гормона (0.1 и 10 нМ) в течение 12 часов или 0.1 нМ в течение 4 часа.

Вне зависимости от действующей концентрации и продолжительности обработки, БС вызывали подавление роста корня. Наибольшее ингибирование (на 19-21%) для ЭБЛ было отмечено при низких концентрациях (0.1 и 10 нМ) и одночасовом воздействии (Рисунок 20В), в то время как для ЭПК (на 18-22%) аналогичный эффект наблюдался при 10 нМ (1 час экспозиции) или 1000 нМ и более длительном (12-часовом) воздействии (Рисунок 20Г).

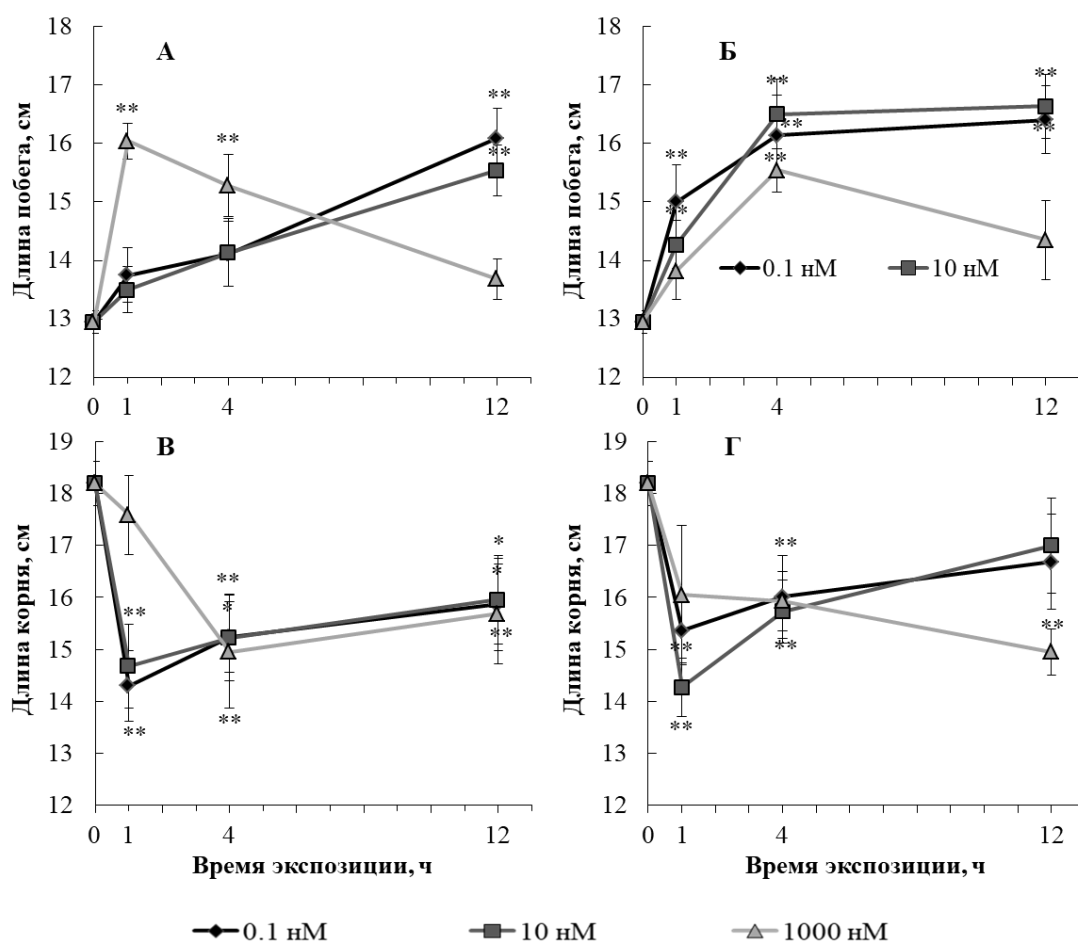


Рисунок 20. Кратковременное воздействие 24-эпибрасинолида (А, В) и 24-эпикастостерона (Б, Г) на длину побега (А, Б) и корня (В, Г) у растений картофеля. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Основным показателем продуктивности растений картофеля является количество образовавшихся клубней, однако мы оценивали продуктивность по числу столонов, поскольку исследовали молодые растения.



Сохранение и незначительное превышение числа столонов относительно контрольного варианта отмечено для нескольких сочетаний гормональной обработки: 0.1 нМ ЭБЛ (4 или 12 часов) и 1000 нМ (1 час), а также 1000 нМ ЭПК (1 или 4 часа) и 0.1 нМ (1 час) (Рисунок 21).

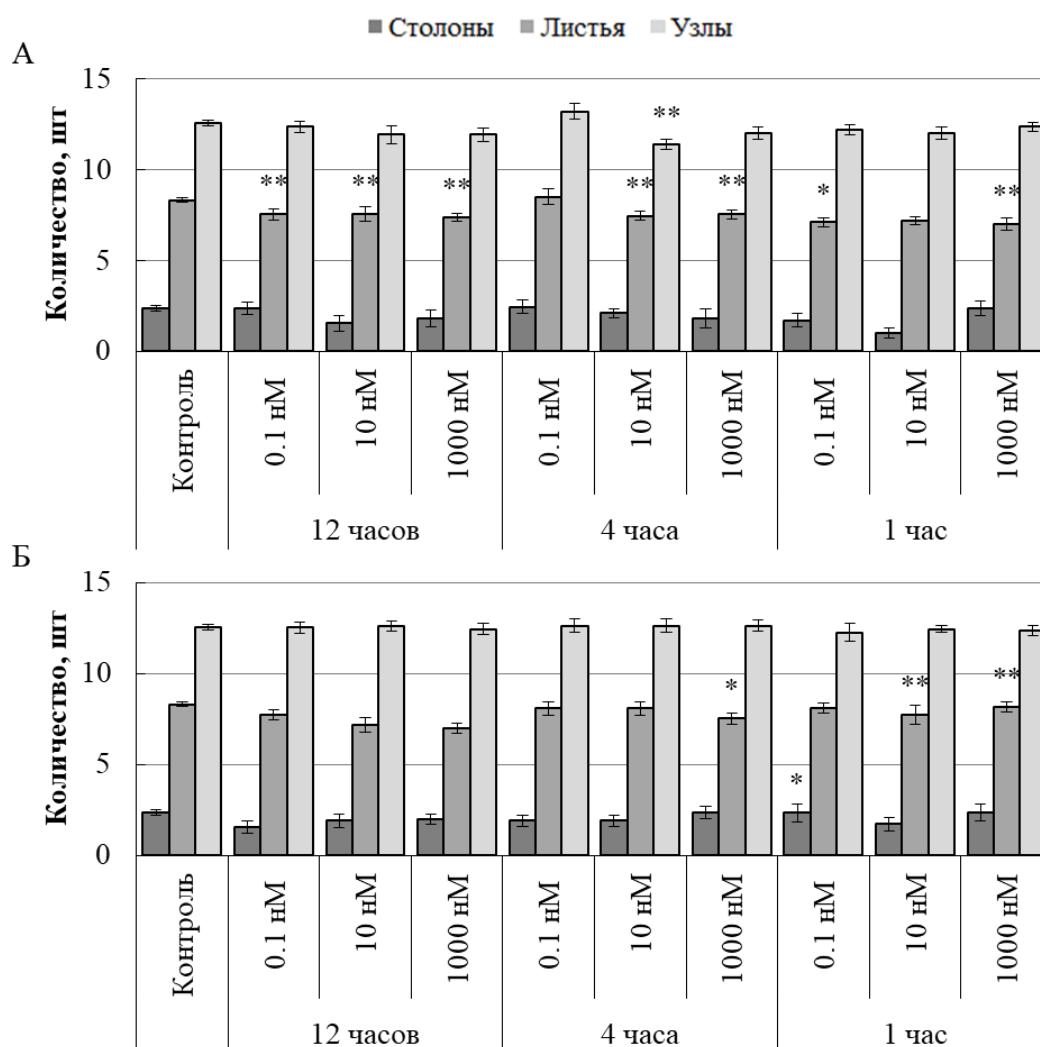


Рисунок 21. Влияние кратковременного воздействия ЭБЛ (А) и ЭПК (Б) БС на количество столонов, листьев и узлов растений картофеля. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Следует также отметить, что кратковременное воздействие БС на растения картофеля вызывало дефолиацию, в результате которой число листьев сокращалось примерно на 16% при сохранении количества узлов на побеге (Рисунок 21). Наименьшее число листьев было характерно для растений, подвергнутых влиянию

ЭБЛ вне зависимости от концентрации гормона и продолжительности воздействия, или ЭПК только при длительном (12-ти часовом) воздействии в высоких концентрациях (10 нМ и 1000 нМ).

Воздействие гормона на накопление сырой массы растений определялось химической структурой, концентрацией и продолжительностью обработки экзогенными БС (Рисунок 22). Высокая концентрация ЭБЛ (1000 нМ) стимулировала увеличение массы растения на 11, 18 и 21% при 12, 4 и 1 часе воздействия соответственно, тогда как низкая концентрация этого гормона не оказывала эффекта. Стимулирующее влияние ЭПК на массу растения обнаруживалось при 10 нМ. Этот эффект усиливался с увеличением продолжительности экспозиции от 20% при 1-часовом до 30% при 4-и 12-часовом воздействии. При концентрации 1000 нМ ЭПК биомасса растений была минимальной.

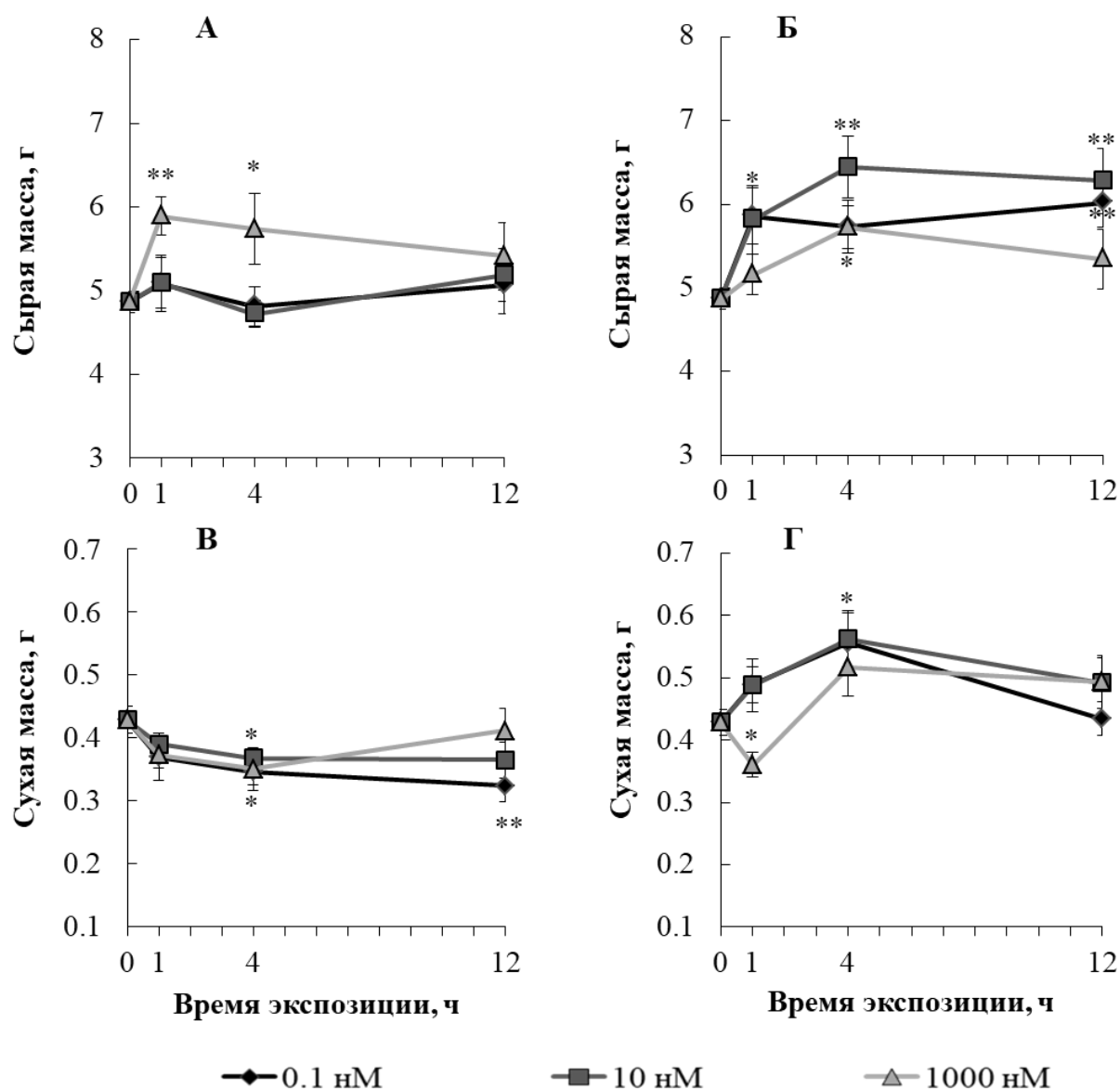


Рисунок 22. Влияние кратковременной экспозиции растений картофеля на растворах ЭБЛ (А, В) и ЭПК (Б, Г) на накопление сырой (А, Б) и сухой (В, Г) биомассы. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Обнаруженный эффект ЭБЛ на накопление биомассы, скорее всего, был, достигнут за счёт увеличения оводнённости тканей растений, о чем свидетельствуют представленные ниже данные (Таблица 10), в то время как, ЭПК, напротив, стимулировал накопление сухой массы растений (Рисунок 22В, 22Г).

Таблица 10. Влияние кратковременного воздействия БС на общую сырую массу и на содержание воды (%) в разных частях растения картофеля

Вариант воздействия	Содержание воды		
	Лист	Стебель	Корень
<b>Лактон-БС – 24-эпибрасинолид</b>			
<b>Контроль</b>	<b>87.17±0.55</b>	<b>92.43±0.16</b>	<b>92.98±0.18</b>
1 час	0.1 нМ	87.37±0.28	91.56±0.53
	10 нМ	87.67±0.36	91.72±0.61
	1000 нМ	88.99±0.28**	93.69±0.13**
4 часа	0.1 нМ	87.95±0.25	92.27±0.77
	10 нМ	87.24±0.31	90.96±0.46**
	1000 нМ	88.48±1.36	93.96±0.25**
12 часов	0.1 нМ	88.74±0.22*	93.24±0.19**
	10 нМ	88.10±0.29	92.66±0.29
	1000 нМ	87.11±0.28	90.91±0.40**
<b>Кетон-БС – 24-эпикастастерон</b>			
<b>Контроль</b>	<b>87.17±0.55</b>	<b>92.43±0.16</b>	<b>92.98±0.18</b>
1 час	0.1 нМ	87.51±0.28	91.26±0.47*
	10 нМ	87.74±0.24	91.66±0.31*
	1000 нМ	91.56±0.67**	91.50±0.39*
4 часа	0.1 нМ	87.81±0.39	92.71±0.32
	10 нМ	87.26±0.39	92.82±0.25
	1000 нМ	86.91±0.70	92.18±0.29
12 часов	0.1 нМ	87.80±0.32	92.50±0.32
	10 нМ	87.70±0.33	92.99±0.17*
	1000 нМ	85.96±0.59	90.67±0.42**

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при кратковременном воздействии гормона наибольшим стимулирующим эффектом на ростовые характеристики растений картофеля обладал ЭБЛ, который значительно усиливал рост побега, накопление биомассы и повышал оводненность тканей (после одночасовой экспозиции). ЭПК оказывал максимальный эффект на ростовые процессы и оводненность тканей только при 4-х часовой обработке растений (Рисунки 20-22, Таблица 10).

### 3.1.5. Влияние кратковременной обработки растений картофеля ЭБЛ и ЭПК в культуре *in vivo* на экспрессию генов биосинтеза БС

Для определения уровня экспрессии генов биосинтеза brassinosteroidов (*CYP 450 90A1*, *CYP 450 85A1*, *CYP 450 90B1* и *DET2*), в зависимости от продолжительности гормональной обработки (1, 4 или 12 часа), мы применяли ЭБЛ и ЭПК в самой высокой из исследуемых концентраций – 1000 нМ. Выбор концентрации был обусловлен максимально разнонаправленным эффектом в зависимости от продолжительности экспозиции.

Продукты генов *CYP 450 90A1* и *DET2* функционируют на начальных стадиях биосинтеза brassinosteroidов. На следующих этапах в биосинтез вовлекается продукт гена *CYP 450 90B1* (*DWARF4*). Полученные данные показывают, что максимальное накопление транскриптов данных генов характерно для растений, обработанных фитогормонами в течение четырёх часов (Таблица 11). При этом ингибирование экспрессии гена *CYP 450 90 B1* наблюдалось, спустя 5 суток после окончания двенадцатичасовой обработки растений гормонами.

Таблица 11. Изменение уровней транскриптов (% от значения контрольного варианта) генов биосинтеза brassinosteroidов в зависимости от продолжительности воздействия (1, 4, 12 часов) и химической структуры гормонов (ЭБЛ и ЭПК)

Вариант	<i>CYP 450 90 A1</i>	<i>CYP 450 85 A1</i>	<i>CYP 450 90 B1</i>	<i>DET2</i>
<b>Контроль</b>	<b>100±3</b>	<b>100±6</b>	<b>100±6</b>	<b>100±2</b>
1000 нМ ЭБЛ	1 час	116±2 <sup>**</sup>	178±5 <sup>**</sup>	100±5
	4 часа	117±4 <sup>*</sup>	256±5 <sup>**</sup>	104±4
	12 часов	116±5 <sup>*</sup>	122±7 <sup>*</sup>	84±4 <sup>**</sup>
1000 нМ ЭПК	1 час	123±3 <sup>**</sup>	237±6 <sup>**</sup>	134±6
	4 часа	137±4 <sup>**</sup>	292±6 <sup>**</sup>	116±5
	12 часов	120±4 <sup>**</sup>	161±5 <sup>**</sup>	91±11

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Продукт гена *CYP 450 85A1* участвует в заключительной стадии биосинтеза brassinosteroidов, в том числе в окислительной реакции превращения кетон-БС

(кастастерона) в лактон-БС (брасинолид). Уровень транскриптов данного гена возрастал более чем в 2 раза после одночасового воздействия ЭПК. Стимулирующий эффект гормонов на экспрессию данного гена сохранялся и после 4-х часовой обработки растений. В данном случае уровень матриц повышался в 2.6 и в 2.9 раза при обработке растений ЭБЛ и ЭПК соответственно (Таблица 11).

Наибольшее накопление транскриптов генов биосинтеза БС происходило при четырёх часовом воздействии ЭБЛ и ЭПК (за исключением *DWARF4*).

Физиологические показатели растений картофеля (содержание пигментов, неорганических ионов, осмолитов; динамика интенсивности ПОЛ и уровень пролина) мы оценивали через 1, 3 и 5 суток после воздействия ЭБЛ и ЭПК (0.1 нМ, продолжительность 4 часа). Данная концентрация гормонов применялась нами на основании выраженного ее ростостимулирующего влияния, наряду с 10 нМ (Рисунки 20-22), в то время как 1000 нМ могла приводить к ингибирующему эффекту (Рисунки 20В, 20Г, 21А). Продолжительность экспозиции растений на гормонах в течение 4 часов была достаточна, чтобы инициировать стимулирующие эффекты, в то время, как 12-ти часовое воздействие не приводило к выраженным ответным реакциям по сравнению с 4-х часовой обработкой или, наоборот, способствовало подавлению ростовых процессов (Рисунки 20Б-20Г, 22Б, 22Г).

3.1.6. Влияние кратковременного воздействия ЭБЛ и ЭПК на содержание пигментов, эффективность фотосистемы II, активность антиоксидантных ферментов и другие физиологические параметры растений картофеля в культуре *in vitro*

Сравнение кратковременного воздействия БС, различающихся по химической структуре (ЭБЛ и ЭПК), мы проводили на растениях картофеля после их микроклонального культивирования (1 этап, 21 сутки) и адаптации к гидропонным условиям выращивания (2 этап, 19 суток). Перед третьим этапом роста в питательную среду добавляли 0.1 нМ ЭБЛ или ЭПК на 4 часа, после чего растения картофеля переносили в новые сосуды с безгормональной средой (50%

МС). Концентрация гормонов и продолжительность обработки были выбраны на основании представленных в предыдущем разделе результатов. Физиологические показатели (содержание пролина и ТБК-АП) оценивали в суточной динамике на 1, 3 и 5 сутки, содержание фотосинтетических пигментов, неорганических ионов, величину осмотического потенциала и активность антиоксидантных ферментов, а также функционирование ФСII изучали после 5 суток с момента окончания гормонального воздействия.

При кратковременном воздействии (4 ч) ЭБЛ и ЭПК снижали интенсивность ПОЛ на 50 и 40% соответственно по сравнению с контрольными растениями, спустя сутки после воздействия гормона (Рисунок 23А). С увеличением продолжительности периода после окончания гормональной обработки обнаруженный эффект БС снижался; на третьи сутки после действия ЭПК и на пятые сутки после обработки растений ЭБЛ, ПОЛ было ниже контрольных значений на 20%.

Профиль накопления пролина через 1, 3 и 5 суток после гормонального воздействия представлен на рисунке 23Б. Показано, что ЭБЛ, как и ЭПК, в равной степени (на 55%), снижали уровень пролина через сутки. Однако через 3 и 5 суток содержание пролина увеличивалось, степень изменений определялась химической структурой гормона. Так, через трое суток после окончания воздействия ЭПК, уровень пролина превышал контрольные значения на 23%, тогда как в случае с ЭБЛ уровень пролина был ниже контрольных значений на 25%. При этом, через пять суток после окончания гормональной обработки, содержание пролина было на 60-90% выше, чем у контрольных растений вне зависимости от структуры БС.

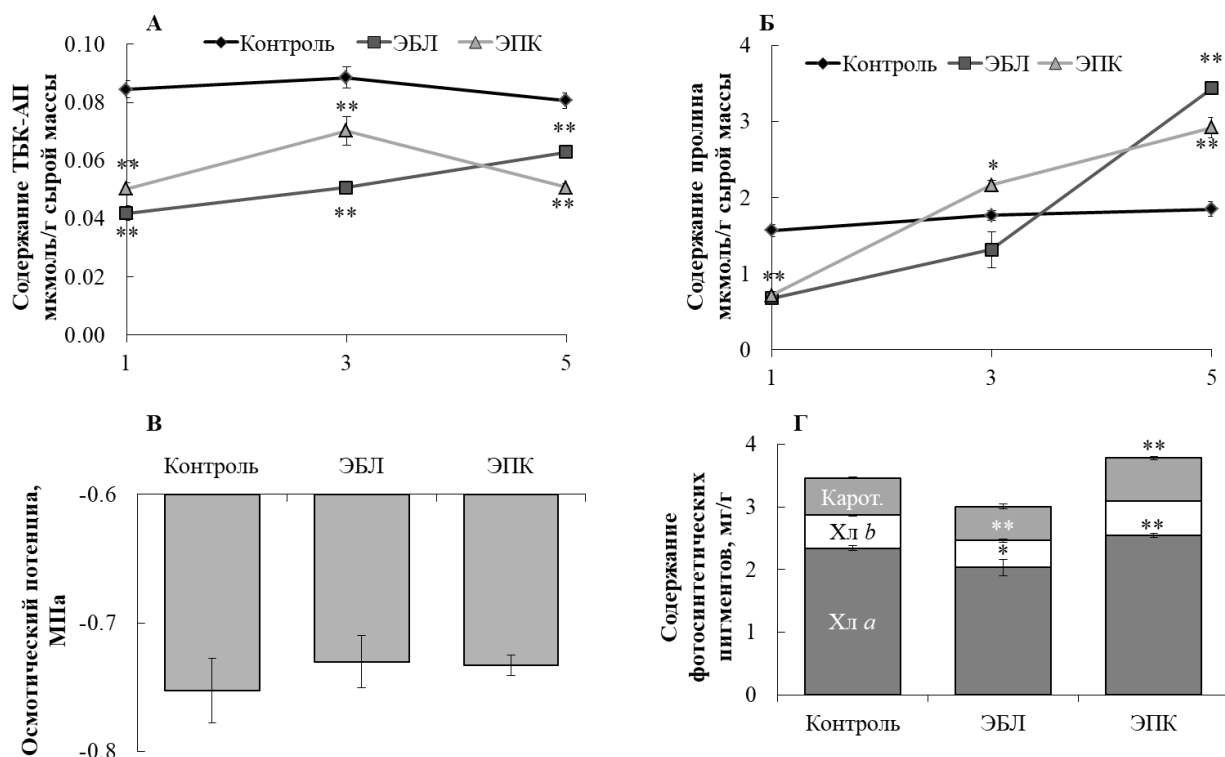


Рисунок 23. Кратковременное воздействие ЭБЛ и ЭПК (4 часа в концентрации 0.1 нМ) на содержание ТБК-АП (А), пролина (Б), фотосинтетических пигментов (Г) и величину осмотического потенциала (В). \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Несмотря на стимулирующее влияние БС на содержание пролина через 5 суток после прекращения гормональной обработки, эффект ЭБЛ и ЭПК не отражался на величине осмотического потенциала клеточного экссудата листьев (Рисунок 23В).

В то же самое время суммарное содержание пигментов (Рисунок 23Г) в растениях, обработанных ЭБЛ, сокращалось на 13% за счёт достоверного снижения уровня накопления зелёных пигментов (хлорофиллов *a*, *b*), а, обработанных ЭПК возрастало из-за роста содержания хлорофилла *a* и каротиноидов.

Кратковременное (4 часа) воздействие БС практически не влияло на накопление неорганических ионов в тканях растений (натрия, калия, кальция, магния) (Таблица 12). Через пять суток после окончания обработки растений



фитогормонами вне зависимости от их химической структуры наблюдалось достоверное снижение содержания только ионов калия в листьях на 15-25%. Кроме того, ЭПК повышал содержание ионов магния в листьях на 20%, что могло быть важно для накопления хлорофилла *a*. В ответ на кратковременное воздействие ЭБЛ наблюдалось тенденция к увеличению содержания ионов натрия в листьях.

Таблица 12. Влияние кратковременной обработки растений 0.1 нМ ЭБЛ и ЭПК на накопление неорганических ионов (мг/г сухой массы, % от контрольных значений)

Вариант	Натрий (Na)		Калий (K)		Кальций (Ca)		Магний (Mg)	
	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%
<b>Лист</b>								
<b>Контроль</b>	<b>0.33±0.08</b>	<b>100</b>	<b>49.95±0.22</b>	<b>100</b>	<b>2.89±0.17</b>	<b>100</b>	<b>1.92±0.21</b>	<b>100</b>
ЭБЛ	0.44±0.03	133	37.71±1.47**	76	3.18±0.18	110	2.03±0.12	106
ЭПК	0.34±0.02	102	42.32±1.65*	85	3.35±0.19	116	2.31±0.09*	120
<b>Корень</b>								
<b>Контроль</b>	<b>0.82±0.18</b>	<b>100</b>	<b>43.28±6.97</b>	<b>100</b>	<b>2.81±0.47</b>	<b>100</b>	<b>2.27±0.24</b>	<b>100</b>
ЭБЛ	0.88±0.09	107	41.44±2.40	96	3.44±0.13	122	2.37±0.09	104
ЭПК	0.83±0.03	101	47.43±2.76	110	2.98±0.12	106	2.47±0.10	109

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Полученные данные позволяют оценить возможное влияние БС на межорганную транслокацию ионов (Таблица 13).

Таблица 13. Кратковременное воздействие 0.1 нМ ЭБЛ и ЭПК на межорганный транспорт неорганических ионов

Вариант	В листьях		В корнях		$S_{K^+,Na^+}$	$S_{Ca^{++},Na^+}$
	$[K^+]/[Na^+]$	$[Ca^{++}]/[Na^+]$	$[K^+]/[Na^+]$	$[Ca^{++}]/[Na^+]$		
<b>Контроль</b>	<b>151.36±8.20</b>	<b>8.76±0.47</b>	<b>52.73±2.80</b>	<b>3.42±0.19</b>	<b>2.87±0.21</b>	<b>2.56±0.19</b>
ЭБЛ	85.91±4.57**	7.25±0.39*	47.20±2.52**	3.92±0.25	1.82±0.10**	1.85±0.10**
ЭПК	125.87±6.75*	9.96±0.53	57.20±3.06	3.59±0.27	2.20±0.12*	2.77±0.15

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Соотношения ионов в разных органах изменялись в зависимости от химической структуры используемых для обработки растений фитогормонов. Так,

кратковременное воздействие 0.1 нМ ЭБЛ снижало соотношения  $[K^+]/[Na^+]$  и  $[Ca^{++}]/[Na^+]$  в листьях и  $[K^+]/[Na^+]$  в корнях. Данные изменения затрагивали коэффициент селективного транспорта, что свидетельствует о смещении направленности транспорта ионов калия и кальция в сторону подземной части растений, а ионов натрия к листьям. ЭПК в меньшей степени, чем ЭБЛ, снижал отношение  $[K^+]/[Na^+]$  в листьях, не влияя на величину остальных анализируемых соотношений ионов. При этом показано снижение  $S_{K^+,Na^+}$ , и обусловлено это было только оттоком ионов калия по флоэме, что некоторыми исследователями определяется как сигнал для корневой системы от побега (Saibi, Brini, 2021).

Для растений, полученных из семян, обработанных 24-эпибрассиностероидом или 24-эпикастастероном, часто демонстрируют повышение антиоксидантного статуса в отсутствие стрессора (Kolomeichuk *et al.*, 2021; Gupta, Seth, 2022). В связи с чем, мы исследовали влияние кратковременного воздействия ЭБЛ и ЭПК на активность антиоксидантных ферментов. Как следует из представленных данных в Таблице 14, обработка растений фитогормонами значительно повышала активность СОД. Более эффективным гормоном, в данном случае, оказался ЭБЛ, который в 3.7 раза повысил активность фермента, спустя 5 суток после окончания гормональной обработки.

Таблица 14. Влияние кратковременного (4 часа) воздействия 0.1 нМ ЭБЛ и ЭПК на активность супероксиддисмутазы (СОД) и гваякол-зависимой пероксидазы

Вариант	Активность СОД,		Активность пероксидазы,	
	усл.ед./мг.белка	%	усл.ед./мг.белка в мин.	%
<b>Контроль</b>	<b>8.99±0.76</b>	<b>100</b>	<b>0.45±0.05</b>	<b>100</b>
ЭБЛ	33.16±2.62 <sup>**</sup>	369	0.88±0.30	194
ЭПК	26.08±4.68 <sup>**</sup>	290	0.55±0.18	122

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Полученные нами данные относительно кратковременного воздействия ЭБЛ и ЭПК на рост и физиологические показатели растений (Рисунок 23) частично согласуются с ранее опубликованными результатами. Так, нами ранее было показано снижение перекисного окисления липидов и содержания пролина, а также

повышение активности антиоксидантных ферментов в растениях рапса (Efimova *et al.*, 2014, Kolomeichuk *et al.*, 2021) и картофеля (Ефимова и др., 2018а, Kolomeichuk *et al.*, 2020) в ответ на обработку БС как в норме, так и при стрессе.

Нами впервые проведён сравнительный анализ длительного (на ранних этапах роста микроклонов в условии *in vitro*) и кратковременного (на более поздних этапах роста растений в гидропонной культуре) действия ЭБЛ и ЭПК на растениях картофеля (сорта Луговской). Показано наличие регуляторного эффекта brassinosterоидов через 19 (длительное) и 5 (кратковременное) суток после прекращения их воздействия, что свидетельствует о наличии у гормонов отсроченного биологического эффекта. Направленность и интенсивность проявления действия сравниваемых гормонов определялись химической структурой и концентрацией БС как при длительном, так и кратковременном воздействии.

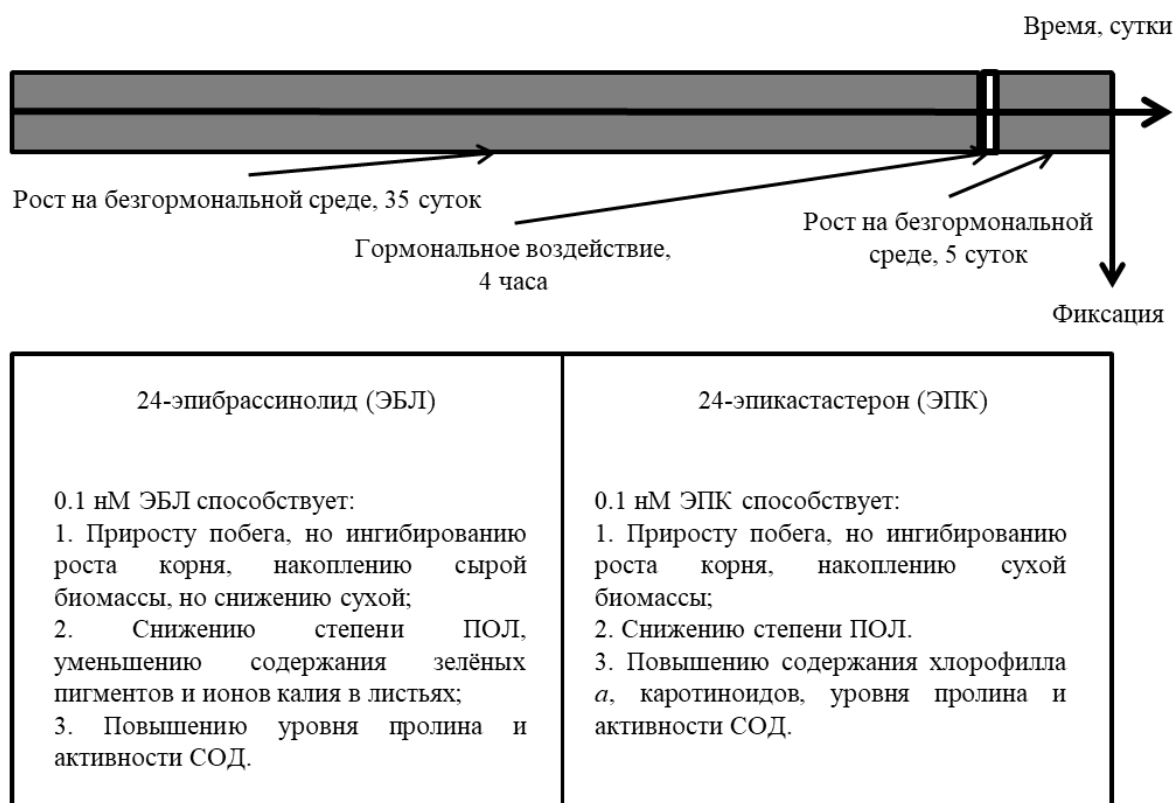


Рисунок 24. Схематическое изображение кратковременного влияния БС.

Так, ЭБЛ, в основном, оказывал большее влияние на ростовые и физиологические показатели, по сравнению с ЭПК. По этой причине, увеличение

концентрации гормона или продолжительности его воздействия может инициировать ингибирование морфофизиологических процессов, например, роста (при кратковременном и длительном воздействии) или нарушение целостности мембран (при длительном воздействии).

### 3.2. Исследование физиологических ответных реакций растений картофеля на хлоридное засоление в динамике

На следующем этапе исследования нами было изучено влияние разных концентраций (50, 75, 150 и 200 мМ) хлорида натрия на ростовые параметры (длина стебля и корня, число узлов, листьев и столонов, накопление биомассы), некоторые физиологические характеристики (содержание фотосинтетических пигментов, осмолитов, пролина и ТБК-активных продуктов, активность супероксиддисмутазы и гваякол-зависимой пероксидазы) и уровень экспрессии ряда генов (кодирующих аскорбат-зависимую пероксидазу, биосинтез пролина, транспорт ионов  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), в суточной (на 1-, 3- и 5-е сутки) динамике. Для изучения наиболее быстрых ответных реакций на стресс некоторые показатели были определены в часовой динамике (0.5, 1, 3, 6, 12 и 24 часа) в течение первых суток солевого воздействия.

Ранее нами было установлено, что 100 и 125 мМ являются условно умеренными концентрациями NaCl, при которых фиксируется негативный эффект засоления, но он не вызывает гибель растений при продолжительности эксперимента 7 суток (Efimova *et al.*, 2018b). Концентрации NaCl ниже 100 мМ мы условно принимали за «низкие», а выше 125 мМ – за «высокие».

#### 3.2.1. Влияние различной продолжительности хлоридного засоления на ростовые процессы у растений картофеля

Как следует из приведенных на Рисунке 25 результатов, присутствие хлорида натрия в питательной среде в умеренно низких концентрациях (50 и 75 мМ) существенно не изменяло рост растений на первые и третьи сутки эксперимента, тогда как на пятые сутки наблюдалось достоверное замедление роста побега, которое достигало 13% при 75 мМ.

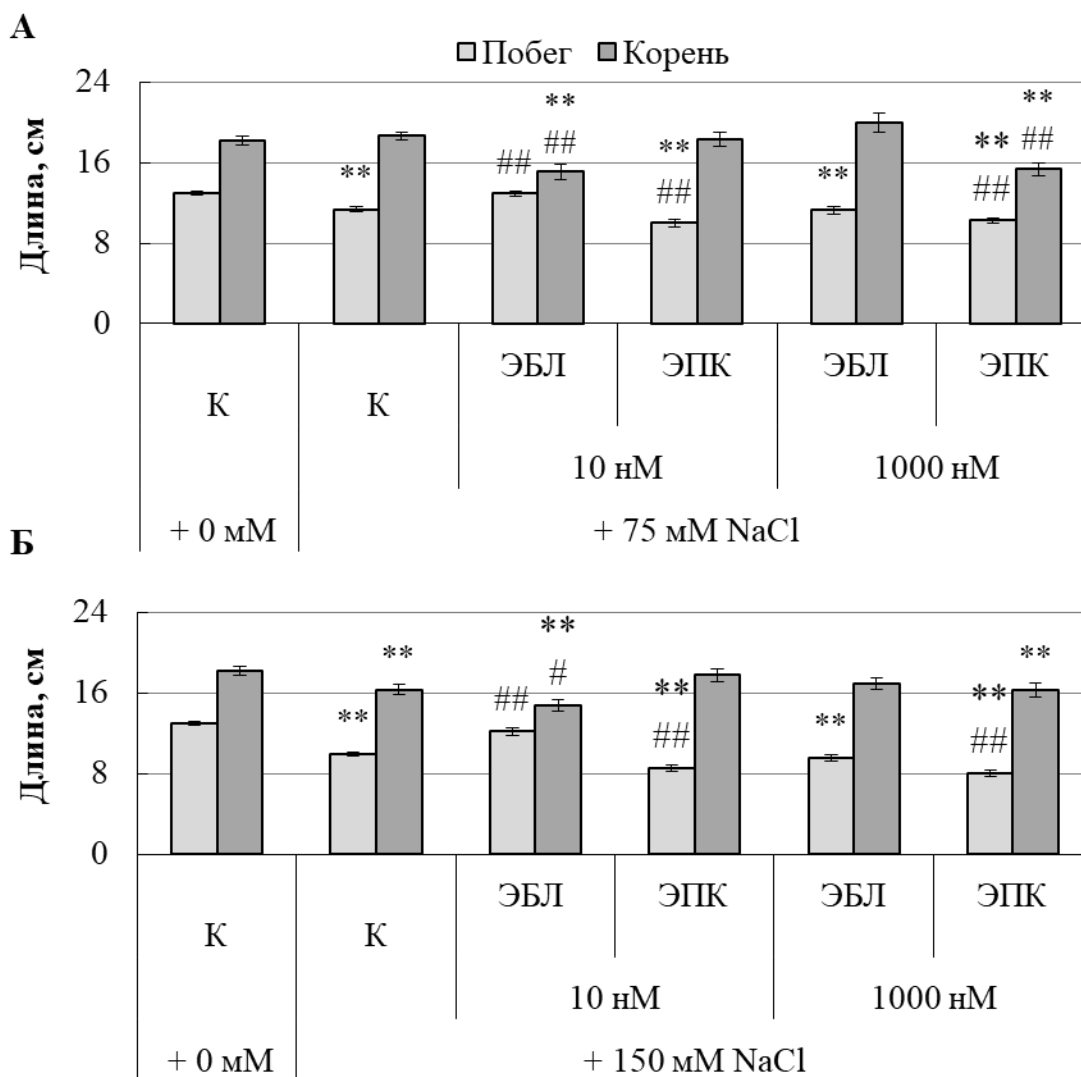


Рисунок 25. Влияние хлорида натрия на динамику роста побега и корня растений картофеля. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Высокие концентрации NaCl (150 и 200 мМ) подавляли рост стебля и корня на 10-13% через 3 дня воздействия, тогда как через 5 суток солевого стресса ингибирование роста корня достигало 10-20%, а стебля – 25% относительно контрольных значений. При этом сильнозасоленный раствор (200 мМ) питательной среды приводил к отмиранию клеток корня через пять суток (Рисунок 26).



Рисунок 26. Фотография растений картофеля при отсутствии NaCl в среде (А) и в присутствии 200 мМ NaCl (Б) в течение 5 суток.

Далее мы оценивали действие хлорида натрия на развитие узлов, и как следствие, листьев и столонов. Одним из защитных механизмов растений от негативного действия NaCl является накопление ионов натрия и хлора в зрелых нижних листьях и последующее их сбрасывание (Munns, Tester, 2008).

Снижение числа листьев на 20% у растений картофеля отмечалось уже через одни сутки воздействия высокими концентрациями соли (Рисунок 27). Аналогичный эффект был показан при использовании низких концентраций NaCl, но только через пять суток. На протяжении всего эксперимента число листьев у растений, подвергнутых засолению, снижалось. При добавлении самой высокой из анализируемых концентраций NaCl (200 мМ) в питательную среду на пять суток, число листьев сокращалось в 2 раза по сравнению с соответствующим контролем.

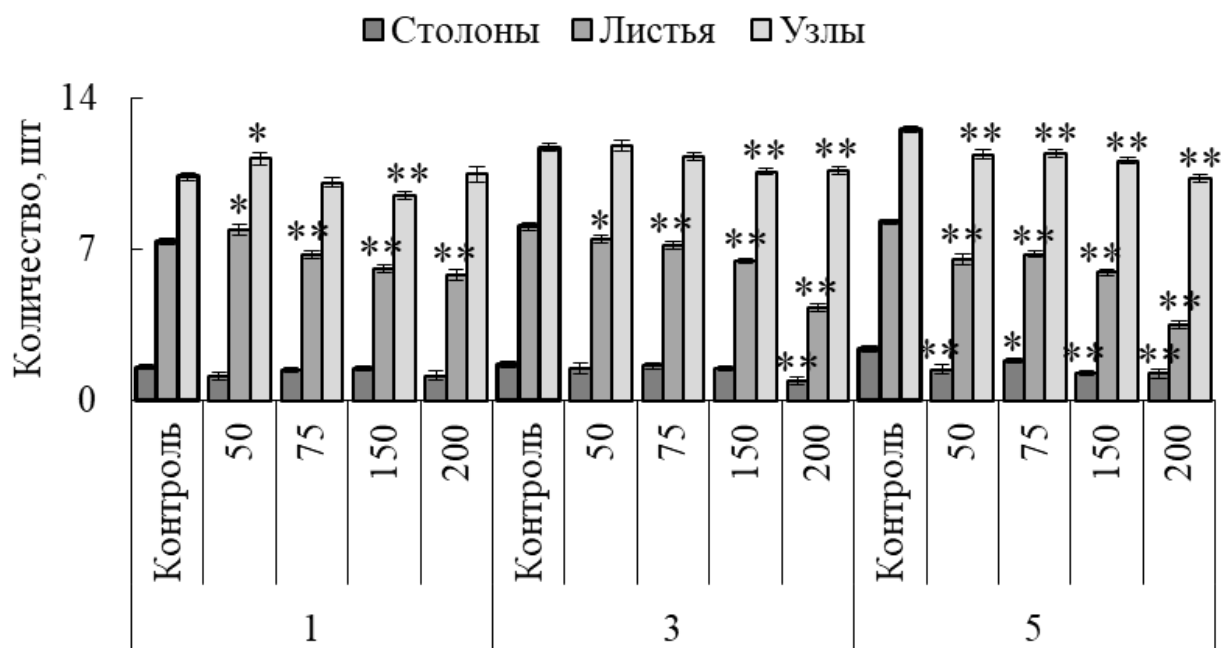


Рисунок 27. Влияние хлорида натрия на формирование узлов и количество листьев и столонов. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Одним из важных ростовых показателей продуктивности растений картофеля является количество видоизменённых побегов – столонов. Низкие концентрации хлорида натрия (50 и 75 мМ) замедляли формирование столонов на протяжении всего эксперимента; за пять суток их прирост относительно первых суток составил только 24 и 28% для 50 и 75 мМ NaCl соответственно, в то время как для контрольных растений – 51% (Рисунок 27). Увеличение концентрации NaCl до 200 мМ снижало число столонов на 43% на третьи сутки относительно соответствующего контроля. Замедление процессов формирования столонов и листьев также можно оценить по количеству узлов на побеге картофеля (Рисунок 26), которые формируются на стебле при закладывании боковых почек. Через пять суток воздействия NaCl, число узлов сократилось на 9% (50 и 75 мМ), 11% (150 мМ) и 18% (200 мМ) относительно контрольных растений.

Засоление подавляет рост растения, замедляет формирование боковых почек, а также инициирует опадение зрелых листьев. Все эти процессы, в зависимости от



концентрации NaCl и продолжительности его воздействия, могут негативно отражаться на накоплении биомассы всего растения. Так, если через сутки воздействия 50 мМ NaCl стимулировал увеличение биомассы на 28%, то 150 мМ NaCl ингибировал накопление массы на 20%. Через пять суток воздействия соли биомасса растений, относительно соответствующего контроля понижалась на 11% (50 мМ), 29% (75 мМ) и 50% (150 и 200 мМ) (Рисунок 28А).

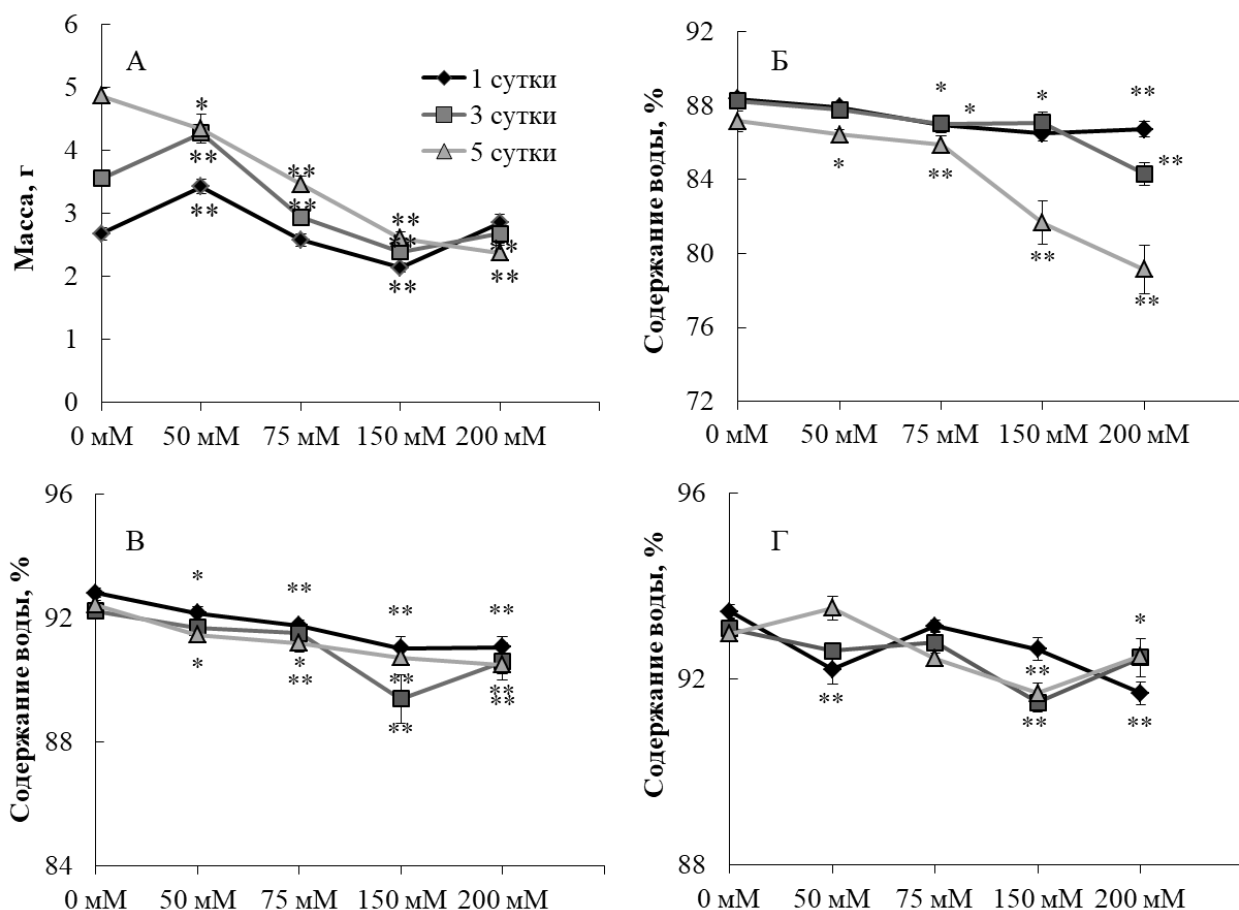


Рисунок 28. Влияние хлорида натрия на накопление биомассы растения (А), содержание воды в листьях (Б), стеблях (В) и корнях (Г). \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Значительное снижение аккумуляции воды в листьях отмечалось на третьи сутки действия 200 мМ NaCl и на пятые сутки – 150 мМ NaCl (Рисунок 28Б). Содержание воды в стебле зависело от действующей концентрации NaCl, однако в течение эксперимента изменялось не значительно (Рисунок 28В). В растениях,

выращенных на среде с 50 мМ NaCl, содержание воды в корнях повышалось на протяжении всего эксперимента (Рисунок 28Г).

3.2.2. Влияние хлоридного засоления на накопление пигментов, функционирование фотосистемы II, содержание неорганических ионов и другие физиологические процессы у растений картофеля в динамике

Присутствие хлорида натрия в почвенном растворе понижает его осмотический потенциал, тем самым затрудняя поглощение воды клетками корня. Так реализуется негативное влияние осмотического стресса при засолении, вызывающего развитие в растении водного дефицита. Поэтому для сохранения способности клеток поглощать воду из почвенного раствора при засолении и предотвращения развития водного дефицита происходит уменьшение величины осмотического потенциала содержимого клеток ниже уровня соответствующего показателя почвенного раствора (Haswell, Verslues, 2015). Понижение осмотического потенциала клеток достигается за счет накопления неорганических и органических осмолитов.

Наибольшее снижение (на 48%) величины осмотического потенциала в растениях картофеля, подвергнутых действию NaCl в низкой концентрации (50 мМ), отмечалось между третьими и пятыми сутками солевого стресса. Более интенсивное засоление (75 мМ) снижало осмотический потенциал на 25-32% во всех анализируемых временных точках. В то время, как NaCl в концентрациях 150 и 200 мМ наиболее активно снижал осмотический потенциал клеточного содержимого в первые сутки эксперимента (в 1.9 и 2.5 раз), далее динамика падения осмотического потенциала замедлялась (различия между третьими и пятыми сутками составляли 36 и 172%) (Рисунок 29).

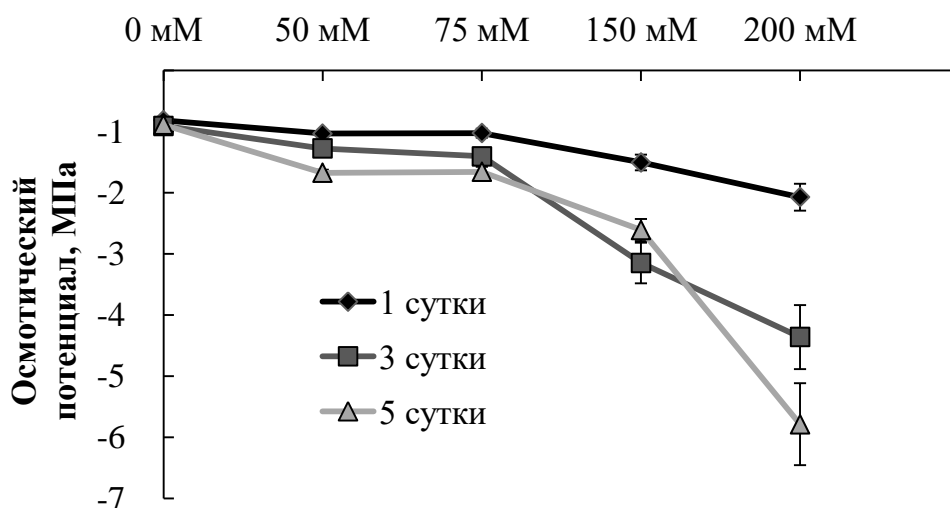


Рисунок 29. Влияние хлорида натрия на осмотический потенциал клеточного содержимого растений картофеля в суточной динамике. Отличия всех экспериментальных вариантов от контроля приведены с достоверностью при  $p \leq 0.05$ .

При засолении растения, прежде всего, испытывают осмотический стресс (Munns и Tester, 2008), который приводит к подавлению ростовых процессов. На более поздних этапах засоления в растениях развиваются ионный (токсический) и окислительный стрессы. Одним из следствий ионного стресса является опадение листьев. Как мы отмечали ранее, 150 мМ NaCl снижал число листьев у растений картофеля уже через сутки воздействия. В дальнейшем мы подробно изучили развитие осмотического стресса, инициированного 75 и 150 мМ NaCl, в часовой динамике в первые сутки эксперимента (Рисунок 30).

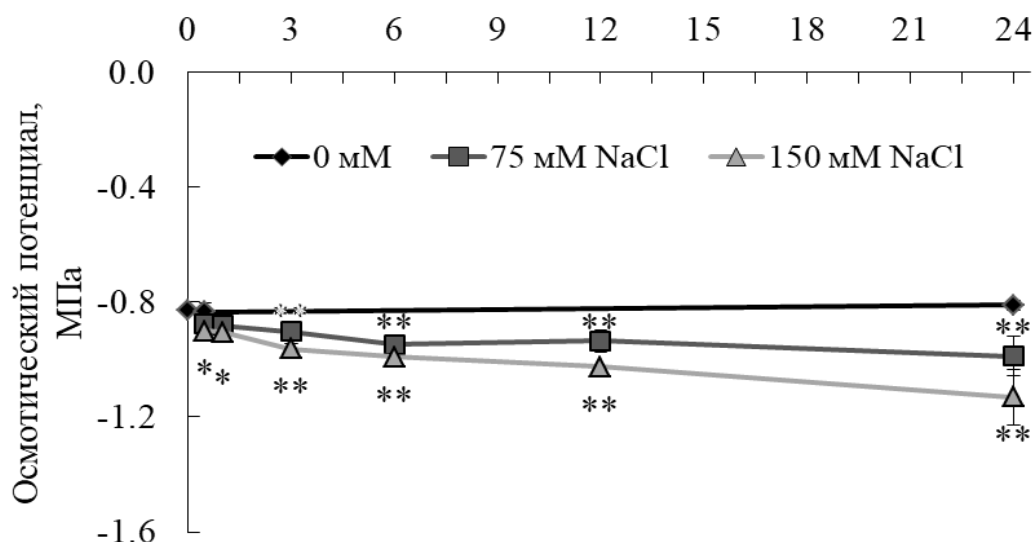


Рисунок 30. Влияние различных концентраций NaCl на величину осмотического потенциала клеточного содержимого растений картофеля в часовой динамике. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Нами показано, что осмотический потенциал растений понижался, уже спустя 30 минут воздействия NaCl, однако достоверные различия были отмечены только при интенсивном солевом стрессе (150 мМ). При меньшей концентрации NaCl (75 мМ) достоверное снижение осмотического потенциала отмечено только спустя 3 часа воздействия (Рисунок 30).

Образование органических осмопротекторов направлено на снижение осмотического стресса растений. Среди молекул-осмопротекторов выделяют аминокислоты, четвертичные амины, сахара и сахароспирты и др. органические соединения. Данные соединения понижают осмотический потенциал цитоплазмы, выравнивают внутриклеточное давление между вакуолью и цитоплазмой и проявляют стресс-протекторный эффект, защищая тем самым макромолекулы и клеточный метаболизм.

Далее нам было важно оценить динамику аккумуляции универсального осмопротектора – пролина в ответ на присутствие в питательной среде 75 или 150 мМ NaCl (Рисунок 31). Полученные данные показывают, что спустя одни сутки

воздействия NaCl содержание пролина увеличилось в 3 раза при 75 мМ и в 5.6 раз при 150 мМ соли.

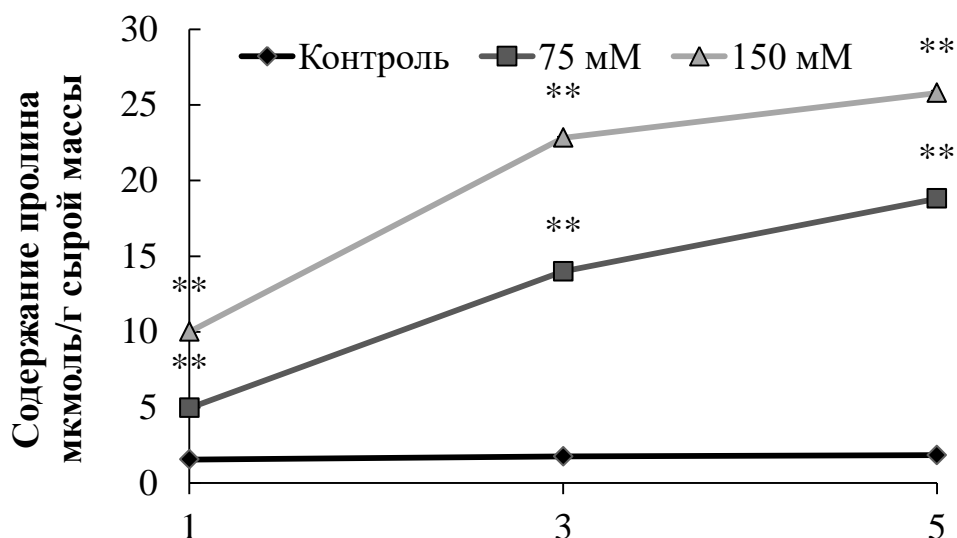


Рисунок 31. Динамика накопления пролина в растениях картофеля в ответ на солевой стресс (75 и 150 мМ NaCl). \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

На третьи и пятые сутки количество осмопротектора увеличивалось равномерно (75 мМ NaCl), в среднем, на 7 мкмоль/г за 2 суток. В то же самое время, 150 мМ NaCl инициировал более активную аккумуляцию пролина в течение первых трех суток, почти не вызывая дальнейшего повышения его содержания до конца эксперимента.

Помимо органических (совместимых) осмолитов осмотический статус клетки регулируется накоплением неорганических ионов (несовместимых осмолитов). Однако избыток ионов, в частности натрия и хлора, приводит к развитию ионного стресса, следствием которого является токсическое воздействие соли на клеточный метаболизм. Мы далее оценили накопление ионов натрия, калия, кальция и магния в тканях листа и корня картофеля на пятые сутки воздействия 75 и 150 мМ NaCl (Таблица 15).

Таблица 15. Содержание элементов натрия, калия, кальция и магния в тканях листьев и корней растений картофеля на пятые сутки солевого стресса, (мг/г сухой массы, % от значений контрольного варианта)

Вариант	Натрий (Na)		Калий (K)		Кальций (Ca)		Магний (Mg)	
	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%
<b>Лист</b>								
<b>Контроль</b>	<b>0.33±0.08</b>	<b>100</b>	<b>49.95±0.22</b>	<b>100</b>	<b>2.89±0.17</b>	<b>100</b>	<b>1.92±0.21</b>	<b>100</b>
75 мМ NaCl	32.23±0.68**	9648	27.23±1.28**	55	1.95±0.06*	67	1.61±0.05	84
150 мМ NaCl	53.67±0.94**	16068	32.07±0.56**	64	2.32±0.29	80	1.01±0.05**	53
<b>Корень</b>								
<b>Контроль</b>	<b>0.82±0.18</b>	<b>100</b>	<b>43.28±6.97</b>	<b>100</b>	<b>2.81±0.47</b>	<b>100</b>	<b>2.27±0.24</b>	<b>100</b>
75 мМ NaCl	19.80±0.87**	2408	37.28±3.28	86	1.97±0.10*	70	1.72±0.11*	76
150 мМ NaCl	37.82±1.10**	4600	18.93±1.51**	44	2.57±0.11	92	1.06±0.05**	46

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Представленные выше данные показывают, что в растениях, выращенных на среде без добавления NaCl, содержание ионов натрия было выше в 2.5 раза в корнях, чем в листьях. Количество ионов калия, кальция и магния в листьях достоверно не отличалось от аналогичных показателей в корнях.

Спустя пять суток воздействия NaCl, значительная часть ионов натрия транспортировалась из корней в листья. В листьях содержание натрия было выше в 1.6 и 1.4 раза после воздействия 75 и 150 мМ NaCl соответственно. При этом в присутствии 75 мМ NaCl, содержание калия снижалось в большей степени в листьях (до 55%), а в присутствии 150 мМ – в корнях (до 44%). Внесение в питательную среду 75 мМ NaCl вызывало значительное снижение содержания ионов кальция в тканях – на 37% в листьях и на 30% в корнях, а 150 мМ NaCl вызывал падение содержания ионов магния в 2 раза как в листьях, так и корнях. Для оценки способности растений картофеля к избирательному транспорту ионов были определены показатели  $S_{K^+,Na^+}$  и  $S_{Ca^{++},Na^+}$  (Чжоу, Юй, 2009). Установлено, что хлоридное засоление значительно снизило избирательный транспорт калия из корневой системы в листья (Таблица 16). Данный показатель был выше при 150 мМ NaCl, что, возможно, было связано с возрастанием сигнальной роли калия в ксилеме при данной концентрации соли (Saibi, Brini, 2021). Селективный транспорт

кальция в листьях при хлоридном засолении значительно сокращался по сравнению с контролем вне зависимости от используемой концентрации NaCl (Таблица 16).

Таблица 16. Изменение соотношений неорганических ионов в корнях и листьях растений картофеля и  $S_{K^+,Na^+}$  и  $S_{Ca^{++},Na^+}$  после 5 суток солевого стресса (75 и 150 мМ NaCl).

Вариант	В листьях		В корнях		$S_{K^+,Na^+}$	$S_{Ca^{++},Na^+}$
	$[K^+]/[Na^+]$	$[Ca^{++}]/[Na^+]$	$[K^+]/[Na^+]$	$[Ca^{++}]/[Na^+]$		
<b>Контроль</b>	<b>151.36±8.05</b>	<b>8.76±0.47</b>	<b>52.73±2.81</b>	<b>3.42±0.18</b>	<b>2.87±0.15</b>	<b>2.56±0.14</b>
75 мМ	0.84±0.04**	0.06±0.00**	1.88±0.09**	0.10±0.01**	0.45±0.03**	0.61±0.04**
150 мМ	0.60±0.04**	0.04±0.00**	0.50±0.04**	0.07±0.00**	1.19±0.08**	0.64±0.05**

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* при  $p \leq 0.05$ .

Известно, что повышенное содержание ионов натрия в питательном растворе конкурентно ингибирует поглощение ионов калия, вызывая тем самым развитие дефицита калия и нарушая обмен веществ в растениях (Ma *et al.*, 2012). Также в ответ на токсическое действие избытка ионов в клетках, наблюдается интенсивная генерация активных форм кислорода (АФК). Они способствуют разрушению мембран и, как следствие, вызывают перекисное окисление липидов (ПОЛ). Высокое содержание АФК и разрушение мембран относятся к ключевым этапам развития окислительного стресса. Для нейтрализации АФК в растениях повышается синтез и/или активность ферментативных и/или неферментативных антиоксидантных систем.

Так, одним из маркеров проявления окислительного стресса является повреждение клеточных мембран АФК, в ходе которого образуются продукты, вступающие в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Нами была выявлена динамика изменений (на первые, третьи и пятые сутки) количества ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в листьях растений картофеля в ответ на действие 50, 75, 150 и 200 мМ NaCl. Интересно, что интенсивность накопления ТБК-АП через одни сутки не изменялась в ответ на действие разных концентраций NaCl. В то время как через трое суток был отмечен максимальный прирост интенсивности ПОЛ для

всех исследуемых концентраций на 4, 12, 31 и 63% соответственно. Далее, показатель перекисного окисления липидов незначительно снижался (Рисунок 32).

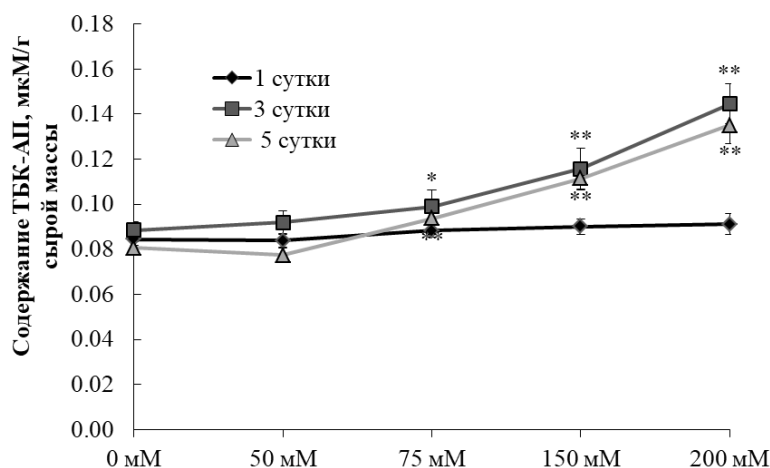


Рисунок 32. Суточная динамика изменений накопления ТБК-АП в ответ на действие разных концентраций хлорида натрия. \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

При этом, через одни сутки солевого стресса, низкая концентрация NaCl (75 мМ) стимулировала повышение активности ферментов (СОД и гваякол-зависимой пероксидазы) на 25-30%, в то время как высокая (150 мМ NaCl) – активировала только пероксидазу и более, чем в 2 раза (Таблица 17). Продолжение действия стрессора стимулировало повышение активности ферментов при 75 мМ NaCl дополнительно, на 41-64%, однако, 150 мМ NaCl снижала активность СОД в 2 раза, а пероксидазы – на 57%.

Таблица 17. Влияние хлорида натрия (75 и 150 мМ) на активность антиоксидантных ферментов.

Вариант	Активность СОД,		Активность пероксидазы,		
	усл.ед./мг.белка	%	усл.ед./мг.белка в мин.	%	
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>5.08±0.19</b>	<b>100</b>	<b>0.16±0.00</b>	<b>100</b>
	75 мМ NaCl	6.14±0.56	121	0.20±0.02*	131
	150 мМ NaCl	4.66±0.11	92	0.22±0.01**	141
5 сутки	<b>Контроль</b>	<b>8.99±0.76</b>	<b>100</b>	<b>0.45±0.05</b>	<b>100</b>
	75 мМ NaCl	17.03±1.68**	189	0.78±0.08**	172
	150 мМ NaCl	4.70±0.49**	52	0.74±0.09**	162

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .



Нарушение окислительно-восстановительных реакций фотосинтеза активными формами кислорода снижает эффективность функционирования I и II фотосистем. Также АФК приводят к разрушению хлорофиллов, белков и нуклеиновых кислот, необходимых для биосинтеза зелёных пигментов. Мы определили содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов через 1, 3 и 5 суток воздействия 50, 75, 150 и 200 мМ NaCl на растения картофеля (Таблица 18).

Таблица 18. Влияние хлорида натрия на содержание фотосинтетических пигментов в суточной динамике, (мг/г сырой массы, % от контроля соответствующего возраста).

	Вариант	Хлорофилл <i>a</i>		Хлорофилл <i>b</i>		Каротиноиды	
		мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>2.20±0.04</b>	<b>100</b>	<b>0.51±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.57±0.01</b>	<b>100</b>
	50 мМ NaCl	2.28±0.11	104	0.53±0.03	104	0.57±0.03	101
	75 мМ NaCl	2.26±0.05	103	0.55±0.02	109	0.57±0.01	101
	150 мМ NaCl	2.03±0.06*	92	0.48±0.02	95	0.53±0.02	94
	200 мМ NaCl	1.70±0.10**	78	0.44±0.02**	86	0.44±0.02**	78
3 сутки	<b>Контроль</b>	<b>2.46±0.04</b>	<b>100</b>	<b>0.52±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.64±0.01</b>	<b>100</b>
	50 мМ NaCl	2.21±0.10*	90	0.54±0.03	104	0.54±0.02**	84
	75 мМ NaCl	2.01±0.07**	82	0.42±0.02**	82	0.53±0.02**	82
	150 мМ NaCl	1.99±0.09**	81	0.45±0.02*	88	0.52±0.02**	81
	200 мМ NaCl	1.98±0.15**	81	0.56±0.05	109	0.52±0.04**	80
5 сутки	<b>Контроль</b>	<b>2.34±0.04</b>	<b>100</b>	<b>0.52±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.59±0.01</b>	<b>100</b>
	50 мМ NaCl	1.93±0.16*	82	0.47±0.04	89	0.51±0.04	86
	75 мМ NaCl	1.94±0.09**	83	0.44±0.02**	83	0.51±0.02**	85
	150 мМ NaCl	1.87±0.09**	80	0.45±0.02**	86	0.48±0.02**	81
	200 мМ NaCl	1.19±0.10**	51	0.31±0.03**	58	0.36±0.03**	61

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Полученные результаты показывают, что достоверное снижение содержания хлорофиллов *a* и *b* отмечалось через одни сутки воздействия 150 и 200 мМ NaCl, каротиноидов – только при 200 мМ. Через пять суток воздействия соли количество фотосинтетических пигментов было ниже контрольных значений на 10-20% при 50, 75 и 150 мМ NaCl, и на 36-46% при 200 мМ (Таблица 18).

Действие низких концентраций NaCl через одни сутки приводило к преобладанию суммы хлорофиллов *a* и *b* над уровнем каротиноидов по сравнению

с аналогичным соотношением фотосинтетических пигментов в контрольном варианте. В то время как воздействие высокой концентрации хлорида натрия (200 мМ) на растения картофеля приводило к большему разрушению хлорофилла *a*, по сравнению с хлорофиллом *b* или каротиноидами (Таблица 19).

Таблица 19. Влияние хлорида натрия на соотношение фотосинтетических пигментов в листьях растений картофеля в суточной динамике.

	Вариант	[Хлорофилл <i>a</i> ]/ [Хлорофилл <i>b</i> ]	([Хлорофилл <i>a</i> ] + [Хлорофилл <i>b</i> ]) / [Каротиноиды]
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>4.40±0.07</b>	<b>4.80±0.06</b>
	50 мМ NaCl	4.31±0.07	4.92±0.05
	75 мМ NaCl	4.25±0.10	4.96±0.11
	150 мМ NaCl	4.29±0.08	4.79±0.12
	200 мМ NaCl	3.88±0.08 <sup>**</sup>	4.84±0.05
3 сутки	<b>Контроль</b>	<b>4.82±0.07</b>	<b>4.66±0.04</b>
	50 мМ NaCl	4.18±0.10 <sup>**</sup>	5.07±0.09 <sup>*</sup>
	75 мМ NaCl	4.83±0.06	4.59±0.05 <sup>**</sup>
	150 мМ NaCl	4.47±0.07	4.63±0.06 <sup>**</sup>
	200 мМ NaCl	3.58±0.08 <sup>*</sup>	4.92±0.12 <sup>*</sup>
5 сутки	<b>Контроль</b>	<b>4.54±0.05</b>	<b>4.84±0.03</b>
	50 мМ NaCl	4.16±0.07 <sup>**</sup>	4.70±0.09
	75 мМ NaCl	4.50±0.05	4.68±0.05 <sup>**</sup>
	150 мМ NaCl	4.25±0.09 <sup>**</sup>	4.81±0.06
	200 мМ NaCl	3.95±0.09 <sup>**</sup>	4.11±0.10 <sup>**</sup>

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Функционирование фотосистемы II (ФС II) оценивали по показателям нефотохимического тушения электронов и соотношению коэффициентов  $F_v/F_m$ . Аналогично с формированием осмотического стресса, спустя 30 минут воздействия 150 мМ NaCl, отмечалось и изменение параметров ФС II – NPQ,  $Y(NPQ)$  и  $q_N$  (Таблица 20). Данные показатели повышались в течение первого часа засоления на 28-42%. В последствии они восстанавливались до контрольных значений и, через 6 часов экспозиции, было отмечено их повторное увеличение (на 39- 54%). Значения параметров нефотохимического тушения флуоресценции были максимальными через пять суток, наблюдалось 3-х кратное увеличение  $q_N$  и 5-х кратное для NPQ,  $Y(NPQ)$ . При этом относительная скорость транспорта электронов (ETR)

снижалась на 28%. Подобное «волнообразное» поведение показателей нефотохимического тушения было показано и при 75 мМ NaCl; однако, максимальное повышение (на 21%) было отмечено спустя 3 часа действие солевого стресса. Снижение коэффициента Fv/Fm свидетельствует о нарушении функционирования ФС II; 150 мМ NaCl снижал значения Fv/Fm, спустя 12 часов воздействия, а 75 мМ NaCl - только через 72 часа.

Таблица 20. Влияние солевого стресса (75 и 150 мМ) различной продолжительности на показатели эффективности функционирования ФСII, (%)

Время, ч	Вариант	ETR	qN	NPQ	Y (NPQ)	Fv/Fm
0.5	<b>Контроль</b>	<b>100±3</b>	<b>100±1</b>	<b>100±1</b>	<b>100±7</b>	<b>100±0</b>
	75 мМ NaCl	99±1	109±10	111±13	110±10	101±0
	150 мМ NaCl	98±3	90±18	90±21	90±15	101±1
1	75 мМ NaCl	100±1	104±6	105±8	103±7	100±0
	150 мМ NaCl	101±2	131±20*	145±28*	128±18*	102±0
3	75 мМ NaCl	100±1	115±13	121±16*	114±11	101±0
	150 мМ NaCl	100±3	102±5	103±5	103±2	100±0
6	75 мМ NaCl	100±2	94±14	95±16	90±12	101±0
	150 мМ NaCl	101±3	140±11**	154±16**	139±19*	100±1
12	75 мМ NaCl	99±4	97±18	97±22	100±26	100±0
	150 мМ NaCl	93±4	139±32	161±51	168±52	99±1
24	75 мМ NaCl	100±1	113±6*	115±8*	112±6	99±0
	150 мМ NaCl	96±2	160±13**	186±20*	175±16**	101±0
72	<b>Контроль</b>	<b>99±2</b>	<b>91±4</b>	<b>89±5</b>	<b>94±6</b>	<b>100±0</b>
	75 мМ NaCl	99±2	105±31	106±38	107±38	97±1
	150 мМ NaCl	102±3	144±20*	156±18*	136±16*	99±2
120	<b>Контроль</b>	<b>103±2</b>	<b>101±5</b>	<b>101±5</b>	<b>93±9</b>	<b>100±1</b>
	75 мМ NaCl	103±2	116±4*	118±6*	107±9	100±0
	150 мМ NaCl	72±20*	306±67**	519±80**	491±86**	94±2**

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Хлоридное засоление (75-200 мМ) способствовало опадению листьев через сутки воздействия, увеличение продолжительности действия стрессора до трёх суток приводило к снижению интенсивности роста и сырой массы растений, а также повышению ПОЛ. Величина осмотического потенциала и накопление

пролина для всех исследуемых концентраций изменялись через сутки стрессового воздействия. При этом только высокие концентрации хлорида натрия – 150 или 200 мМ через сутки воздействия способствовали снижению содержания фотосинтетических пигментов и повышению активности гваяколзависимой пероксидазы. В то время как максимальная фотохимическая эффективность второй фотосистемы снижалась только через 5 суток воздействия хлоридом натрия (150 мМ).

### 3.2.3. Действие хлоридного засоления на уровень транскриптов стресс-протекторных генов растений картофеля во времени

Хлоридное засоление оказывает негативный эффект на рост и продуктивность растений. Снижение отрицательно воздействия солевого стресса достигается за счет формирования защитных систем, о функционировании которых может свидетельствовать, прежде всего, изменение интенсивности экспрессии стресс-регулируемых генов. К их числу относятся гены, кодирующие ферменты метаболизма фитогормонов, осмолитов, белки ионных каналов, антиоксидантные ферменты и т.д. По этой причине мы исследовали суточную динамику изменений уровней экспрессии стресс-регулируемых генов в ответ на самую низкую (50 мМ NaCl) и самую высокую (200 мМ NaCl) из исследуемых концентраций соли.

Хорошо известно, что генами синтеза пролина являются *P5CS1* и *P5CR*, кодирующие ферменты пирролин-5-карбоксилат-синтазу и пирролин-5-карбоксилат редуктазу, соответственно. Нами показано максимальное снижение уровня транскриптов этих генов на пятые сутки на фоне слабого солевого стресса (50 мМ NaCl) и на третьи сутки интенсивного засоления (200 мМ NaCl). Для гена деградации пролина *PDH*, в ответ на высокую концентрацию NaCl, в основном, отмечено повышение уровня его транскриптов в 1.7, 15 и 25 раз, в зависимости от продолжительности солевого воздействия. В ответ на действие низкой концентрации NaCl в первые сутки показано снижение уровня транскриптов гена

*PDH* на 27%, однако на пятые сутки их уровень был в 3.8 раз выше, чем в контроле (Таблица 21).

Мы оценивали также уровень экспрессии двух других генов, участвующих в биосинтезе флавоноидов (*CHS1α* – халкон-синтазы и *PAL* – фенилаланин-аммоний лиазы). В ответ на действие 50 мМ NaCl (через 3 суток экспозиции) происходило снижение числа транскриптов этих генов на 70% и 48% соответственно. Высокая концентрация соли (200 мМ NaCl) (на третьи сутки) практически блокировала экспрессию гена *CHS1α* и снижала активность гена *PAL* более чем на 80% (Таблица 21).

Экспрессия генов антиоксидантных ферментов – аскорбат-пероксидаз (*APX1* и *APX3*) подавлялась при действии хлорида натрия, в большей степени (на 50%) при максимальной концентрации NaCl: через одни сутки *APX3*, через пять суток *APX1* (Таблица 21).

Таблица 21. Динамика изменений уровней транскриптов генов метаболизма пролина, флавоноидов и антиоксидантных ферментов при слабом и сильном хлоридном засолении (50 и 200 мМ)

Вариант	Метаболизм пролина			Метаболизм флавоноидов		Антиоксидантные ферменты		
	<i>P5CS1</i>	<i>P5CR</i>	<i>PDH</i>	<i>CHS1α</i>	<i>PAL</i>	<i>APX1</i>	<i>APX3</i>	
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>100±1</b>	<b>100±2</b>	<b>100±4</b>	<b>100±18</b>	<b>100±3</b>	<b>100±6</b>	<b>100±3</b>
	50 мМ NaCl	91±5	116±11	73±12*	71±9	95±6	92±5	83±3**
	200 мМ NaCl	71±3**	102±4	172±25*	36±8**	49±5**	100±2	48±2**
3 сутки	<b>Контроль</b>	<b>100±3</b>	<b>100±5</b>	<b>100±9</b>	<b>100±15</b>	<b>100±11</b>	<b>100±1</b>	<b>100±1</b>
	50 мМ NaCl	88±5	95±5	135±7*	27±5**	52±3**	102±3	86±4*
	200 мМ NaCl	58±3**	72±2**	1475±57**	3±0**	19±0**	81±3**	64±2**
5 сутки	<b>Контроль</b>	<b>100±2</b>	<b>100±1</b>	<b>100±6</b>	<b>100±16</b>	<b>100±3</b>	<b>100±5</b>	<b>100±2</b>
	50 мМ NaCl	64±2**	55±3**	378±21**	55±6*	98±14	87±3*	63±2**
	200 мМ NaCl	93±5	84±1**	2500±354**	4±0**	47±5**	49±2**	77±3**

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Кроме того, нами оценено накопление транскриптов генов, кодирующих белки натриево-протонных антипортеров (*SOS1* и *NHXs*). В некоторых работах

были высказаны предположения, что *SOS1* выводит в ксилему и апопласт ионы  $\text{Na}^+$  при умеренном солевом стрессе, что повышает солеустойчивость культуры (Shi *et al.*, 2002; Saibi, Brini, 2021). Однако в нашем случае, 50 мМ NaCl снижал уровень транскриптов генов *SOS1* и *NHX1* более чем в два раза через пять суток экспозиции. Ранее нами было отмечено повышение содержания ионов натрия в корнях при действии высокой концентрации 150 мМ NaCl (Рисунок 31), что коррелирует с увеличением числа транскриптов *SOS1* (на 58%) после интенсивного засоления (200 мМ NaCl).

Для  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  транспортера *NHX3* зачастую демонстрируют компартментационную роль – загрузку ионов натрия в вакуоль для снижения концентрации неорганических ионов в цитоплазме и понижения, тем самым, их токсического действия на клеточный метаболизм. Так, в ответ на односуточное воздействие NaCl, уровень экспрессии гена *NHX3* увеличивался на 48-82%, возможно, при низкой концентрации соли наблюдалось снижение вклада неорганических осмолитов, в то время как уровень органических осмолитов поддерживался на постоянном уровне (Таблица 22).

Таблица 22. Динамика изменений интенсивности экспрессии  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  транспортеров и накопление осмопротектора пролина при хлоридном засолении (50 и 200 мМ)

Вариант	$\text{Na}^+/\text{H}^+$ транспортеров				Содержание пролина	
	<i>SOS1</i>	<i>NHX1</i>	<i>NHX2</i>	<i>NHX3</i>	%	
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>100±6</b>	<b>100±4</b>	<b>100±4</b>	<b>100±8</b>	<b>100±9</b>
	50 мМ NaCl	107±17	110±6	107±5	148±11**	520±29**
	200 мМ NaCl	101±5	88±3*	106±5	182±9**	1492±147**
3 сутки	<b>Контроль</b>	<b>100±5</b>	<b>100±4</b>	<b>100±3</b>	<b>100±7</b>	<b>100±12</b>
	50 мМ NaCl	98±4	92±5	84±4*	130±5**	610±33**
	200 мМ NaCl	168±8	134±6**	158±8**	893±49**	3075±446**
5 сутки	<b>Контроль</b>	<b>100±5</b>	<b>100±3</b>	<b>100±4</b>	<b>100±6</b>	<b>100±2</b>
	50 мМ NaCl	41±3**	48±3**	95±4	129±6**	516±22**
	200 мМ NaCl	158±8**	107±14	144±8**	1014±137**	3055±48**

Примечание: \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

При 200 мМ NaCl наблюдали повышение уровня транскриптов NHX3 гена вплоть до окончания эксперимента, что могло активировать загрузку неорганических ионов внутрь вакуоли, и одновременно могла происходить аккумуляция совместимых осмолитов в цитоплазме для поддержания клеточного осмотического статуса и защиты метаболизма от токсического действия избыточного содержания ионов (Таблица 22).

### 3.3 Влияние brassinosterоидов на растения при последующем засолении (75 и 150 мМ NaCl)

Мы сравнивали протекторный эффект brassinosterоидов, различающихся по химической структуре – лактон- (ЭБЛ) и кетонсодержащих (ЭПК), при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ NaCl) для более детального понимания фундаментальных механизмов защиты растений. Для этого были использованы две модели воздействия фитогормонов на растения: длительное – БС вносили в стерильную питательную среду на этапе микрочеренкования растений, продолжительность воздействия 21 сутки, и кратковременное – гормоны добавляли в жидкую питательную среду, продолжительность воздействия 4 часа перед третьей (последней) стадией эксперимента. Моделирование условий засоления проводили на третьем этапе роста (5 суток), внесением в безгормональную жидкую питательную среду (50% МС) 4.4 г/л (75 мМ) или 8.8 г/л (150 мМ) NaCl.

#### 3.3.1 Защитное действие ЭБЛ и ЭПК на рост растений картофеля при длительной обработке и последующем засолении

Предполагая различия протекторных механизмов БС по интенсивности и направленности действия, мы сравнивали эффект длительной предобработки лактон- (ЭБЛ) и кетонсодержащего (ЭПК) БС на ростовые показатели (длину побега и корня, формирование узлов столонов и листьев, сырую и сухую массу) и динамику изменений содержания воды в разных частях растений (листья, стебель, корни) при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ). Концентрация фитогормонов составляла 10 нМ при исследовании динамики хлоридного воздействия (1, 3 и 5 сутки) и 1000 нМ, с одной точкой фиксации – через пять суток.

Нами показана органоспецифичность защитного действия brassinosterоидов при последующем засолении. Так, ЭБЛ восстанавливал длину побега до контрольных значений, вне зависимости от концентрации хлорида натрия (Рисунок 33). Сохранению роста корня при последующем воздействии



хлорида натрия способствовали эпикастастерон в концентрации 10 нМ и эпибрасинолид (1000 нМ).

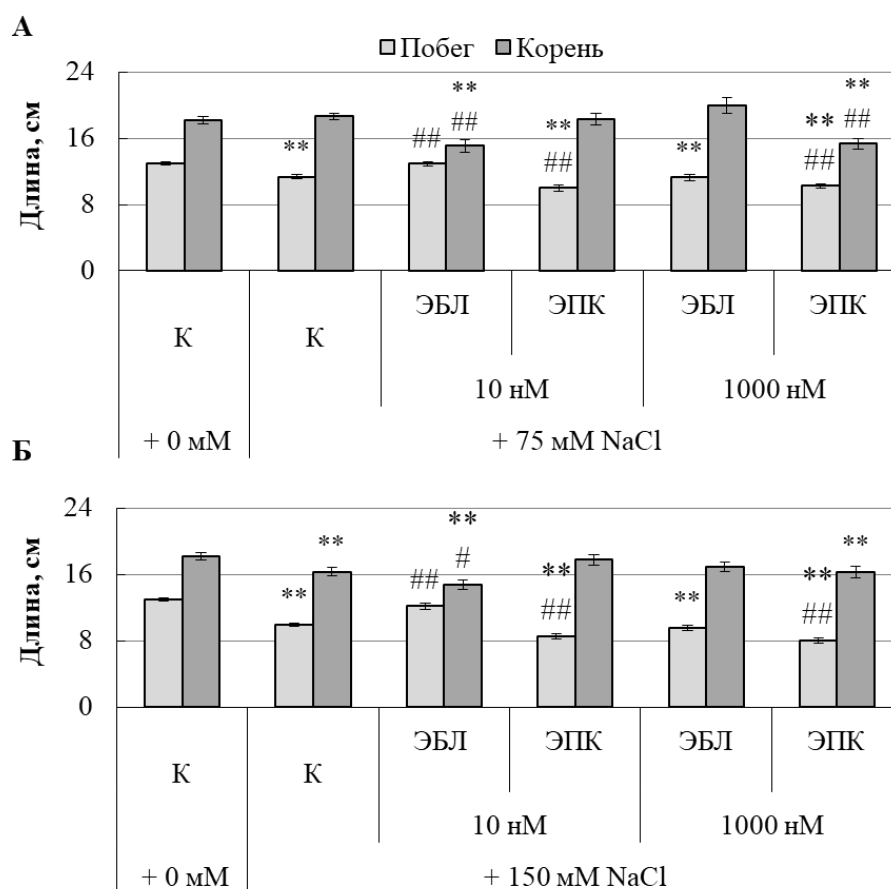


Рисунок 33. Длительное влияние ЭБЛ и ЭПК (10 и 1000 нМ) при последующем пятисуточном хлоридном засолении (75 (А) и 150 (Б) мМ) на рост побега и корня. Буквой К обозначены контрольные варианты с необработанными БС растениями. \* – достоверные различия относительно контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.05$ , \*\* – при  $p \leq 0.01$ ; # – достоверные различия относительно варианта «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$ .

Далее мы оценивали эффект длительного присутствия БС в питательной среде, при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ) на формирование растениями узлов, в том числе столонов и листьев (Рисунок 34). Нами ранее было показано, что длительное воздействие ЭБЛ способствовало формированию узлов (Рисунок 13), подобное влияние гормона сохранялось и у растений, подвергнутых дальнейшему засолению (75 и 150 мМ). Также протекторный эффект длительного

воздействия ЭБЛ отмечен в отношении столонов. При засолении 75 мМ формировалось на 8-12% больше столонов, а при 150 мМ NaCl на 15-22%, относительно соответствующего солевого контроля. При этом 1000 нМ ЭБЛ усиливал опадение листьев на 5-7% относительно соответствующего солевого контроля.

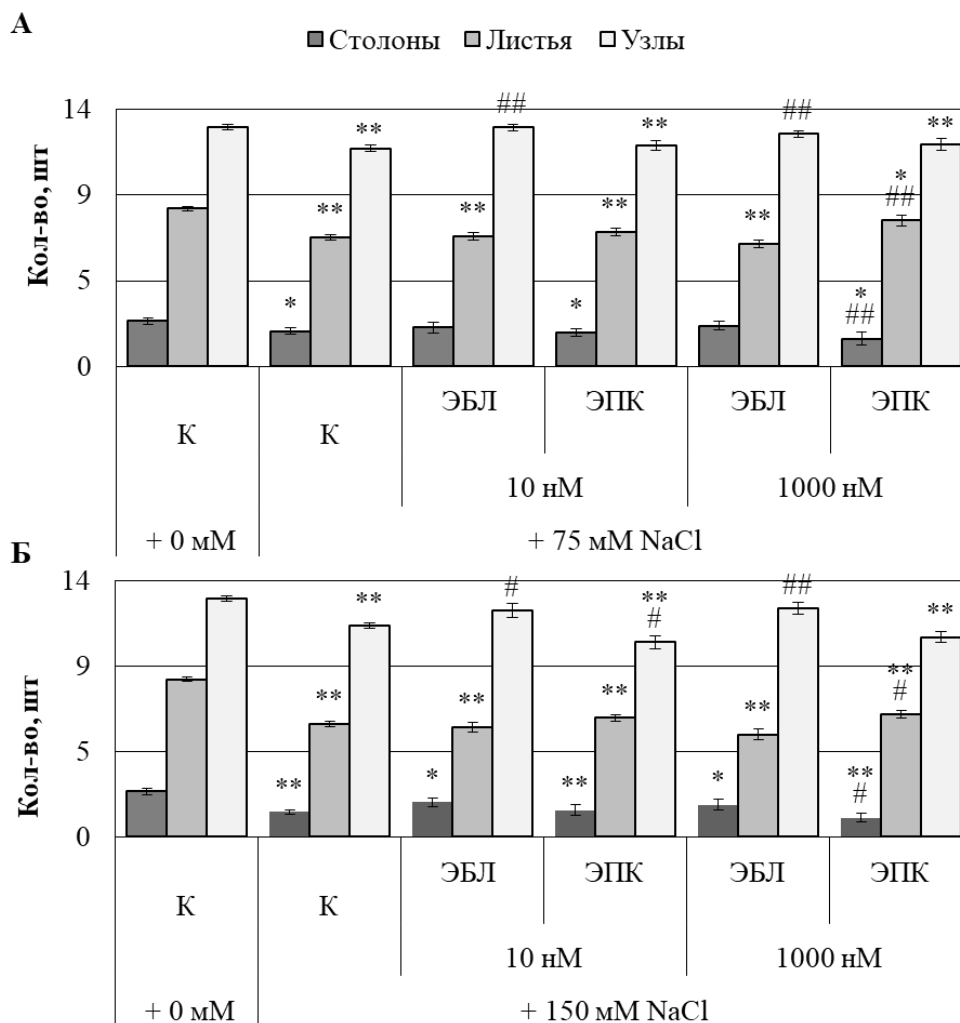


Рисунок 34. Длительное влияние ЭБЛ и ЭПК в концентрациях 10 и 1000 нМ при последующем пятисуточном хлоридном засолении (75 (А) и 150 (Б) мМ) на формирование узлов, в том числе столонов и листьев. Буквой К обозначены контрольные варианты с необработанными БС растениями. \* – достоверные различия относительно контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.05$ , \*\* – при  $p \leq 0.01$ ; # – достоверные различия относительно варианта «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$ .

Влияние ЭПК на формирование узлов было менее выражено, так, достоверное поддержание числа листьев проявлялось только в концентрации 1000 нМ как при 75 мМ, так и при 150 мМ NaCl. При этом число столонов снижалось относительно солевых контролей.

Ранее нами было показано, что хлоридное засоление способствует снижению сырой и сухой массы (Рисунок 28). ЭПК в концентрации 10 нМ и 1000 нМ стимулировал дополнительное накопление биомассы на 12% при последующем хлоридном засолении (75 мМ NaCl). Однако данные изменения не приводили к достоверному накоплению сухой массы (Рисунок 35).

Данные результаты подтверждают наше предположение о способности БС регулировать накопление дополнительной влаги в растениях.

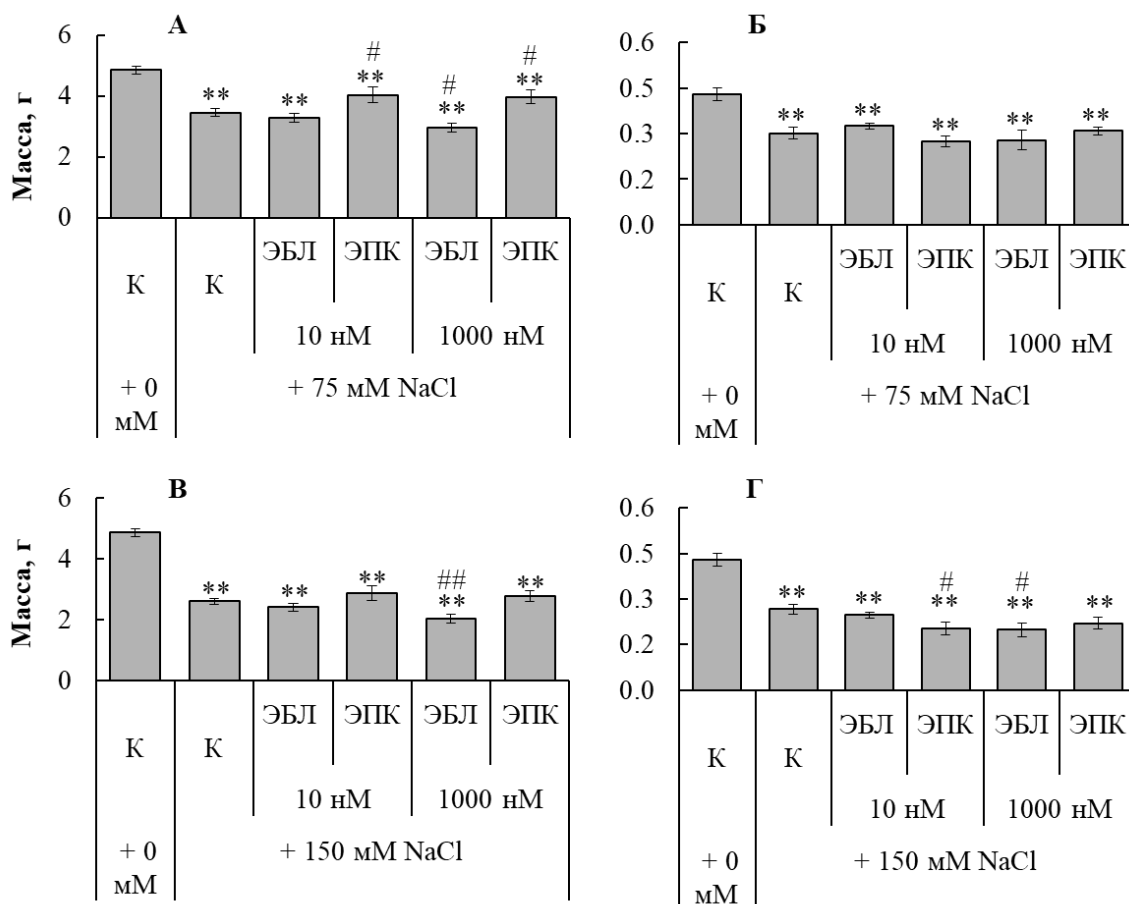


Рисунок 35. Длительное влияние ЭБЛ и ЭПК в концентрациях 10 и 1000 нМ при последующем пятисуточном хлоридном засолении (75 (А, Б) и 150 (В, Г) мМ)) на накопление сырой (А, В) и сухой (Б, Г) массы. Буквой К обозначены контрольные

варианты с необработанными БС растениями. \* достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.05$ , \*\* при  $p \leq 0.01$ ; # – достоверные различия между средними значениями вариантов экспериментального и «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$ .

Аналогичное предположение о регулировании БС содержания воды в условиях абиотического стресса также были продемонстрированы в исследовании Gupta и Seth на проростках горчицы в условии засоления (2022) и работе Jan с соавторами (2018) на проростках гороха при последующем действии ионов кадмия.

Для проверки данной гипотезы мы оценивали динамику содержания воды в разных частях растений (лист, стебель, корень) в ответ на длительное воздействие 10 нМ БС при последующем действии стресса.

Как следует из рисунка 36, БС способствовали сохранению влаги в тканях растений. ЭБЛ при последующем хлоридном засолении (75 мМ NaCl) способствовал аккумулярованию, а при более сильном засолении – сохранению уровня влаги в корнях (с 1 по 3 сутки). В то время как содержание воды в листьях растений, обработанных ЭПК и подвергнутых дальнейшему засолению, практически не изменялось с течением времени как при 75 мМ, так и при 150 мМ.

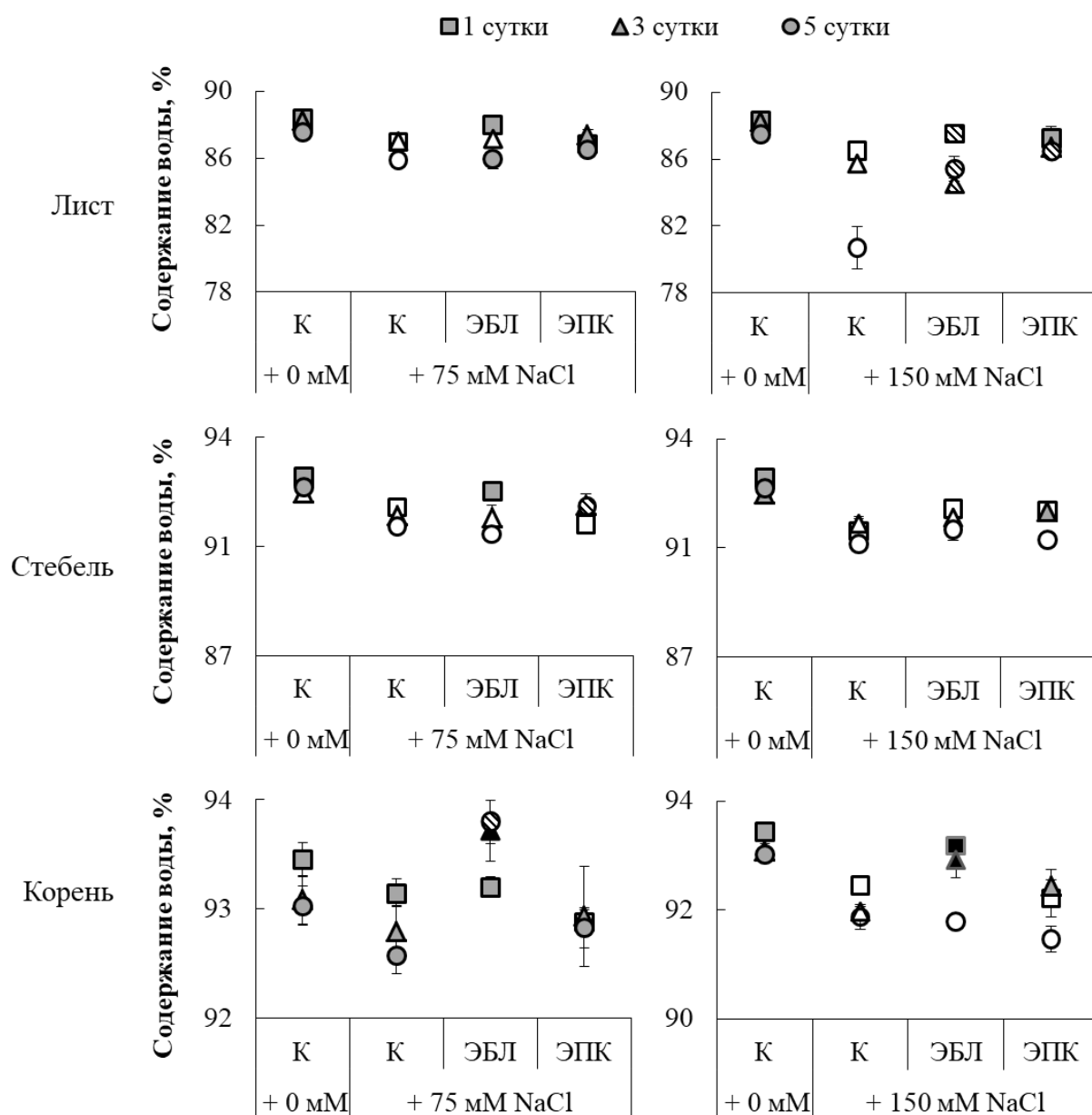


Рисунок 36. Длительное влияние 10 нМ ЭБЛ и ЭПК при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ) на динамику изменений процентного содержания воды в листьях, стеблях и корнях растений картофеля. Достоверность отмечена цветом маркера (белый – отличие от «контроль»; чёрный – отличие от «контроль + соль» (75 или 150 мМ); чёрно-белый штрих – отличие от вариантов «контроль» и «контроль + соль») при  $p \leq 0.05$ .

Далее мы оценили содержание воды в растениях, длительно обработанных 1000 нМ БС (Рисунок 37). После 5-ти суточного воздействия 75 мМ хлорида натрия БС способствовали обводнению корня и, аналогично с 10 нМ, ЭПК

сохранял влагу в листе, в то время как ЭБЛ в стебле. При использовании высокой концентрации хлорида натрия (150 мМ), также сохраняется влага в тканях листьев растений, обработанных БС.

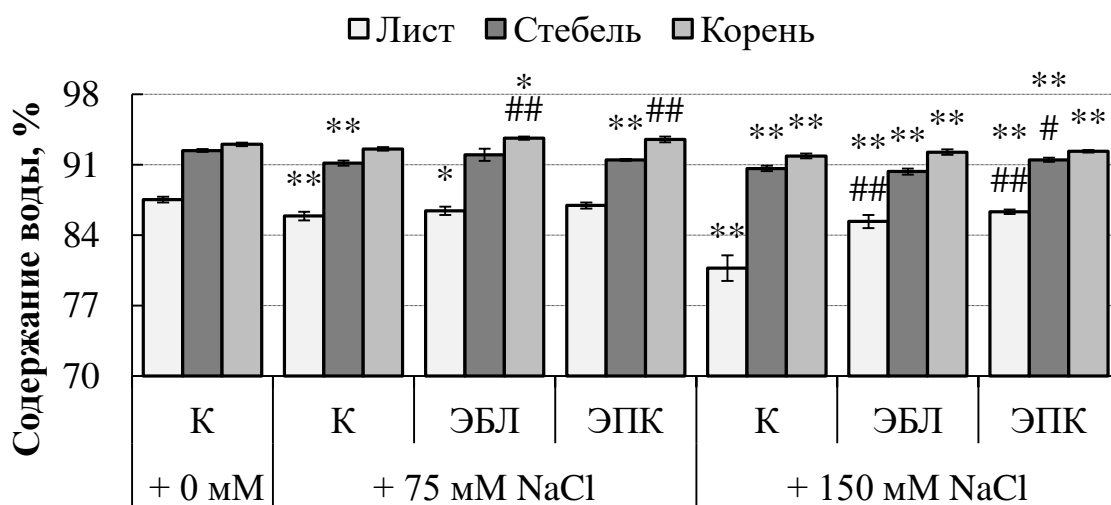


Рисунок 37. Длительное влияние высокой концентрации (1000 нМ) ЭБЛ или ЭПК при последующем пятисуточном хлоридном засолении на процентное содержание воды в разных органах растений картофеля. Буквой К обозначены контрольные варианты с необработанными БС растениями. \* – достоверные различия относительно контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.05$ , \*\* – при  $p \leq 0.01$ ; # – достоверные различия относительно варианта «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$ .

Длительное воздействие brassinosteroids при последующем хлоридном засолении, вне зависимости от его интенсивности, способствовало сохранению морфологических параметров: роста побега (10 нМ ЭБЛ) и корня (10 нМ ЭПК и 1000 нМ ЭБЛ), формированию узлов и столонов (10 нМ ЭБЛ), сохранению листьев (1000 нМ ЭПК), накоплению биомассы (10 и 1000 нМ ЭПК), поддержанию водного баланса (10 и 1000 нМ БС).

3.3.2 Влияние длительного воздействия ЭБЛ и ЭПК в культуре *in vitro* на содержание пролина и пигментов, ионный гомеостаз и функционирование фотосистемы II и другие физиологические параметры растений картофеля при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ)

Далее мы оценивали вклад длительного воздействия БС, разной химической структуры, на ответную реакцию растений при отложенном NaCl стрессе. Для этого фиксировали листья растений, обработанных 10 нМ БС, через 1, 3 и 5 суток воздействия хлорида натрия и определяли в них содержание пролина, фотосинтетических пигментов и степень ПОЛ. Изменение накопления транскриптов стресс-протекторных генов оценивали через одни сутки действия соли. Активность антиоксидантных ферментов определяли через 1 и 5 суток действия хлорида натрия. Аналогичные показатели, но только через пять суток воздействия NaCl выявляли в листьях растений, обработанных 1000 нМ БС. Содержание неорганических ионов и величину осмотического потенциала оценивали в листьях и корнях через пять суток действия соли при всех вариантах гормонального воздействия.

Поддержание водного баланса в тканях растений, обработанных БС при последующем хлоридном засолении, может свидетельствовать об эффективном функционировании регуляторов осмотического потенциала. В связи, с чем мы оценили влияние длительного воздействия БС на аккумуляцию осмолитов (органических – пролин, и неорганических – ионы) при последующем хлоридном засолении.

Известно, что БС, зачастую, проявляют протекторный механизм в условиях абиотического стресса, повышая уровень осмопротекторов, в частности пролина (Hafeez *et al.*, 2021).

На основании представленных данных можно отметить разнонаправленный эффект действия 10 нМ ЭБЛ и ЭПК. Лактонсодержащий brassinosteroid (ЭБЛ) ускорял аккумуляцию пролина при последующем действии NaCl (Рисунок 38). В то время, как ЭПК снижал накопление пролина через первые и третьи сутки при 75

мМ (на 22% от соответствующего солевого контроля), однако, с 5-х суток при 150 мМ содержание пролина было выше на 11% от соответствующего солевого контроля.

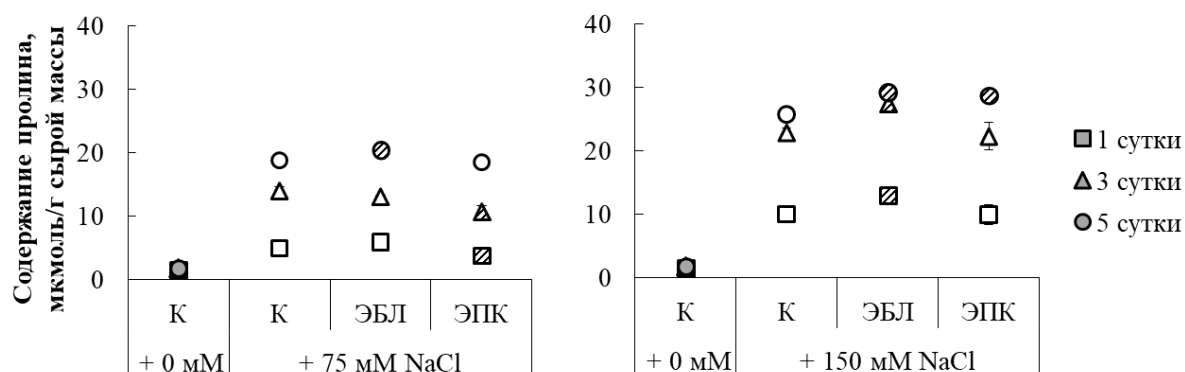


Рисунок 38. Длительное влияние 10 нМ ЭБЛ или ЭПК при последующем хлоридном засолении на суточную динамику накопления пролина в листьях растений картофеля. Достоверность отмечена цветом маркера (белый – отличие от варианта «контроль»; чёрный – отличие от варианта «контроль + соль» (75 или 150 мМ); чёрно-белый штрих – отличие от вариантов «контроль» и «контроль + соль») при  $p \leq 0.05$

Стоит отметить, что длительное воздействие 1000 нМ БС (Рисунок 39) при последующем хлоридном засолении (75 мМ NaCl) способствовало достоверному снижению содержания пролина на 10-15%. При увеличении концентрации хлорида натрия в два раза значение анализируемого параметра снижалось только в варианте с предобработкой ЭПК. В связи, с чем мы предполагаем, что разнонаправленность действия БС, в большей степени, проявляется при повышении концентрации стресс-фактора и/или фитогормона.



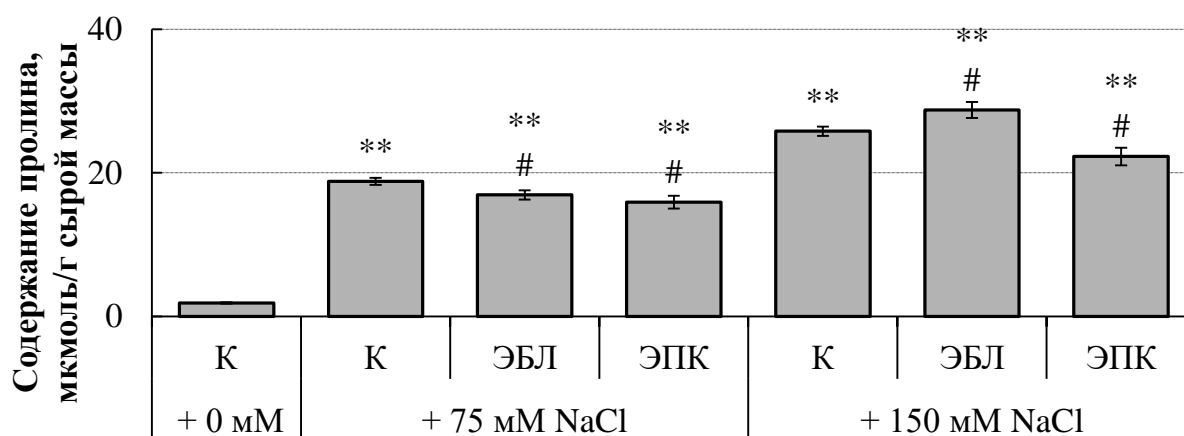


Рисунок 39. Длительное влияние 1000 нМ ЭБЛ или ЭПК при последующем пятисуточном хлоридном засолении на накопление пролина в листьях растений картофеля. Буквой К обозначены контрольные варианты с необработанными БС растениями. \* – достоверные различия относительно контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.05$ , \*\* – при  $p \leq 0.01$ ; # – достоверные различия относительно варианта «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$ .

Величина осмотического потенциала в растениях, обработанных 1000 нМ БС, при последующем засолении не имела значимых отличий с соответствующим солевым контролем (Рисунок 40Б). При этом 10 нМ ЭПК повышал осмотический потенциал в листьях картофеля (на 14-19%) вне зависимости от концентрации NaCl относительно соответствующего солевого контроля на пятые сутки, что возможно вызвано высоким содержанием влаги в тканях. Данная направленность действия ЭПК характерна и для растений, которые не подвергались действию стресса (Рисунок 18). В то время как, 10 нМ ЭБЛ понижал потенциал на 29%, что также характерно и для растений, выращенных в контрольных условиях (Рисунок 40А). В связи с чем, мы делаем вывод, что данный параметр, в большей степени, регулировался гормональным воздействием, а не хлоридным засолением.

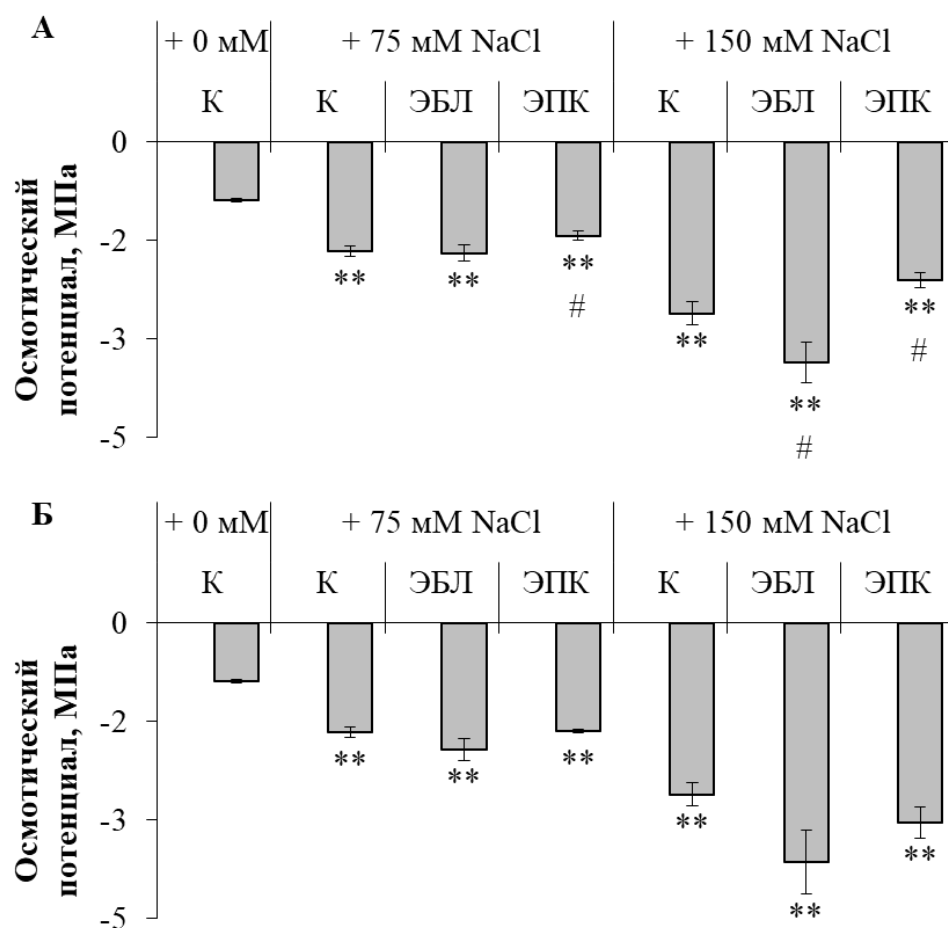


Рисунок 40 Длительное влияние ЭБЛ или ЭПК в концентрациях (10 (А) и 1000 (Б) нМ) при последующем пятисуточном хлоридном засолении на величину осмотического потенциала. Буквой К обозначены контрольные варианты с необработанными БС растениями. \* – достоверные различия относительно контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.05$ , \*\* – при  $p \leq 0.01$ ; # – достоверные различия относительно варианта «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$ .

В связи с этим мы оценивали содержание неорганических осмолитов – ионов через пять суток солевого воздействия. На основании данных, приведённых в таблице 23, мы предполагаем, что в выравнивании осмотического потенциала между обработанными 10 нМ ЭБЛ растениями и безгормональным контролем, при последующем засолении (75 мМ NaCl), участвовало дополнительное накопление ионов натрия.

На основании представленных в таблице 23 данных, можно отметить различные эффекты длительной предобработки брассиностероидами растений картофеля при последующем внесении NaCl в питательную среду. Так, в листьях при засолении (75 мМ) – 10 нМ лактонсодержащего БС способствовал усилению накопления ионов натрия, а увеличение концентрации ЭБЛ – снижению. В то время как, ЭПК, вне зависимости от концентрации, поддерживал содержание ионов натрия в листьях на уровне солевого контроля. При этом, БС не оказывали эффект на поступление ионов калия и только, при высокой концентрации хлорида натрия, ЭПК увеличивал поступления кальция в листья. ЭБЛ, в свою очередь, восстанавливал до контрольных значений накопление ионов магния.

Таблица 23. Длительное влияние ЭБЛ или ЭПК в концентрациях (10 или 1000 нМ) при последующем пятисуточном хлоридном засолении на содержание неорганических ионов в листьях (мг/г сухой массы, % от контрольного варианта).

Вариант	Натрий (Na)		Калий (K)		Кальций (Ca)		Магний (Mg)			
	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%		
<b>Контроль</b>	<b>0.33±0.08</b>	<b>100</b>	<b>49.95±0.22</b>	<b>100</b>	<b>2.89±0.17</b>	<b>100</b>	<b>1.92±0.21</b>	<b>100</b>		
<b>75 мМ</b>	0 нМ	32.23±0.68**	9767	27.23±1.28**	45	1.95±0.06*	67	1.61±0.05	84	
	10 нМ	ЭБЛ	38.90±2.57*** #	11788	27.63±1.82**	46	1.78±0.12**	61	1.53±0.10*	80
		ЭПК	34.26±2.26**	10381	23.83±1.57**	40	2.38±0.16	82	1.53±0.10*	80
	1000 нМ	ЭБЛ	27.08±1.79** #	8206	30.80±2.03**	51	1.76±0.12**	61	1.35±0.09*	70
		ЭПК	31.96±2.11**	9684	24.33±1.60**	41	2.54±0.17	88	1.56±0.10	81
<b>150 мМ</b>	0 нМ	53.67±0.94	16264	32.07±0.56**	53	2.32±0.29	80	1.01±0.05**	53	
	10 нМ	ЭБЛ	40.86±2.69*** ##	12383	37.85±2.50**	63	2.34±0.15	81	1.80±0.12#	94
		ЭПК	37.47±2.47** ##	11355	31.65±2.09**	53	3.11±0.21#	108	1.45±0.10*	76
	1000 нМ	ЭБЛ	50.30±3.32**	15243	34.73±2.29**	58	2.13±0.14*	74	1.25±0.08**	65
		ЭПК	42.38±2.79*** ##	12842	29.83±1.97**	50	3.31±0.22* #	114	1.44±0.09*	75

Примечание: \* – при сравнении с контрольными растениями  $p \leq 0.05$ , \*\* – при  $p \leq 0.01$  и # – при сравнении с контроль + соль  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$ .

В таблице 24 приведены значения количества ионов натрия, калия, кальция и магния в тканях корня. Так, 1000 нМ ЭПК (при 75 мМ) способствовал снижению содержания ионов натрия в тканях корня и накоплению дополнительно ионов калия, возможно за счёт обменного транспорта ионов. При более высокой концентрации хлорида натрия 10 нМ ЭПК демонстрировал барьерную функцию, снижая поступление ионов натрия и в корни, и в листья. При высокой

концентрации хлорида натрия БС стимулировали восстановление уровня ионов калия в корнях, в большей степени 1000 нМ ЭПК.

Таблица 24. Длительное влияние БС (10 и 1000 нМ) при последующем пятисуточном хлоридном засолении на содержание неорганических ионов в корнях (мкг/г сухой массы)

Вариант	Натрий (Na)		Калий (K)		Кальций (Ca)		Магний (Mg)			
	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%		
<b>Контроль</b>	<b>0.82±0.18</b>	<b>100</b>	<b>43.28±6.97</b>	<b>100</b>	<b>2.81±0.47</b>	<b>100</b>	<b>2.27±0.24</b>	<b>100</b>		
75 мМ	0 нМ	19.80±0.87*	2415	37.28±3.28	86	1.97±0.10	70	1.72±0.11	76	
	10 нМ	ЭБЛ	20.38±1.51*	2485	42.13±3.13	97	2.37±0.18	85	1.59±0.12*	70
		ЭПК	16.89±1.25*	2060	43.89±3.26	101	2.01±0.15	71	1.85±0.14	82
	1000 нМ	ЭБЛ	16.60±1.23*	2025	41.98±3.12	97	2.37±0.18	84	1.89±0.14	83
		ЭПК	15.70±1.17*##	1915	50.26±3.73#	116	1.65±0.12**	59	1.79±0.13	79
	150 мМ	0 нМ	37.82±1.10*	4612	18.93±1.51**	44	2.57±0.11	91	1.06±0.05**	47
10 нМ		ЭБЛ	36.83±2.74*	4492	29.07±2.16**##	67	1.96±0.15*#	70	0.94±0.07**	42
		ЭПК	33.11±2.46*#	4038	29.36±2.18**##	68	2.11±0.16	75	1.53±0.11*#	67
1000 нМ		ЭБЛ	38.12±2.83*	4649	28.20±2.09**##	65	2.27±0.17	81	0.96±0.07**	42
		ЭПК	37.96±2.82*	4630	33.87±2.52*##	78	2.29±0.17	81	1.36±0.10**	60

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

При этом, brassinosteroids почти не оказывали эффекта на накопление ионов магния, за исключением варианта с 150 мМ NaCl и предварительным воздействием 10 нМ ЭПК; наблюдалось восстановление значений на 20% относительно контроля.

Наряду с этим, БС (10 нМ) смещали соотношения ионов калия к ионам натрия в сторону калия в листьях растения картофеля, при 150 мМ соли, и 1000 нМ ЭБЛ и при 75 мМ хлорида натрия. В корнях наблюдался аналогичный эффект для всех исследуемых вариантов, кроме «10 нМ ЭБЛ с последующим 75 мМ засолением».

В связи с чем, мы продемонстрировали изменения избирательного транспорта ионов калия и натрия от корней к листьям (Таблица 25); данный параметр снижался при действии кетон-БС в двух концентрациях при низком уровне засоления, и только в высокой концентрации фитогормона при сильном засолении питательного раствора. Возможно, это свидетельствует об усилении

транспорта ионов натрия от корней к листьям и оттока калия к корням через сосуды флоэмы.

Брассиностероиды (за исключением 1000 нМ ЭБЛ) при 150 мМ засолении способствовали большему накоплению ионов кальция относительно ионов натрия в листьях. При более низкой концентрации хлорида натрия данный эффект демонстрировала предобработка только 1000 нМ ЭПК. При этом, соотношение  $[Ca^{++}]/[Na^+]$  в корнях существенно не изменялось. Влияние БС на селективность транспорта кальция относительно натрия к листьям при низкой концентрации соли зависело от структуры фитогормона: лактон-БС снижал данный параметр, а кетон-БС (1000 нМ) повышал. Однако с увеличением степени засоления раствора все БС стимулировали рост данного показателя (для 1000 нМ ЭБЛ достоверность не показана). На основании представленных данных можно отметить, что БС повышают приток ионов кальция в надземную часть растений, однако при низкой степени засоления ЭБЛ, напротив, приводит к аккумуляции в листьях больше натрия, относительно содержания кальция.

Таблица 25. Длительное влияние ЭБЛ и ЭПК в концентрации (10 или 1000 нМ) при последующем пятисуточном хлоридном засолении на соотношения неорганических ионов

Вариант	В листьях		В корнях		$S_{K^+,Na^+}$	$S_{Ca^{++},Na^+}$		
	$[K^+]/[Na^+]$	$[Ca^{++}]/[Na^+]$	$[K^+]/[Na^+]$	$[Ca^{++}]/[Na^+]$				
<b>Контроль</b>	<b>151.36±8.05</b>	<b>8.76±0.47</b>	<b>52.73±2.81</b>	<b>3.42±0.18</b>	<b>2.87±0.15</b>	<b>2.56±0.14</b>		
<b>75 мМ</b>	0 нМ	0.84±0.04*	0.06±0.00*	1.88±0.09*	0.10±0.01*	0.45±0.03*	0.61±0.04*	
	10 нМ	ЭБЛ	0.71±0.03*	0.05±0.00*	2.07±0.10*	0.12±0.00*	0.34±0.02*	0.39±0.03*#
		ЭПК	0.70±0.05*	0.07±0.00*	2.60±0.13*#	0.12±0.01*	0.27±0.02*#	0.59±0.04*
	1000 нМ	ЭБЛ	1.14±0.05*#	0.06±0.00*	2.53±0.10*#	0.14±0.02*	0.45±0.02*	0.46±0.03*#
		ЭПК	0.76±0.03*	0.08±0.01*#	3.20±0.18*#	0.11±0.01*	0.24±0.01*#	0.76±0.05*#
<b>150 мМ</b>	0 нМ	0.60±0.04*	0.04±0.00*	0.50±0.04*	0.07±0.00*	1.19±0.08*	0.64±0.05*	
	10 нМ	ЭБЛ	0.93±0.04*#	0.06±0.00*#	0.79±0.03*#	0.05±0.00*	1.17±0.07*	1.08±0.07*#
		ЭПК	0.84±0.03*#	0.08±0.01*#	0.89±0.04*#	0.06±0.00*	0.95±0.07*	1.30±0.09*#
	1000 нМ	ЭБЛ	0.69±0.02*	0.04±0.00*	0.74±0.04*#	0.06±0.00*	0.93±0.06*	0.71±0.05*
		ЭПК	0.70±0.00*	0.08±0.00*#	0.89±0.05*#	0.06±0.00*	0.79±0.05*#	1.29±0.09*#

Примечание: \* $p \leq 0.05$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$  при сравнении с контроль + соль

Защитное действие длительного воздействия brassinosterоидов, при отложенном на 14 суток стрессе, через сутки действия засоления определялось структурой фитогормона. Эпибрассинолид в концентрации 10 нМ полностью снимал негативный эффект 150 мМ NaCl в отношении хлорофилла *a* через сутки стрессового воздействия. С увеличением продолжительности действия NaCl эффективность ЭБЛ снижалась. Так, через 3-е суток воздействия отмечено частичное уменьшение отрицательного действия соли на накопление зелёных пигментов, а через 5 суток отмечена только тенденция, вне зависимости от концентрации гормона (Таблица 26).

В тоже время, показан выраженный защитный эффект лактонсодержащего БС для всех групп анализируемых пигментов при последующем 5-суточном действии 75 мМ NaCl. Причём, эффект усиливался с увеличением действующей концентрации гормона. Эпикастастерон демонстрировал защитное действие только при 150 мМ NaCl через сутки воздействия, уровень хлорофилла *a* и каротиноидов превышали соответствующие контрольные значения, однако через 5 суток действия соли ЭПК усиливал негативный эффект NaCl в отношении зелёных пигментов и каротиноидов.

Таблица 26. Длительное влияние ЭБЛ или ЭПК в концентрации 10 или 1000 нМ при последующем хлоридном засолении на содержание фотосинтезирующих пигментов в суточной динамике (мг/г сырой массы, % от контрольного значения соответствующих суток)

Вариант		Хлорофилл <i>a</i>		Хлорофилл <i>b</i>		Каротиноиды		
		мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>2.23±0.04</b>	<b>100</b>	<b>0.51±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.58±0.01</b>	<b>100</b>	
	75 мМ	0 нМ	2.12±0.04	95	0.51±0.02	99	0.54±0.01*	94
		10 нМ ЭБЛ	2.06±0.07*	93	0.44±0.02**###	85	0.55±0.02	95
		10 нМ ЭПК	2.36±0.13	106	0.52±0.02	102	0.63±0.04	110
	150 мМ	0 нМ	2.03±0.06**	91	0.47±0.02*	91	0.54±0.02*	93
		10 нМ ЭБЛ	2.21±0.07#	99	0.47±0.01*	92	0.58±0.02	101
10 нМ ЭПК		2.32±0.11###	104	0.48±0.02	93	0.64±0.04###	109	
3 сутки	<b>Контроль</b>	<b>2.43±0.04</b>	<b>100</b>	<b>0.51±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.63±0.01</b>	<b>100</b>	
	75 мМ	0 нМ	1.94±0.06**	80	0.40±0.02**	78	0.51±0.02**	81
		10 нМ ЭБЛ	2.07±0.06**	85	0.48±0.02###	93	0.50±0.02**	79
		10 нМ ЭПК	2.02±0.11**	83	0.41±0.03**	81	0.53±0.03**	83
	150 мМ	0 нМ	1.88±0.07**	77	0.43±0.02**	83	0.50±0.02**	79
		10 нМ ЭБЛ	2.06±0.04**#	85	0.48±0.01###	94	0.54±0.01**	85
10 нМ ЭПК		1.63±0.14**	67	0.35±0.03**#	68	0.45±0.03**	71	
5 сутки	<b>Контроль</b>	<b>2.31±0.05</b>	<b>100</b>	<b>0.49±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.59±0.02</b>	<b>100</b>	
	75 мМ	0 нМ	1.75±0.09**	75	0.39±0.02**	80	0.46±0.02**	78
		10 нМ ЭБЛ	2.00±0.07**#	86	0.46±0.02#	94	0.51±0.02**	87
		10 нМ ЭПК	1.95±0.20	84	0.42±0.05	86	0.50±0.05	86
		1000 нМ ЭБЛ	2.22±0.11###	96	0.51±0.02###	104	0.55±0.03#	94
		1000 нМ ЭПК	1.95±0.11**	84	0.44±0.03	91	0.51±0.03*	87
	150 мМ	0 нМ	1.63±0.06**	70	0.40±0.02**	82	0.43±0.01**	73
		10 нМ ЭБЛ	1.76±0.06**	76	0.41±0.01**	85	0.46±0.02**	79
		10 нМ ЭПК	1.16±0.08**###	50	0.24±0.02**###	50	0.34±0.02**###	58
		1000 нМ ЭБЛ	1.67±0.07**	72	0.38±0.01**#	79	0.44±0.02**	75
1000 нМ ЭПК		1.42±0.15**	61	0.34±0.04**	71	0.38±0.03**	65	

Примечание: \* –  $p \leq 0.05$ , \*\* –  $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и # –  $p \leq 0.05$ , ## –  $p \leq 0.01$  при сравнении с «контроль + соль»

Соотношения фотосинтезирующих пигментов показаны в таблице 27. Хлоридное засоление достоверно снижало соотношение зелёных пигментов через трое суток при концентрации 150 мМ и через пять при 75 мМ.

Соотношение [Хлорофилл *a*]/ [Хлорофилл *b*] в вариантах с ЭБЛ через трое суток было ниже, чем в контроле и более не изменялось до окончания эксперимента. В то время как, на зелёные пигменты растений, обработанных 10 нМ

ЭПК, хлорид натрия оказывал сходное действие (Таблица 27), что приводило к отсутствию изменений в соотношении [Хлорофилл *a*] / [Хлорофилл *b*] через трое и пять суток воздействия относительно соответствующих контрольных значений. Однако увеличение концентрации ЭПК до 1000 нМ приводило к большему снижению хлорофилла *a* через пять суток NaCl воздействия, и как следствие, снижению соотношения до уровня солевых контролей.

Таблица 27. Длительное влияние 10 и 1000 нМ ЭПК или ЭБЛ и последующего хлоридного засоления на соотношения фотосинтезирующих пигментов в суточной динамике (мг/г сырой массы)

Вариант		[Хлорофилл <i>a</i> ]/ [Хлорофилл <i>b</i> ]	([Хлорофилл <i>a</i> ] + [Хлорофилл <i>b</i> ]) / [Каротиноиды]	
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>4.42±0.07</b>	<b>4.79±0.06</b>	
	75 мМ	0 нМ	4.33±0.10	4.87±0.08
		10 нМ ЭБЛ	4.73±0.03 <sup>**##</sup>	4.54±0.02 <sup>**##</sup>
		10 нМ ЭПК	4.50±0.13	4.62±0.08 <sup>#</sup>
	150 мМ	0 нМ	4.38±0.07	4.67±0.06
		10 нМ ЭБЛ	4.68±0.02 <sup>**##</sup>	4.62±0.03 <sup>*</sup>
10 нМ ЭПК		4.83±0.13 <sup>**##</sup>	4.46±0.13 <sup>*</sup>	
3 сутки	<b>Контроль</b>	<b>4.81±0.07</b>	<b>4.67±0.04</b>	
	75 мМ	0 нМ	4.87±0.06	4.56±0.05
		10 нМ ЭБЛ	4.30±0.03 <sup>**##</sup>	5.09±0.05 <sup>**##</sup>
		10 нМ ЭПК	4.89±0.07	4.64±0.08
	150 мМ	0 нМ	4.47±0.05 <sup>**</sup>	4.58±0.06
		10 нМ ЭБЛ	4.27±0.02 <sup>**##</sup>	4.74±0.02 <sup>#</sup>
10 нМ ЭПК		4.70±0.12	4.36±0.12 <sup>*</sup>	
5 сутки	<b>Контроль</b>	<b>4.79±0.06</b>	<b>4.79±0.04</b>	
	75 мМ	0 нМ	4.56±0.06 <sup>*</sup>	4.66±0.05
		10 нМ ЭБЛ	4.37±0.03 <sup>**##</sup>	4.79±0.04 <sup>#</sup>
		10 нМ ЭПК	4.72±0.11	4.61±0.09
		1000 нМ ЭБЛ	4.38±0.12 <sup>**</sup>	4.95±0.05 <sup>**##</sup>
		1000 нМ ЭПК	4.42±0.06 <sup>**</sup>	4.69±0.04
	150 мМ	0 нМ	4.22±0.12 <sup>**</sup>	4.73±0.08
		10 нМ ЭБЛ	4.27±0.02 <sup>**</sup>	4.68±0.03
		10 нМ ЭПК	4.92±0.19 <sup>#</sup>	4.13±0.14 <sup>**##</sup>
1000 нМ ЭБЛ		4.34±0.04 <sup>**</sup>	4.65±0.03 <sup>*</sup>	
	1000 нМ ЭПК	4.13±0.07 <sup>**</sup>	4.56±0.11	

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль



Хлоридное засоление не оказывало достоверного эффекта на соотношение суммы зелёных пигментов к каротиноидам. Длительное воздействие ЭБЛ при последующем 75 мМ хлоридном засолении через трое и пять суток повышало данный показатель. Аналогичный эффект был отмечен при 150 мМ, но только через 3-е суток, что определялось значительным накоплением хлорофилла *b* в обоих случаях. Одновременно с этим, ЭБЛ и ЭПК в концентрации 10 нМ через одни сутки (75 мМ) и 10 нМ ЭПК через пять суток (150 мМ) хлоридного засоления, напротив, снижали соотношение зелёных пигментов к каротиноидам за счёт увеличения содержания каротиноидов в данных вариантах.

Далее нами показана динамика изменения степени перекисного окисления липидов в листьях растений картофеля, обработанных 10 нМ ЭБЛ или ЭПК через первые, третьи и пятые сутки воздействия 75 или 150 мМ хлорида натрия (Рисунок 41).

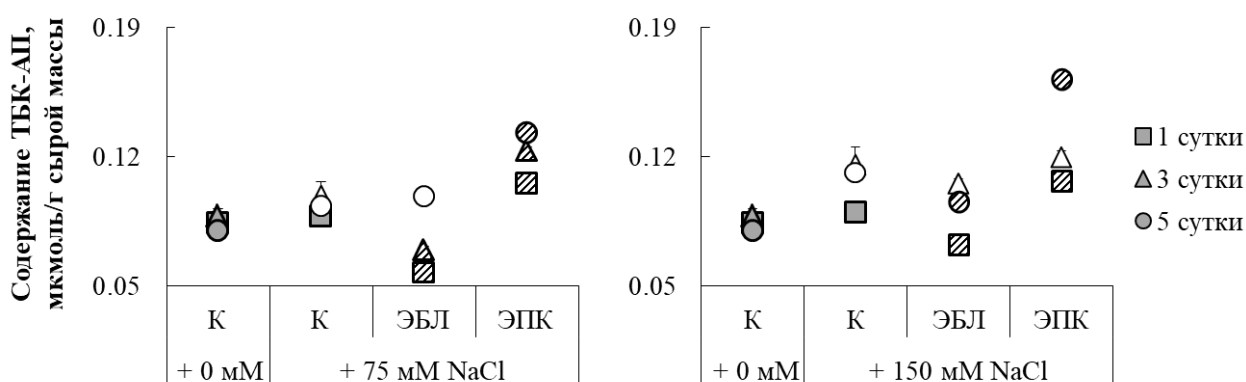


Рисунок 41. Длительное влияние 10 нМ ЭБЛ или ЭПК и последующего засоления на динамику накопления ТБК-АП через 1, 3 и 5-е сутки. Достоверность отмечена цветом маркера (белый – отличие от «контроля»; чёрный – отличие от «контроля + соль» (75 или 150 мМ); чёрно-белый штрих – отличие от «контроля» и «контроля + соль») при  $p \leq 0.05$ .

Хлоридное засоление вызывало повреждение мембран, начиная с третьих суток действия (Рисунок 32). При этом 10 нМ ЭБЛ способствовал снижению степени ПОЛ через 1 и 3-е сутки действия 75 мМ NaCl; с увеличением концентрации соли (150 мМ) ЭБЛ также достоверно снижал содержание ТБК-АП,

но только через первые и пятые сутки воздействия. Кетон-БС в концентрации 10 нМ, напротив, с первых суток способствовал дополнительному формированию ПОЛ и, через пять суток, данный показатель был на 42% (при 75 мМ) и 45% (при 150 мМ NaCl) выше соответствующего солевого контроля.

Использование более высокой концентрации brassinosterоидов (1000 нМ) вызывало аналогичный эффект через пять суток солевого воздействия (Рисунок 42). Эпибрасинолид снижал значение ПОЛ, а ЭПК, в свою очередь, повышал на 37 и 35%, относительно воздействия 75 и 150 мМ NaCl на необработанные фитогормонами растения. БС в концентрации 1000 нМ в отсутствии стрессора способствовали росту ПОЛ на 20-34% (Рисунок 16). Что может свидетельствовать об инициации и/или развитию окислительного стресса в ответ на предшествующее хлоридному засолению длительное воздействие кетонсодержащим brassinosterоидом. В связи, с чем мы оценивали активность антиоксидантных ферментов (Таблица 28).

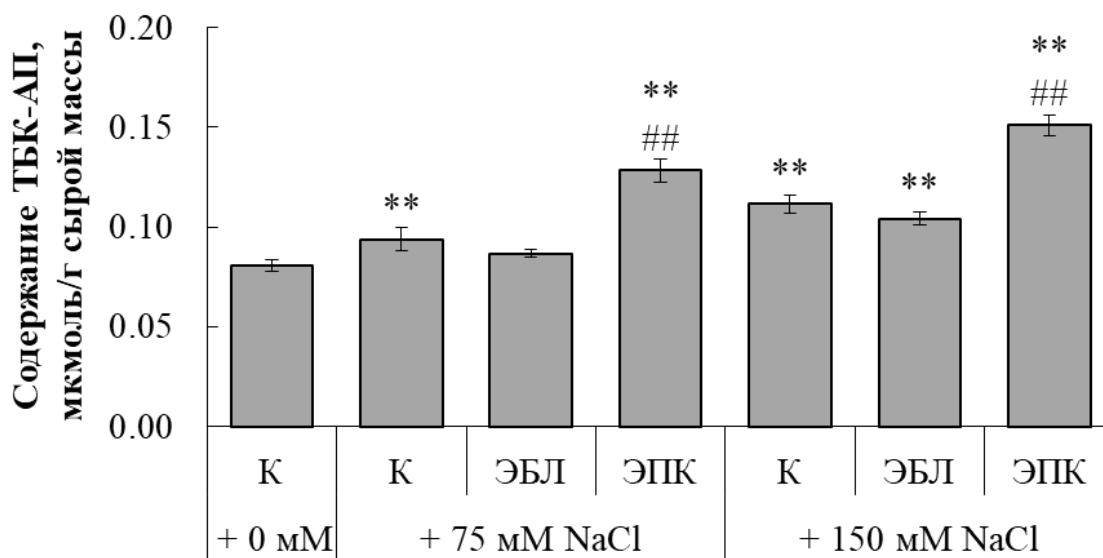


Рисунок 42. Длительное влияние 1000 нМ ЭБЛ и ЭПК с последующим пятисуточным засолением на интенсивность ПОЛ. Буквой К обозначены контрольные варианты с необработанными БС растениями. \* – достоверные различия относительно контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.05$ , \*\* – при  $p \leq 0.01$ ; # – достоверные различия относительно варианта «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$

В таблице 28 показано повышение активности антиоксидантных ферментов в растениях длительно предобработанных ЭБЛ через одни сутки последующего воздействия хлоридом натрия, вне зависимости от его концентрации. Так, активность СОД повышалась на 31-39 %, гваяколзависимой пероксидазы (ГПО) на 68% относительно контрольных значений. Эпикастастерон, напротив, снижал активность СОД через сутки действия 150 мМ NaCl (на 14% относительно контрольного варианта). Активность ГПО у растений, обработанных ЭПК, через сутки стрессового воздействия была незначительно выше, чем в солевых контролях.

Таблица 28. Длительное влияние 10 и 1000 нМ ЭБЛ и ЭПК и эффект последующего засоления на активность антиоксидантных ферментов через 1 и 5 суток.

Вариант		Активность СОД,		Активность пероксидазы,		
		усл.ед./мг.белка	%	усл.ед./мг.белка в мин.	%	
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>5.08±0.19</b>	<b>100</b>	<b>0.16±0.00</b>	<b>100</b>	
	<b>75 мМ</b>	0 нМ	6.14±0.56	121	0.20±0.02*	131
		10 нМ ЭБЛ	7.06±0.35**	139	0.25±0.02**	168
		10 нМ ЭПК	5.02±0.29	103	0.21±0.01**	136
	<b>150 мМ</b>	0 нМ	4.66±0.11	92	0.22±0.01**	141
		10 нМ ЭБЛ	6.65±0.37**##	131	0.26±0.01**##	168
		10 нМ ЭПК	4.37±0.23*	86	0.22±0.01**	139
	5 суток	<b>Контроль</b>	<b>8.99±0.76</b>	<b>100</b>	<b>0.45±0.05</b>	<b>100</b>
		<b>75 мМ</b>	0 нМ	17.03±1.68**	189	0.78±0.08**
10 нМ ЭБЛ			3.31±0.73**##	37	0.30±0.03**##	65
10 нМ ЭПК			3.40±0.16**##	38	0.22±0.01**##	48
<b>150 мМ</b>		1000 нМ ЭБЛ	3.30±0.30**##	37	0.42±0.03##	92
		1000 нМ ЭПК	1.95±0.30**##	21	0.22±0.01**##	48
		0 нМ	4.70±0.49**	52	0.74±0.09**	162
		10 нМ ЭБЛ	3.01±0.66**#	33	0.27±0.04**##	60
<b>150 мМ</b>		10 нМ ЭПК	2.55±0.40**##	28	0.26±0.01**##	58
		1000 нМ ЭБЛ	2.02±0.54**##	23	0.34±0.02**##	75
	1000 нМ ЭПК	3.05±0.21**##	34	0.25±0.01**##	56	

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

Увеличение продолжительности действия хлорида натрия до 5 суток способствовало повышению активности СОД при 75 мМ (на 89% от контроля) и её снижению при 150 мМ (на 48% от контроля); при этом, активность ГПО

увеличивалась на 62-72% от контрольных значений, вне зависимости от концентрации NaCl.

Активность СОД при предварительной гормональной обработке, вне зависимости от действующей концентрации и химической структуры гормона, а также интенсивности стрессового воздействия при последующем хлоридном засолении снижалась примерно на 62-79% от значений контрольного варианта. Сходный эффект был показан и на примере активности ГПО. Несмотря на повышение активности фермента в ответ на стрессовое воздействие, ЭПК снижали активность фермента на 42 и 52% от контроля при 150 и 75 мМ соответственно, при этом, интенсивность ответной реакции не зависела от концентрации кетонсодержащего БС. Уменьшение активности ГПО лактонсодержащим БС, в большей степени, проявлялось при концентрации гормона 10 нМ.

Ранее нами показаны значительные изменения уровня экспрессии ряда генов в ответ на односуточное воздействие хлорида натрия (Таблицы 21, 22). В связи с чем, мы оценивали эффект длительной гормональной обработки до действия стрессора. Как видно из данных, представленных в таблице 29, ЭБЛ при низкой концентрации хлорида натрия подавлял транскрипцию генов биосинтеза пролина (*P5CS1*, *P5CR*), не влияя на *PDH*, в то время как ЭПК, напротив, активировал экспрессию гена деградации, также показано увеличение числа транскриптов гена *P5CR*. Данные изменения отражались на накоплении пролина через первые сутки и на следующих точках фиксации (Рисунок 38). Хлорид натрия в концентрации 150 мМ стимулировал дополнительное накопление транскриптов генов *P5CR* и *PDH* в листьях растений, предварительно обработанных 10 нМ ЭБЛ. Наряду с этим, ЭПК подавлял синтез пролина до уровня контрольных растений, но сохранял экспрессию гена *PDH*. Повышение уровня пролина, при этом, может быть объяснено транспортом осмопротектора из нижних листьев или других частей растения.

Таблица 29. Влияние длительной обработки ЭБЛ и ЭПК (10 нМ) и последующего односуточного засоления на уровень экспрессии генов-маркеров стресса (% относительно контроля)

Вариант	<i>P5CS1</i>	<i>P5CR</i>	<i>PDH</i>	<i>CHS1a</i>	<i>APX3</i>	<i>NHX3</i>	
<b>Контроль</b>	<b>100±4</b>	<b>100±5</b>	<b>100±0</b>	<b>100±5</b>	<b>100±4</b>	<b>100±6</b>	
<b>75 мМ</b>	0 нМ	78±4**	140±5**	153±13**	45±2**	80±2**	70±6**
	ЭБЛ	68±4**	88±5##	92±13##	82±2***	78±5**	65±6**
	ЭПК	96±6#	165±9**	213±25**	95±5##	74±4**	113±6##
<b>150 мМ</b>	0 нМ	88±4*	211±9**	224±25**	35±0**	92±3	67±6**
	ЭБЛ	82±4**	198±14**	341±25***	61±2***	95±9	86±6
	ЭПК	63±2***	100±5##	254±13**	30±2***	61±2***	152±6***

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

Брассиностероиды способствовали сохранению уровня экспрессии гена биосинтеза флавоноидов (*CHS1a*) при последующем засолении (75 мМ); при 150 мМ NaCl только лактон-БС демонстрировал данный эффект.

Несмотря на рост активности гваяколзависимой пероксидазы при длительном воздействии БС в ответ на последующее засоление (75 мМ), уровень экспрессии генов синтеза аскорбатзависимой пероксидазы не изменялся. Однако с увеличением концентрации хлорида натрия, кетон-БС достоверно снижал накопление транскриптов гена *APX3*. В подтверждение представленных в таблице 25 (селективный транспорт) данных об усилении транспорта ионов натрия к листьям, нами отмечено увеличение числа транскриптов гена, кодирующего  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  транспортёр (*NHX3*) в ответ на обработку кетон-БС при последующем засолении.

Ранее нами был показан негативный эффект хлорида натрия через пять суток экспозиции (Таблица 20), а также положительный от длительного воздействия БС (Таблица 7) на максимальную фотохимическую эффективность ( $F_v/F_m$ ). Согласно данным, представленным в таблице 30, 10 нМ ЭБЛ достоверно повышал параметр  $F_v/F_m$  при последующем пятисуточном хлоридном засолении (75 мМ), либо сохранял на контрольном уровне при 150 мМ NaCl. Однако кетон-БС способствовал снижению максимальной фотохимической эффективности при последующем засолении (75 мМ) и его поддержанию при 150 мМ NaCl.

Значительное снижение фотохимического тушения флуоресценции (qP) вызывала только высокая концентрация хлорида натрия, при этом БС способствовали снижению негативного эффекта с достоверностью ( $p \leq 0.05$ ), за исключением ЭПК в концентрации 1000 нМ.

Таблица 30. Длительное влияние 10 и 1000 нМ ЭБЛ или ЭПК с последующим пятисуточным хлоридным засолением на параметры фотосистемы II

Вариант		ETR	qP	NPQ	Y (NPQ)	Fv/Fm	
<b>Контроль</b>		<b>100±2</b>	<b>100±2</b>	<b>100±8</b>	<b>100±9</b>	<b>100±1</b>	
<b>75 мМ</b>	0 нМ	100±3	101±2	118±15	110±15	100±1	
	10 нМ	ЭБЛ	96±1	102±2	127±11	128±7*	103±1* <sup>#</sup>
		ЭПК	102±2	98±2	188±14** <sup>##</sup>	125±14	97±1* <sup>##</sup>
	1000 нМ	ЭБЛ	95±1*	103±1	127±11	134±5*	98±2
		ЭПК	103±2	100±2	107±9	97±10	96±2
	<b>150 мМ</b>	0 нМ	75±6**	77±5**	202±23**	261±32**	89±3**
10 нМ		ЭБЛ	87±4*	97±4 <sup>#</sup>	197±48	206±47*	100±1 <sup>##</sup>
		ЭПК	97±2 <sup>##</sup>	94±2 <sup>##</sup>	116±14 <sup>##</sup>	118±14 <sup>##</sup>	101±1 <sup>##</sup>
1000 нМ		ЭБЛ	89±3*	94±2 <sup>##</sup>	127±21 <sup>#</sup>	155±25 <sup>#</sup>	98±2
		ЭПК	86±3*	90±5	144±9** <sup>#</sup>	173±15** <sup>#</sup>	97±4

Примечание: \* –  $p \leq 0.05$ , \*\* –  $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и # –  $p \leq 0.05$ , ## –  $p \leq 0.01$  при сравнении с «контроль + соль»

Наряду с этим, нефотохимическое тушение (NPQ) возрастало в ответ на засоление; ЭПК в концентрации 10 нМ увеличивал показатель при 75 мМ, но снижал его при 150 мМ, аналогичный эффект при высокой концентрации хлорида натрия вызывал и 1000 нМ ЭПК. Следующий параметр, регулируемый квантовый выход нефотохимического тушения (Y(NPQ)), при высокой концентрации хлорида натрия изменялся аналогичным образом. Низкая концентрация NaCl, напротив, способствовала повышению Y (NPQ) только в вариантах с предобработкой лактон-БС. ЭБЛ способствовал снижению относительной скорости транспорта электронов, как и хлоридное засоление, в то время как кетон-БС достоверно повышал данный показатель при 150 мМ до контрольных значений.

На схеме (Рисунок 43) приведены основные параметры фотосинтеза, и наглядно представлена разнонаправленность действия лактон- и кетон-БС.

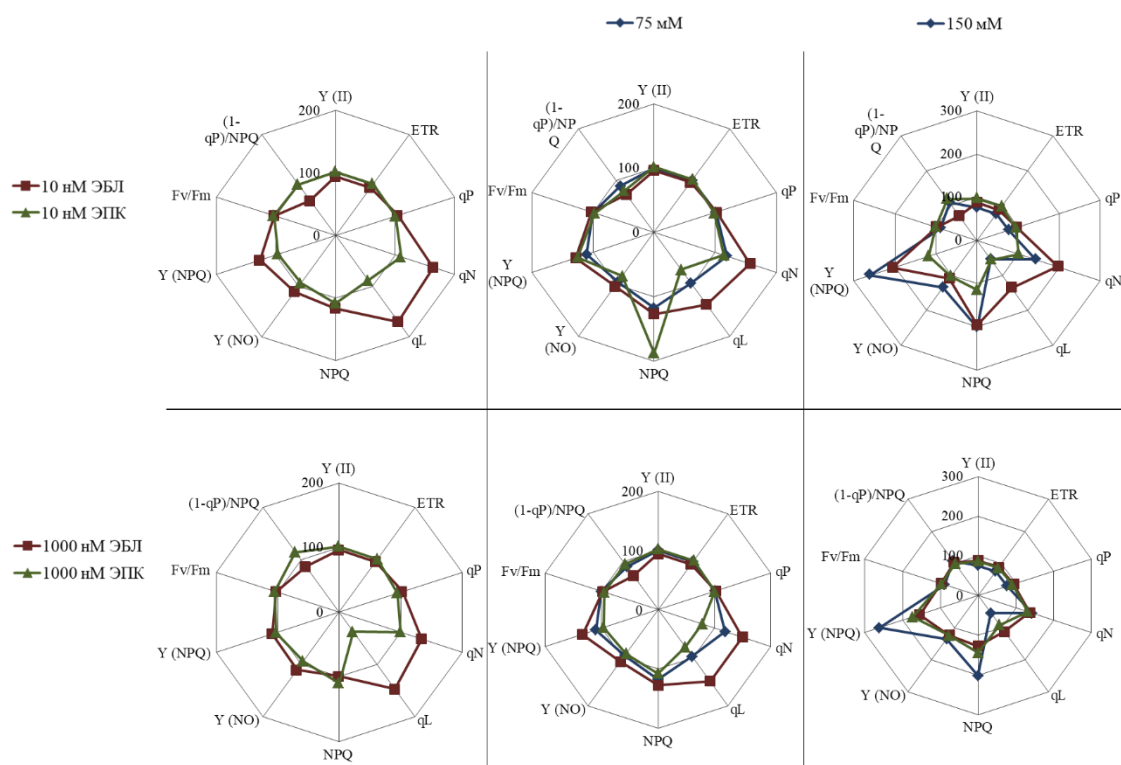


Рисунок 43. Схематическое изображение направленности длительного влияния 10 нМ и 1000 нМ БС при последующем хлоридном засолении на параметры второй фотосистемы. Данные представлены в процентах от контроля, контрольные значения соответствуют 100%.

Нами впервые продемонстрировано влияние длительного присутствия в питательной среде двух brassinостероидов, различающихся по химической структуре, на отложенное действие хлорида натрия (Рисунок 44). Мы исследовали динамику развития стресса у растений, обработанных 10 нМ БС. Так, лактонсодержащий brassinостероид способствовал формированию дополнительных ярусов, препятствовал потере влаги в корнях и листьях, что возможно объясняется более низкой величиной осмотического потенциала (в листьях). Мы также предполагаем, что скорость накопления пролина в ассимилирующих тканях из-за этого была ниже, что подтверждается снижением экспрессии генов метаболизма пролина (при 75 мМ). При этом отмечено отсроченное действие хлорида натрия на величину ПОЛ у растений, обработанных 10 нМ ЭБЛ, что, возможно, объясняется повышенным антиоксидантным статусом

растений уже через сутки негативного воздействия, также это могло способствовать накоплению молекул хлорофилла *b* на третьи сутки. Длительное (5 суток) присутствие хлорида натрия в среде приводило к снижению активности ферментов. При этом отмечено дополнительное поступление ионов кальция от корней к листьям, что может служить сигналом стресса. Предобработка ЭБЛ способствовала снижению негативного эффекта хлорида натрия на функционирование второй фотосистемы; об этом можно было судить по параметру  $F_v/F_m$  при двух концентрациях хлорида натрия и ряду других показателей ( $ETR$ ,  $qP$ ,  $NPQ$ ,  $Y(NPQ)$ ) при 150 мМ. Также лактон-БС способствовал сохранению экспрессии гена синтеза вторичных метаболитов (*CHS1a*). В свою очередь, увеличение используемой концентрации фитогормона приводило к снижению сырой и сухой массы растений, нивелировало эффект от БС на величину осмотического потенциала и содержание пролина при 150 мМ. При этом, наблюдалось значительное снижение поступления ионов натрия в листья растений картофеля, восстановление содержания фотосинтетических пигментов, поддержанию ПОЛ и активности ГПО на уровне контрольных значений (при 75 мМ).





24-эпибрассинолид (ЭБЛ)	24-эпикастастерон (ЭПК)
<p>10 нМ: <b>Сохраняет</b> рост побега, формирование столонов и узлов, а также уровень транскриптов гена <i>CHS1a</i>; Повышает содержание воды в листьях и корнях а также осмопротектора – пролина в листьях; повышает Fv/Fm; <b>Ингибирует</b> рост корня и <b>снижает</b> активность ферментов СОД и ГПО.</p> <p>Только при 75 мМ: повышает <b>накопление</b> ионов натрия в листьях и <b>снижает</b> содержание магния в листьях и корнях; <b>восстанавливает</b> содержание зелёных пигментов.</p> <p>Только при 150 мМ: <b>понижает</b> осмотический потенциал, степень ПОЛ, содержание ионов натрия в листьях и кальция в корнях; <b>восстанавливает</b> накопление ионов магния в листьях и qP второй фотосистемы; <b>повышает</b> содержание ионов калия в корнях.</p> <p>1000 нМ: <b>Сохраняет</b> рост корня, столонообразование, но <b>снижает</b> формирование узлов, сырую биомассу и активность ферментов СОД и ГПО.</p> <p>Только при 75 мМ: <b>повышает</b> оводненность тканей корня; <b>понижает</b> содержание пролина, ионов натрия и магния в листьях; <b>восстанавливает</b> содержание фотосинтетических пигментов.</p> <p>Только при 150 мМ: <b>снижает</b> сухую массу, накопление ионов кальция и хлорофилла <i>b</i>; <b>повышает</b> содержание воды, пролина в листьях и <b>восстанавливает</b> уровень ионов калия в корнях.</p>	<p>10 нМ: <b>Сохраняет</b> рост корня и оводненность тканей листа; <b>Повышает</b> уровень транскриптов гена <i>NHX3</i>, содержание ионов кальция в листьях и величину осмотического потенциала; <b>Ингибирует</b> рост побега и формирование узлов; <b>понижает</b> степень ПОЛ, <b>активность</b> ферментов СОД и ГПО.</p> <p>Только при 75 мМ: <b>восстанавливает</b> сырую биомассу и экспрессию гена <i>CHS1a</i>; <b>понижает</b> содержание магния в листе; <b>повышает</b> коэффициент NPQ и понижает Fv/Fm.</p> <p>Только при 150 мМ: <b>снижает</b> сухую массу, содержание ионов натрия в листьях и корнях, накопление фотосинтетических пигментов, степень ПОЛ и экспрессию гена <i>APX3</i>, при этом <b>восстанавливает</b> показатели второй фотосистемы (ETR, qP, NPQ, Y(NPQ), Fv/Fm); <b>повышает</b> содержание пролина и накопление ионов калия и магния в корнях.</p> <p>1000 нМ: <b>Снижает</b> рост побега и столонообразование, при этом <b>восстанавливает</b> количество листьев; <b>уменьшает</b> содержание пролина; <b>увеличивает</b> накопление ионов кальция в листьях и калия в корнях, а также степень ПОЛ.</p> <p>Только при 75 мМ: <b>снижает</b> рост корня, содержание ионов натрия и кальция в корнях и <b>увеличивает</b> накопление сырой биомассы и оводненность тканей корня.</p> <p>Только при 150 мМ: <b>увеличивает</b> накопление воды в тканях стебля и листьев; <b>снижает</b> содержание натрия в листьях</p>

Рисунок 44. Схематическое изображение длительного влияния 10 нМ и 1000 нМ БС при последующем хлоридном засолении.

Кетонсодержащий brassinosteroid, в свою очередь, снижал ростовые характеристики растений, но способствовал накоплению влаги в тканях, что позволяло увеличивать сырую массу всего растения. Скорость накопления пролина в листьях была ниже, чем у не обработанных растений, как и величина осмотического потенциала. Однако через сутки хлоридного воздействия экспрессия  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  транспортёра повышалась, что, возможно, проявлялось в более значительной аккумуляции ионов натрия. Через пять суток солевого воздействия относительно коэффициента межорганного транспорта отмечен приток ионов калия в ткани корня, что впоследствии может также активировать дополнительное поступление неорганических ионов в ксилему для повышения осмотического потенциала. При этом, ЭПК в большей степени стимулировал формирование ПОЛ и снижение активности ГПО (при 150 мМ) спустя сутки негативного воздействия хлорида натрия, а также СОД, через пятое.

### 3.3.3 Защитное действие кратковременной обработки brassinosteroidов на рост растений картофеля при последующем засолении

Ранее нами был продемонстрирован протекторный эффект 24-эпибрасинолида в ответ на хлоридное засоление (100 мМ) (Kolomeychuk *et al.*, 2020). Предполагая защитное действие brassinosteroidов, мы сравнивали эффекты от четырёхчасового замачивания корней растений картофеля в питательной среде с добавлением 0.1 нМ ЭБЛ или ЭПК и последующим переносом растений на безгормональную среду с 0, 75 или 150 мМ хлорида натрия. Далее, через 1, 3 и 5 суток мы фиксировали ростовые показатели растений.

Нами показано, что предобработка ЭБЛ способствовала снижению негативного эффекта хлоридного засоления, через пять при низкой (75 мМ), и через трое – при высокой (150 мМ) концентрации на рост побега. В то время как, предобработка ЭПК практически не влияла на рост осевых органов при последующем засолении (Рисунок 45).

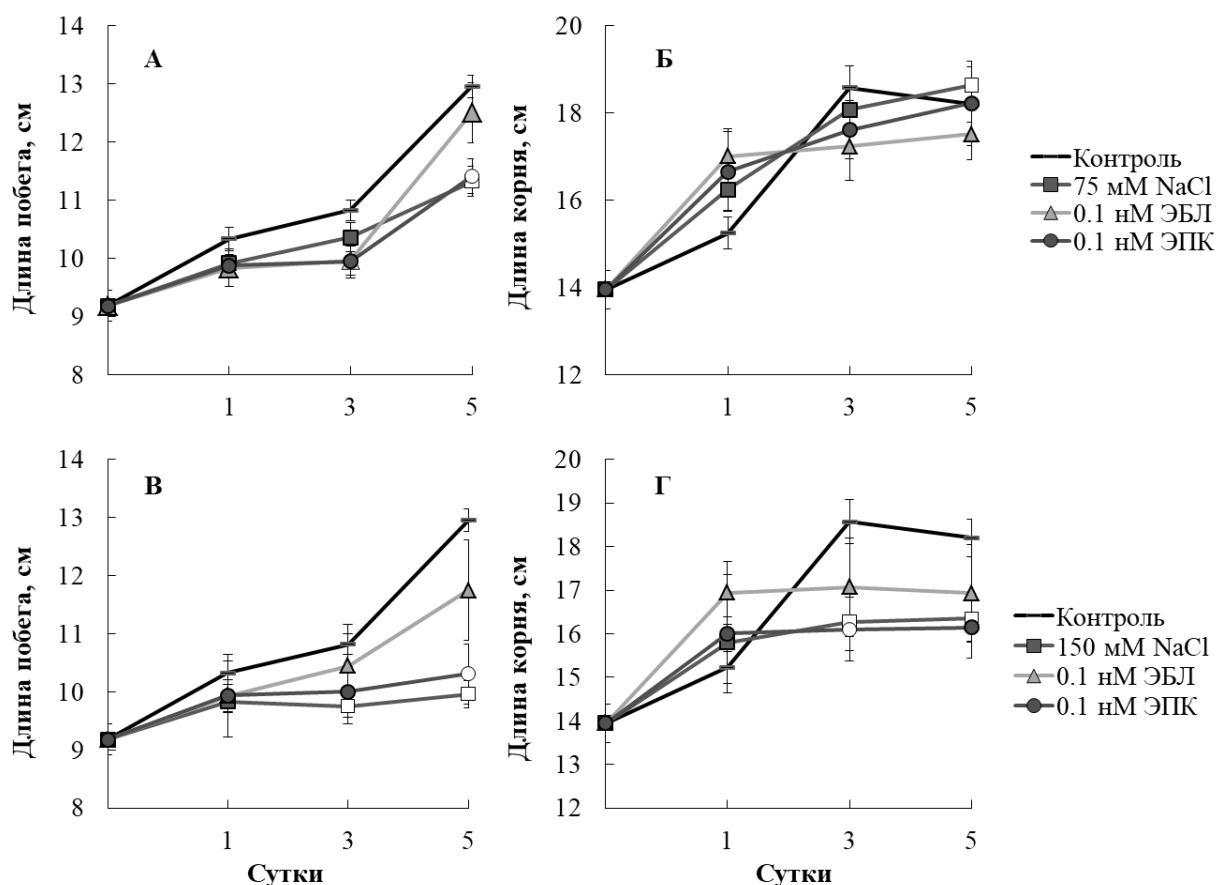


Рисунок 45. Кратковременное воздействие 0.1 нМ БС на длину осевых органов: побега (А, В) и корня (Б, Г) растений картофеля при последующем засолении (75 (А, Б) и 150 мМ (В, Г)) хлоридом натрия. Достоверность отмечена цветом маркера (белый – отличие от варианта «контроль» при  $p \leq 0.05$ ; чёрный – отличие от «контроль + соль» (75 или 150 мМ) при  $p \leq 0.05$ ; чёрно-белый штрих – отличие от «контроль» и «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ ).

Далее мы оценивали протекторный эффект БС на формирование узлов, в том числе листьев и столонов. Кратковременное воздействие БС в концентрации 0.1 нМ при последующем засолении хлоридом натрия (75 мМ) способствовало дополнительному формированию 12% узлов и 14-21% листьев, относительно контроля. При повышении концентрации хлорида натрия данный эффект обнаруживался в отношении сохранения числа узлов только для кетонсодержащего гормона (Рисунок 46).

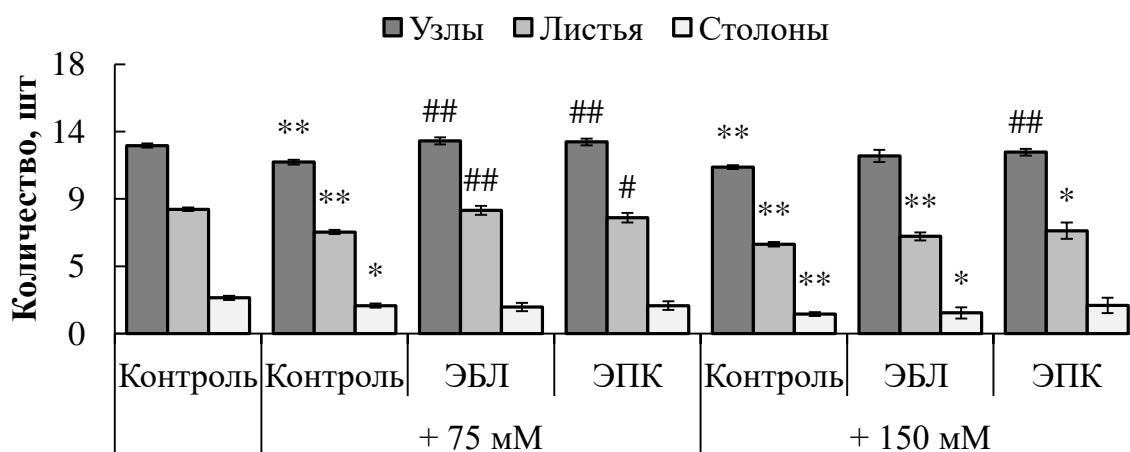


Рисунок 46. Кратковременное воздействие БС на количество узлов, в том числе листьев и столонов растений картофеля при последующем засолении хлоридном засолении. \* – достоверные различия относительно контрольного варианта соответствующего возраста при  $p \leq 0.05$ , \*\* – при  $p \leq 0.01$ ; # – достоверные различия относительно варианта «контроль + соль» при  $p \leq 0.05$ , ## – при  $p \leq 0.01$

Ранее нами было показано, что 0.1 нМ ЭПК при четырёх часовом воздействии способствовал накоплению сырой и сухой биомассы (Рисунок 22). При этом, из рисунка 47 следует, что предобработка brassinosteroids незначительно поддерживала накопление сухой массы растений при последующем действии 75 мМ NaCl однако, при этом достоверно не влияла на показатель сырой массы растений картофеля (характерно для 75 и 150 мМ NaCl).

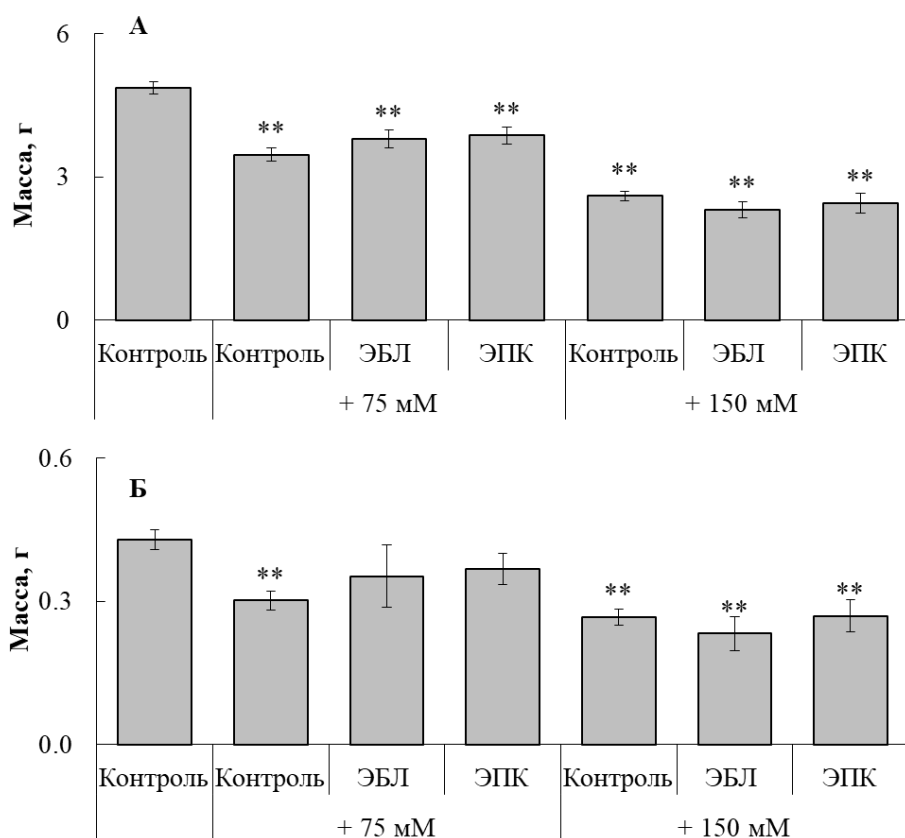


Рисунок 47. Кратковременное воздействие ЭБЛ и ЭПК на накопление сырой (А) или сухой (Б) массы растений картофеля при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ). \*\* – достоверные различия между средними значениями экспериментального и контрольного варианта при  $p \leq 0.01$ , \* – при  $p \leq 0.05$ .

Как нами ранее было отмечено, кратковременное воздействие БС положительно регулировало водный баланс в тканях растений (Таблица 10). Примечательно, что оводнение тканей, в большей степени, стимулировал ЭБЛ. Аналогичный эффект был показан и для растений, подвергнутых после гормональной обработки, воздействию хлорида натрия. Так, после предобработки лактон-БС и через пять суток солевого воздействия содержание воды было сходным, либо превышало (характерно для тканей корня) контрольные значения. Кетонсодержащий БС в отсутствие засоления не оказывал влияние на содержание влаги в тканях растений, и при отложенном действии высокой концентрации NaCl почти не поддерживал её (Рисунок 48).

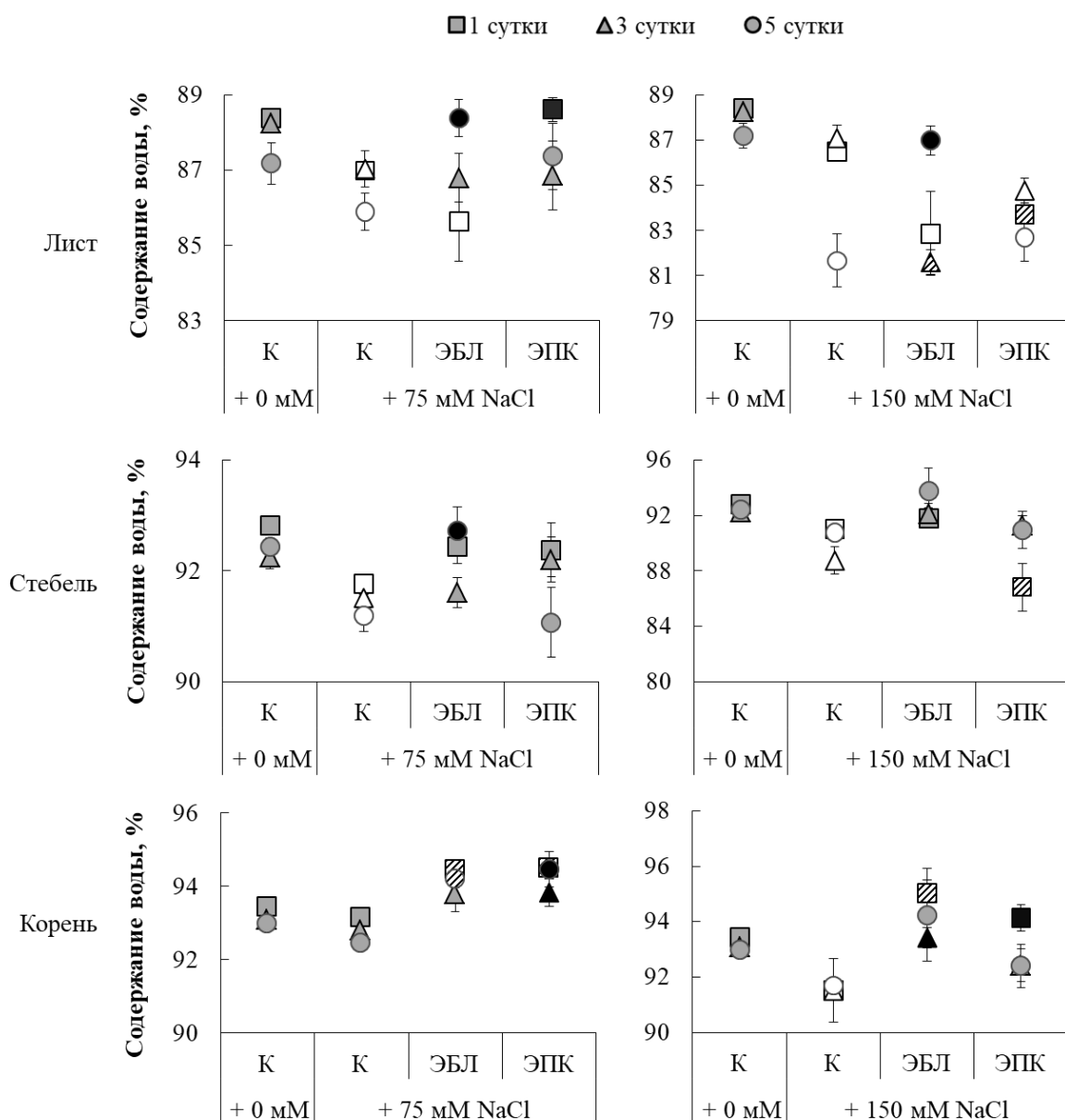


Рисунок 48. Кратковременное влияние 0.1 нМ ЭБЛ и ЭПК при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ) на динамику изменений процентного содержания воды в листьях, стеблях и корнях растениях картофеля. Достоверность отмечена цветом маркера (белый – отличие от «контроля»; чёрный – отличие от «контроля + соль» (75 или 150 мМ); чёрно-белый штрих – отличие от «контроля» и «контроля + соль») при  $p \leq 0.05$ .

Проявление защитного действия 0.1 нМ БС в отношении ростовых показателей, в значительной степени, определялось степенью засоления и химической структурой фитогормона. Так, при 75 мМ NaCl brassinosteroids

способствовали формированию узлов и листьев (Рисунок 46) и сохранению воды в тканях растений (Рисунок 48), и, только ЭБЛ, поддержанию скорости роста побега и корня (Рисунок 45). При более высокой концентрации хлорида натрия эффект фитогормонов сохранялся только для ряда показателей: формирование узлов (ЭПК) и аккумуляцию воды в тканях листьев (ЭБЛ), стеблей и корней (ЭБЛ и ЭПК).

3.3.4 Влияние кратковременного воздействия ЭБЛ и ЭПК в культуре *in vivo* на активность антиоксидантных ферментов, ионный гомеостаз, степень перекисного окисления липидов и другие физиологические параметры растений картофеля при последующем хлоридном засолении (75 и 150 мМ)

Далее мы оценивали протекторный эффект кратковременного воздействия БС по физиологическим показателям. Через 1, 3 и 5 суток воздействия хлорида натрия определяли содержание пролина, фотосинтетических пигментов и степени ПОЛ в листьях. Активность антиоксидантных ферментов (СОД и ГПО) выявляли в листьях – через 1 и 5 суток; уровень экспрессии стресс-протекторных генов в листьях – через одни сутки; накопление неорганических ионов в тканях листа и корня – через 5 суток.

Из данных, представленных на рисунке 49А, следует, что кратковременное воздействие ЭПК снижало накопление пролина на протяжении 5 суток эксперимента (при 150 мМ) и с третьих по пятые (при 75 мМ). В то время как ЭБЛ стимулировал накопление пролина только через трое суток воздействия 150 мМ NaCl (дополнительно на 48%, относительно соответствующих значений солевого контроля), при этом, через пять суток содержание пролина было ниже солевого контроля на 30%.

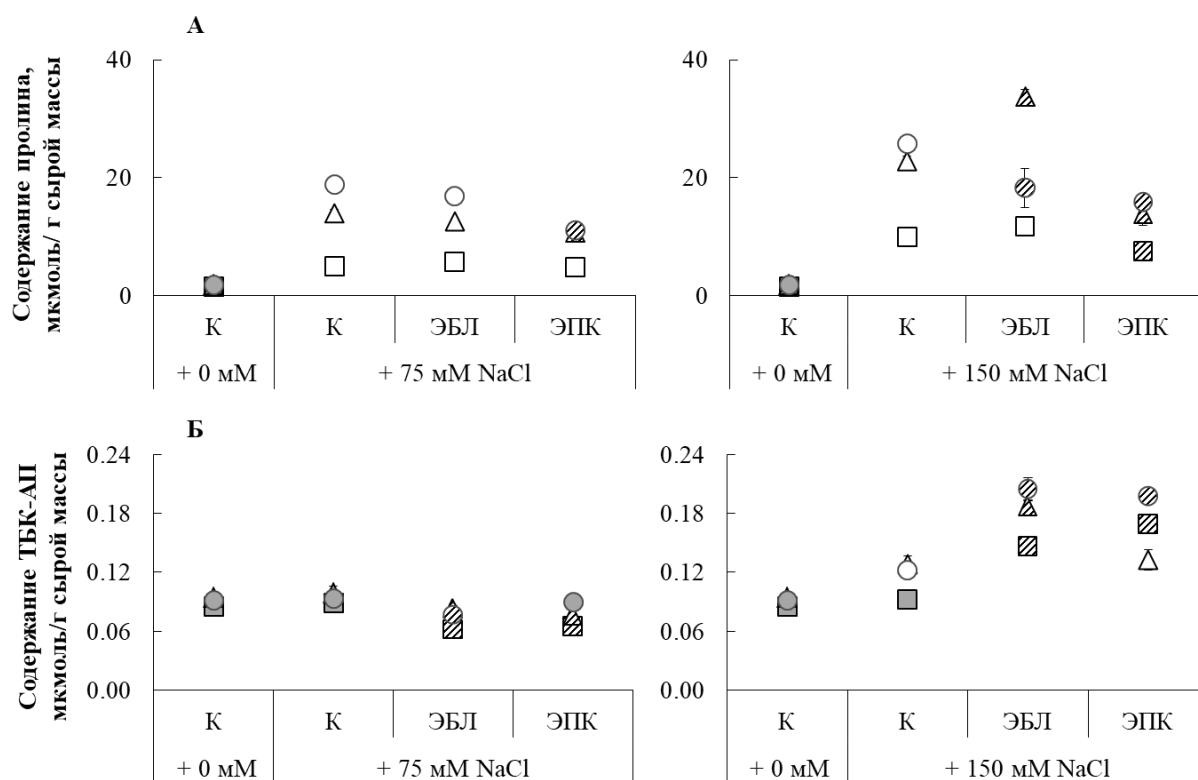


Рисунок 49. Кратковременное влияние 0.1 нМ ЭБЛ или ЭПК на содержание пролина (А) и степени ПОЛ (Б) в растениях картофеля при последующем хлоридном засолении. Достоверность отмечена цветом маркера (белый – отличие от «контроля»; чёрный – отличие от «контроля + соль» (75 или 150 мМ); чёрно-белый штрих – отличие от «контроля» и «контроля + соль») при  $p \leq 0.05$ .

Также следует отметить, что предобработка БС при последующем хлоридном засолении (75 мМ) уменьшает степень повреждения мембран (Рисунок 49Б). Так, БС способствовали снижению степени ПОЛ относительно необработанных растений на 29, 23 и 18% для ЭБЛ и 26, 15 и 5% для ЭПК через 1, 3 и 5 суток воздействия хлоридом натрия соответственно. В тоже время, при повышении используемой концентрации хлорида натрия, брассиностероиды, напротив, увеличивали содержание ТБК-АП относительно солевого контроля.

Одновременно с этим, кратковременное воздействие БС регулировало содержание фотосинтетических пигментов (Таблица 31). Через одни сутки воздействия, хлорид натрия оказывал достоверное негативное действие только в высокой концентрации (Рисунок 18). При этом, БС повышали содержание всех



фотосинтетических пигментов (исключение составил хлорофилл *b* при ЭПК) относительно контрольного уровня.

Таблица 31. Кратковременное влияние 0.1 нМ БС на динамику накопления фотосинтетических пигментов (мг/г сырой массы) при последующем хлоридном засолении (75 или 150 мМ).

Вариант		Хлорофилл <i>a</i>		Хлорофилл <i>b</i>		Каротиноиды		
		мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>2.23±0.04</b>	<b>100</b>	<b>0.51±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.58±0.01</b>	<b>100</b>	
	75 мМ	0 нМ	2.12±0.04	95	0.51±0.02	99	0.54±0.01 <sup>*</sup>	94
		ЭБЛ	2.31±0.14	104	0.47±0.04	91	0.59±0.04	102
		ЭПК	2.25±0.12	101	0.46±0.03 <sup>#</sup>	89	0.59±0.03	102
	150 мМ	0 нМ	2.03±0.06 <sup>**</sup>	91	0.47±0.02 <sup>*</sup>	91	0.54±0.02 <sup>*</sup>	93
		ЭБЛ	2.33±0.05 <sup>##</sup>	105	0.53±0.02 <sup>##</sup>	104	0.65±0.02 <sup>**##</sup>	113
		ЭПК	2.27±0.04 <sup>##</sup>	102	0.48±0.01 <sup>*</sup>	94	0.63±0.03 <sup>*##</sup>	110
	3 сутки	<b>Контроль</b>	<b>2.43±0.04</b>	<b>100</b>	<b>0.51±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.63±0.01</b>	<b>100</b>
		75 мМ	0 нМ	1.94±0.06 <sup>**</sup>	80	0.40±0.02 <sup>**</sup>	78	0.51±0.02 <sup>**</sup>
ЭБЛ			2.28±0.31	94	0.42±0.05	81	0.60±0.07	94
ЭПК			1.97±0.16 <sup>**</sup>	81	0.37±0.03 <sup>**</sup>	72	0.52±0.04 <sup>**</sup>	82
150 мМ		0 нМ	1.88±0.07 <sup>**</sup>	77	0.43±0.02 <sup>**</sup>	83	0.50±0.02 <sup>**</sup>	79
		ЭБЛ	2.11±0.09 <sup>**</sup>	87	0.51±0.03 <sup>#</sup>	99	0.56±0.02 <sup>*#</sup>	89
		ЭПК	2.02±0.06 <sup>**</sup>	83	0.43±0.01 <sup>**</sup>	84	0.54±0.02 <sup>**</sup>	86
5 сутки		<b>Контроль</b>	<b>2.31±0.05</b>	<b>100</b>	<b>0.49±0.01</b>	<b>100</b>	<b>0.59±0.02</b>	<b>100</b>
		75 мМ	0 нМ	1.75±0.09 <sup>**</sup>	75	0.39±0.02 <sup>**</sup>	80	0.46±0.02 <sup>**</sup>
	ЭБЛ		2.05±0.06 <sup>**##</sup>	89	0.42±0.02 <sup>**</sup>	87	0.56±0.02 <sup>**#</sup>	89
	ЭПК		2.11±0.16 <sup>#</sup>	91	0.45±0.04	93	0.56±0.04 <sup>#</sup>	96
	150 мМ	0 нМ	1.63±0.06 <sup>**</sup>	70	0.40±0.02 <sup>**</sup>	82	0.43±0.01 <sup>**</sup>	73
		ЭБЛ	1.67±0.13 <sup>**</sup>	72	0.40±0.04	82	0.53±0.07	90
		ЭПК	1.77±0.12 <sup>**</sup>	76	0.42±0.00 <sup>**</sup>	87	0.47±0.06 <sup>*</sup>	79

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

С увеличением продолжительности действия хлорида натрия, содержание пигментов достоверно снижалось для 75 и 150 мМ; через трое суток воздействия предобработка фитогормонами оказывала выраженное положительное влияние только в ответ на ЭБЛ и 150 мМ NaCl, восстанавливая содержание хлорофилла *b* и каротиноидов, относительно контроля третьих суток.

Через пять суток воздействия, достоверные отличия между растениями, обработанными фитогормонами, и необработанными были отмечены только при низкой концентрации соли. БС способствовали восстановлению пигментного состава, примечательно, что наибольший эффект на изучаемый показатель оказывала предобработка ЭПК.

Одновременно с этим мы проанализировали соотношения зелёных пигментов ( $[Xлорофилл\ a] / [Xлорофилл\ b]$ ) и соотношение их суммы к каротиноидам ( $([Xлорофилл\ a] + [Xлорофилл\ b]) / [Каротиноиды]$ ) (Таблица 32). Предобработка ЭБЛ в большей степени, чем ЭПК при последующем хлоридном засолении (75 мМ) увеличивала показатель  $[Xлорофилл\ a] / [Xлорофилл\ b]$  через 1 и 3 суток воздействия. Через пять суток данный эффект проявлялся только для ЭБЛ. Предположительно, за счёт большего снижения уровня хлорофилла *b* (Таблица 32).

При повышении концентрации NaCl до 150 мМ, изменение количества хлорофиллов *a* и *b* происходило неравномерно. Так, предобработка ЭБЛ через 1 и 5 суток солевого воздействия не влияла на соотношение, через три – значительно снижала, возможно, в связи с увеличением содержания хлорофилла *b*. В то время как, ЭПК повышал данный показатель через 1 и 3-е суток и не изменял через пять.

Соотношение хлорофиллов к каротиноидам незначительно снижалось на протяжении 5 суток действия хлорида натрия относительно контроля. БС стимулировал дополнительное снижение данного показателя только в ряде случаев: ЭБЛ через 1 и 5 суток действия 150 мМ NaCl и ЭПК после первых суток воздействия хлорида натрия (75 мМ) (Таблица 32).

Таблица 32. Кратковременное влияние 0.1 нМ ЭБЛ или ЭПК на соотношения фотосинтетических пигментов при последующем хлоридном засолении (75 или 150 мМ)

Вариант	[Хлорофилл а]/ [Хлорофилл b]	([Хлорофилл а] + [Хлорофилл b]) / [Каротиноиды]		
<b>Контроль</b>	<b>4.42±0.07</b>	<b>4.79±0.06</b>		
1 сутки	75 мМ	0 нМ	4.33±0.10	4.87±0.08
		ЭБЛ	5.01±0.11 <sup>** ##</sup>	4.70±0.04
		ЭПК	4.92±0.08 <sup>** ##</sup>	4.58±0.07 <sup>* ##</sup>
	150 мМ	0 нМ	4.38±0.07	4.67±0.06
		ЭБЛ	4.38±0.09	4.39±0.04 <sup>** ##</sup>
		ЭПК	4.71±0.07 <sup>** ##</sup>	4.38±0.13 <sup>**</sup>
<b>Контроль</b>	<b>4.81±0.07</b>	<b>4.67±0.04</b>		
3 сутки	75 мМ	0 нМ	4.87±0.06	4.56±0.05
		ЭБЛ	5.44±0.11 <sup>** ##</sup>	4.49±0.08 <sup>*</sup>
		ЭПК	5.31±0.03 <sup>** ##</sup>	4.52±0.05 <sup>*</sup>
	150 мМ	0 нМ	4.47±0.05 <sup>**</sup>	4.58±0.06
		ЭБЛ	4.15±0.06 <sup>** ##</sup>	4.64±0.08
		ЭПК	4.67±0.06 <sup>#</sup>	4.54±0.05 <sup>*</sup>
<b>Контроль</b>	<b>4.79±0.06</b>	<b>4.79±0.04</b>		
5 сутки	75 мМ	0 нМ	4.56±0.06 <sup>**</sup>	4.66±0.05 <sup>*</sup>
		ЭБЛ	4.86±0.10 <sup>#</sup>	4.71±0.08
		ЭПК	4.68±0.05	4.55±0.06 <sup>**</sup>
	150 мМ	0 нМ	4.22±0.12 <sup>**</sup>	4.73±0.08
		ЭБЛ	4.18±0.13 <sup>**</sup>	3.95±0.17 <sup>** ##</sup>
		ЭПК	4.18±0.26 <sup>*</sup>	4.73±0.29

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

Функционирование второй фотосистемы через пять суток солевого воздействия снижалось, о чём свидетельствует снижение значений максимального квантового выхода ( $F_v/F_m$ ) и скорости транспорта электронов (ETR). При этом параметры нефотохимического тушения ( $q_N$ , NPQ) и рассеивания энергии ( $Y$  (NPQ),  $Y$  (NO)) возрастали. Предобработка ЭБЛ, при низкой концентрации соли (75 мМ), дополнительно усиливала нефотохимическое регулируемое тушение флуоресценции, в то время как ЭПК способствовал снижению данного показателя и росту нерегулируемого рассеивания тепловой энергии ( $Y$  (NO)) (Таблица 33).

Таблица 33. Кратковременное влияние 0.1 нМ ЭБЛ или ЭПК на показатели второй фотосистемы (% от контрольного значения) при последующем хлоридном засолении (75 или 150 мМ)

Вариант	ETR	qN	NPQ	Y (NPQ)	Y (NO)	Fv/Fm	
<b>Контроль</b>	100±2	100±12	100±8	100±8	100±4	100±2	
<b>75 мМ</b>	0 нМ	93±2 <sup>*</sup>	113±17	114±11	128±10 <sup>*</sup>	113±6	99±2
	ЭБЛ	94±9	158±1 <sup>**#</sup>	153±13 <sup>*#</sup>	155±24 <sup>*</sup>	102±24	99±6
	ЭПК	93±2 <sup>*</sup>	56±21	74±4 <sup>*</sup>	93±7 <sup>##</sup>	126±4 <sup>**</sup>	97±4
<b>150 мМ</b>	0 нМ	60±5 <sup>**</sup>	108±18	219±56 <sup>*</sup>	329±51 <sup>**</sup>	161±17 <sup>*</sup>	82±3 <sup>**</sup>
	ЭБЛ	67±15 <sup>*</sup>	97±15	117±13	207±44 <sup>*</sup>	179±38	80±8 <sup>*</sup>
	ЭПК	79±1 <sup>**##</sup>	179±13 <sup>**#</sup>	168±11 <sup>**</sup>	220±6 <sup>**</sup>	130±4 <sup>**</sup>	98±2 <sup>##</sup>

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

Высокая концентрация (150 мМ) приводила к снижению параметров qN, NPQ, при росте Y (NPQ) и Y(NO) для растений, обработанных ЭБЛ, в большей степени, чем ЭПК. Однако восстановление Fv/Fm и ETR характерно только для обработки ЭПК.

Наряду с этим, нами было определено накопление неорганических ионов (натрия, калия, кальция и магния) в тканях листа и корня через 5 суток воздействия (Таблица 34). Было показано, что кетон-БС при последующем засолении (150 мМ) стимулирует аккумуляцию ионов натрия в тканях листа, и оба фитогормона – в тканях корня. При этом БС, вне зависимости от химической структуры, при засолении (75 мМ) поддерживали содержание ионов калия в тканях корня на уровне контроля. Брассиностероиды, ожидаемо, стимулировали накопление ионов кальция, вне зависимости от химической структуры и степени засоления, относительно солевых контролей, при этом достоверные изменения наблюдались в тканях корня при 150 мМ NaCl. Предобработка БС способствовала сохранению ионов магния в листьях при последующем хлоридном засолении (150 мМ).

Таблица 34. Кратковременное влияние 0.1 нМ ЭБЛ или ЭПК на содержание неорганических ионов (мг/г сухой массы) при последующем хлоридном засолении

Вариант	Натрий (Na)		Калий (K)		Кальций (Ca)		Магний (Mg)		
	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	мг/г	%	
Лист									
<b>Контроль</b>	<b>0.33±0.08</b>	<b>100</b>	<b>49.95±0.22</b>	<b>100</b>	<b>2.89±0.17</b>	<b>100</b>	<b>1.92±0.21</b>	<b>100</b>	
<b>75 мМ</b>	0 нМ	32.23±0.68**	9767	27.23±1.28**	55	1.95±0.06*	67	1.61±0.05	84
	ЭБЛ	35.86±2.82**	10867	22.26±1.75**	45	2.27±0.18	79	1.44±0.13*	75
	ЭПК	35.69±2.80**	10815	21.06±1.65**	42	2.08±0.16*	72	1.47±0.12*	77
<b>150 мМ</b>	0 нМ	53.67±0.94**	16264	32.07±0.56**	64	2.32±0.29	80	1.01±0.05**	53
	ЭБЛ	52.19±4.10**	15815	29.52±2.32**	59	2.42±0.19	84	1.43±0.12**	75
	ЭПК	64.58±5.07**##	19570	29.08±2.28**	58	2.33±0.18	81	1.39±0.10**	72
Корень									
<b>Контроль</b>	<b>0.82±0.18</b>	<b>100</b>	<b>43.28±6.97</b>	<b>100</b>	<b>2.81±0.47</b>	<b>100</b>	<b>2.27±0.24</b>	<b>100</b>	
<b>75 мМ</b>	0 нМ	19.80±0.87**	2245	37.28±3.28	92	1.97±0.10*	71	1.72±0.11*	76
	ЭБЛ	19.62±1.55**	2393	49.62±3.90#	115	2.17±0.17	77	1.89±0.15	83
	ЭПК	23.08±1.83**	2815	45.56±3.58#	105	2.35±0.17	84	1.97±0.12	87
<b>150 мМ</b>	0 нМ	37.82±1.10**	4591	18.93±1.51**	50	2.57±0.11*	97	1.06±0.05**	46
	ЭБЛ	50.05±3.90**##	6104	22.11±1.74**	51	3.19±0.27#	114	1.07±0.06**	47
	ЭПК	46.85±3.68**##	5713	18.76±1.52**	43	3.16±0.23#	112	1.04±0.08**	46

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

Брассиностероиды способствовали снижению коэффициента селективного транспорта ионов калия и натрия ( $S_{K^+,Na^+}$ ) при последующем внесении 75 мМ NaCl (Таблица 35). Возможно, это обуславливается, как снижением калий-натриевого соотношения в листьях, так и ростом  $[K^+]/[Na^+]$  в корнях (только для ЭБЛ). Демонстрируя приток калия в корни растений картофеля. При этом, на селективный транспорт кальция/натрия БС не оказывали влияние, а при повышении используемой концентрации хлорида натрия был нивелирован их эффект и для  $S_{K^+,Na^+}$ .

Таблица 35. Кратковременное влияние БС на соотношения неорганических ионов и селективный транспорт ( $S_{K^+,Na^+}$ ;  $S_{Ca^{++},Na^+}$ ) при последующем хлоридном засолении

Вариант	В листьях		В корнях		$S_{K^+,Na^+}$	$S_{Ca^{++},Na^+}$
	$[K^+]/[Na^+]$	$[Ca^{++}]/[Na^+]$	$[K^+]/[Na^+]$	$[Ca^{++}]/[Na^+]$		
<b>Контроль</b>	<b>151.36±8.05</b>	<b>8.76±0.47</b>	<b>52.73±2.81</b>	<b>3.42±0.18</b>	<b>2.87±0.15</b>	<b>2.56±0.14</b>
<b>75 мМ</b>	0 нМ	0.84±0.04 <sup>**</sup>	0.06±0.00 <sup>**</sup>	1.88±0.09 <sup>**</sup>	0.10±0.01 <sup>**</sup>	0.45±0.03 <sup>**</sup>
	ЭБЛ	0.62±0.05 <sup>**#</sup>	0.06±0.01 <sup>**</sup>	2.53±0.18 <sup>**##</sup>	0.11±0.01 <sup>**</sup>	0.25±0.02 <sup>**##</sup>
	ЭПК	0.59±0.04 <sup>**##</sup>	0.06±0.00 <sup>**</sup>	1.97±0.12 <sup>**</sup>	0.10±0.00 <sup>**</sup>	0.30±0.2 <sup>**#</sup>
<b>150 мМ</b>	0 нМ	0.60±0.04 <sup>**</sup>	0.04±0.00 <sup>**</sup>	0.50±0.04 <sup>**</sup>	0.07±0.00 <sup>**</sup>	1.19±0.08 <sup>**</sup>
	ЭБЛ	0.57±0.04 <sup>**</sup>	0.05±0.00 <sup>**</sup>	0.44±0.03 <sup>**</sup>	0.06±0.01 <sup>**</sup>	1.28±0.08 <sup>**</sup>
	ЭПК	0.45±0.03 <sup>**#</sup>	0.04±0.01 <sup>**</sup>	0.40±0.04 <sup>**</sup>	0.07±0.01 <sup>**</sup>	1.12±0.09 <sup>**</sup>

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

Далее мы оценивали влияние кратковременной предобработки БС на активность антиоксидантных ферментов (СОД и ГПО) при последующем 1 и 5 суточном воздействии NaCl (Таблица 36). Лактон-БС значительно снижал активность супероксиддисмутазы (на 28%) через одни сутки воздействия 75 мМ NaCl, данный эффект усиливался и, через 5 суток активность составляла 45% относительно контроля соответствующих суток. При этом, кетон-БС снижал активность СОД на 70% только на пятые сутки действия 75 мМ хлорида натрия. Стоит отметить, что увеличение используемой концентрации хлорида, напротив, способствовало росту активности СОД в листьях у предобработанных растений. Также из данных, представленных в таблице 36, следует, что активность ГПО через одни сутки воздействия 75 мМ NaCl значительно возрастала в ответ на предобработку 0.1 нМ ЭПК. Однако через пять суток активность достоверно не отличалась от контрольных значений для обоих фитогормонов. В то время как в листьях у не предобработанных растений, возрастала на 62-72%, вне зависимости от концентрации хлорида натрия. Также стоит отметить, что при 150 мМ NaCl лактон-БС повышал активность ГПО дополнительно, на 104%, по сравнению с солевым контролем.

Таблица 36. Кратковременное влияние 0.1 нМ ЭБЛ или ЭПК на активность антиоксидантных ферментов (СОД, ГПО) при последующем хлоридном засолении (75 или 150 мМ)

Вариант		Активность СОД,		Активность пероксидазы,		
		усл.ед./мг.белка	%	усл.ед./мг.белка в мин.	%	
1 сутки	<b>Контроль</b>	<b>5.08±0.19</b>	<b>100</b>	<b>0.16±0.00</b>	<b>100</b>	
	75 мМ	0 нМ	6.14±0.56	121	0.20±0.02*	131
		ЭБЛ	3.66±0.23**##	72	0.17±0.01	111
		ЭПК	5.29±0.54	104	0.26±0.01**#	165
5 сутки	<b>Контроль</b>	<b>8.99±0.76</b>	<b>100</b>	<b>0.45±0.05</b>	<b>100</b>	
	75 мМ	0 нМ	17.03±1.68**	189	0.78±0.08**	172
		ЭБЛ	4.94±0.72**##	55	0.39±0.05##	87
		ЭПК	2.65±0.61**##	29	0.40±0.05##	89
	150 мМ	0 нМ	4.70±0.49**	52	0.74±0.09**	162
		ЭБЛ	8.64±1.93#	96	1.21±0.14**##	266
ЭПК		10.98±0.07**##	122	0.88±0.11**	193	

Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

Кратковременное воздействие БС через сутки после внесения хлорида натрия (75 мМ) в питательную среду подавляло транскрипцию гена, кодирующего халкон-синтазу 1 $\alpha$  – фермента синтеза флавоноидов (Таблица 37). При этом, только кетон-БС снижал экспрессию гена, кодирующего Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> транспортёр (*NHX3*), однако это не отобразилось на накоплении ионов натрия через пять суток в тканях листа (Таблица 33). Наряду с этим, ЭПК также стимулировал накопление транскриптов гена аскорбат-пероксидазы (*APX3*), что свидетельствует, в совокупности с данными по активности антиоксидантных ферментов (Таблица 36), о повышении антиоксидантного статуса растений. Также, для кетон-БС отмечено пятикратное увеличение экспрессии гена, кодирующего фермент деградации пролина (*PDH*), что соответствует подавлению аккумуляции пролина (Рисунок 49).

Таблица 37. Кратковременное влияние БС на уровень экспрессии некоторых стресс-протекторных генов при последующем хлоридном засолении

Вариант	<i>P5CS1</i>	<i>P5CR</i>	<i>PDH</i>	<i>CHS1a</i>	<i>APX3</i>	<i>NHX3</i>	
<b>Контроль</b>	<b>100±4</b>	<b>100±5</b>	<b>100±0</b>	<b>100±5</b>	<b>100±4</b>	<b>100±6</b>	
<b>75 мМ</b>	0 нМ	78±4**	140±5**	153±13**	45±2**	80±2**	70±6**
	ЭБЛ	73±5**	159±9**	226±25**#	18±2***	86±5**	97±6
	ЭПК	73±4**	164±9***#	568±25***#	13±2***	114±3***	39±0***

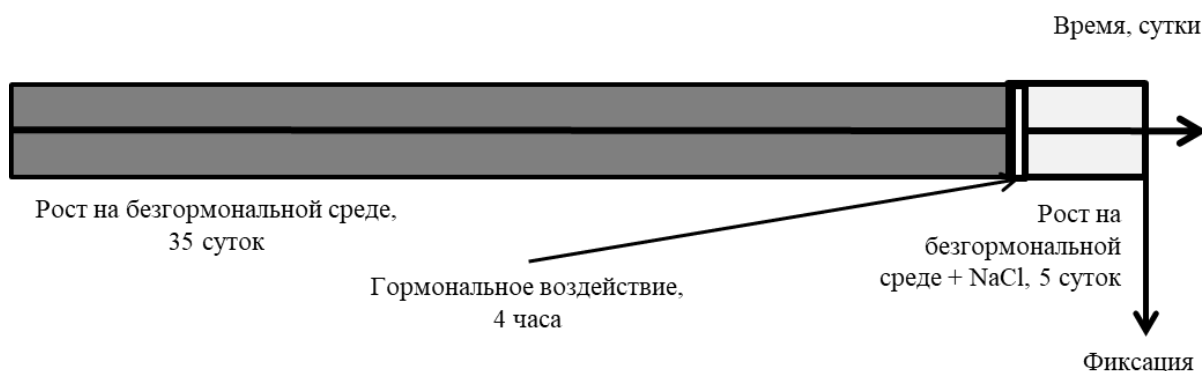
Примечание: \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  при сравнении с контрольными растениями и #  $p \leq 0.05$ , ##  $p \leq 0.01$  при сравнении с контроль + соль

Нами продемонстрировано влияние кратковременного обработки БС (0.1 нМ, продолжительность воздействия 4 часа) на физиологические показатели растений картофеля при последующем засолении 75 мМ или 150 мМ NaCl (Рисунок 50). Так, ранее было отмечено, что ЭБЛ аккумулирует воду в тканях листьев растений при последующем стрессе, что, предположительно достигается дополнительным накоплением органических осмопротекторов (Рисунок 48А). Также в листьях растений, обработанных ЭБЛ, содержание основных пигментов первой и второй фотосистемы дольше не изменялось в ответ на засоление (Таблица 33) относительно контроля. Однако через пять суток действия хлорида натрия содержание всех исследуемых пигментов было ниже, чем в контроле на 13-24%.

Через пять суток действия низкой концентрации (75 мМ) NaCl, ЭБЛ усиливала регулируемое рассеивание световой энергии в виде тепла, что отображено в показателях qN, NPQ, Y (NPQ) (Таблица 33). При этом, достоверный протекторный эффект относительно максимального квантового выхода (Fv/Fm) и скорости транспорта электронов (ETR) отмечен только для варианта «ЭПК + 150 мМ NaCl».

Кетонсодержащий БС в меньшей степени способствовал аккумуляции осмопротектора пролин в листьях растений картофеля (Рисунок 49А), однако вызывал дополнительное накопление ионов натрия в тканях листа (Таблица 34). Также ЭПК менее, чем ЭБЛ способствовал сохранению фотосинтетических пигментов (Таблица 31) при последующем хлоридном засолении.





24-эпибрасинолид (ЭБЛ)	24-эпикастастерон (ЭПК)
<p><b>Сохраняет</b> рост побега, оводненность тканей листа, содержание ионов кальция в корнях.</p> <p>Только при 75 мМ: <b>сохраняет</b> формирование узлов (в том числе столонов и листьев), <b>сухую биомассу</b>, <b>оводненность тканей стебля и корня</b>, <b>содержание хлорофилла <i>a</i> и каротиноидов</b>, ионов кальция в листьях и калия, магния в корнях; <b>снижает</b> степень ПОЛ, <b>активность ферментов СОД и ГПО</b>, <b>содержание ионов магния в листьях и экспрессию гена <i>CHS1a</i></b>; <b>увеличивает</b> значения коэффициентов нефотохимической диссипации энергии.</p> <p>Только при 150 мМ: <b>снижает</b> накопление пролина; <b>повышает</b> степень ПОЛ, накопление ионов <b>натрия и кальция в корнях</b>, <b>активность СОД и ГПО</b>; <b>восстанавливает</b> значения NPQ, <b>содержание ионов магния в листе</b>.</p>	<p><b>Понижает</b> содержание пролина.</p> <p>Только при 75 мМ: <b>сохраняет сухую биомассу</b>, <b>оводненность тканей корня</b>, <b>содержание хлорофилла <i>a</i> и каротиноидов</b>; <b>снижает</b> показатель <math>\Psi(NPQ)</math>, <b>активность ферментов СОД и ГПО и экспрессию генов <i>CHS1a</i>, <i>NHX3</i></b>, <b>содержание ионов магния в листьях</b>; <b>увеличивает</b> накопление ионов калия, кальция и магния в корнях и транскрипцию гена <i>APX3</i> в листьях.</p> <p>Только при 150 мМ: <b>сохраняет</b> формирование узлов, скорость транспорта электронов во второй фотосистеме и <b>содержание магния в листьях</b>; <b>повышает</b> степень ПОЛ, <b>активность СОД</b> и коэффициенты ФС II <math>qN</math> и <math>F_v/F_m</math>, а также накопление <b>ионов натрия в листьях и корнях и ионов кальция только в корнях</b>.</p>

Рисунок 50. Схематическое изображение кратковременного влияния БС при последующем хлоридном засолении.

В ответ на предобработку БС при отложенном действии 150 мМ возрастала активность антиоксидантных ферментов, примечательно, что ЭПК активировал СОД, в то время как ЭБЛ – ГПО (Таблица 36). Предположительно, данные изменения происходили в ответ на повышение степени ПОЛ (Рисунок 49Б). При низкой концентрации хлорида натрия brassinosteroids способствовали поддержанию целостности мембран и значительному снижению активности ферментов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Брассиностероиды являются перспективными фитогормонами для сельского хозяйства, благодаря их способности повышать продуктивность и устойчивость растений к различным типам стрессоров. Ответная реакция растений на гормональное воздействие в оптимальных условиях произрастания и при хлоридном засолении зависит от сортовых характеристик и возраста растений, а также химической структуры, времени экспозиции и способа внесения БС. Понимание механизмов, лежащих в основе действия БС в норме и при стрессе, позволит более эффективно применять данные фитогормоны в сельском хозяйстве, в том числе, и на загрязнённых территориях.

Нами впервые было показано, что суммарное содержание лактон- и кетонсодержащих БС в микроклонах, полученных из боковых почек, практически одинаково. Данное наблюдение позволило проводить дальнейшие исследования на растениях, полученных из боковой почки, используя при этом экзогенные гормоны в эквимолярных концентрациях. Далее мы провели масштабное сравнение лактон- и кетонсодержащих БС при длительном (добавление гормонов в питательную среду для выращивания микроклонов растений в культуре *in vitro* на 21 сутки) и кратковременном (стадия гидропонного выращивания в условиях *in vivo* не более 5 суток) корневом воздействии на растения картофеля сорта Луговской.

Во многих исследованиях сообщалось, что брассиностероиды являются регуляторами роста растений, стимулируя удлинение побега, хотя наряду с этим, известны данные о том, что БС подавляют рост корня. Подобные эффекты были показаны нами при кратковременном влиянии лактон- и кетонсодержащих БС. Однако при длительном действии ЭБЛ, отсутствовал ростостимулирующий эффект на побег, при этом, гормон в концентрации 10 нМ ингибировал рост корня, а в концентрации 1000 нМ, напротив, ускорял рост корневой системы. Регуляторное действие БС при последующем хлоридном засолении определялось химической структурой гормона, его концентрацией и продолжительностью воздействия. Это проявлялось в виде поддержания роста побега при длительной (10 нМ ЭБЛ) и

кратковременной (0.1 нМ ЭБЛ) обработках. Примечательно, что ЭПК не оказывал защитного действия на рост побега при солевом стрессе вне зависимости от способа предобработки растений. Следует отметить, что с увеличением интенсивности засоления протекторный эффект гормонов усиливался.

Стероидные гормоны почти не влияли на накопление сырой биомассы растений при их длительном воздействии. Однако при кратковременном воздействии БС (1, 4 и 12 часов) было установлено, что ЭПК, по сравнению с ЭБЛ, оказывал больший стимулирующий эффект на накопление сырой биомассы, который достигался за счет аккумуляции сухой массы. Также нами показано, что при длительной обработке растений ЭПК с последующим хлоридным засолением (75 мМ) наблюдалось поддержание значений сырой массы, тогда как применение ЭБЛ, напротив, снижало ее уровень.

Указанный эффект гормонов мог быть объяснен способностью БС регулировать водный баланс в растениях, который в большей степени был характерен для лактон-БС вне зависимости от продолжительности его воздействия в оптимальных условиях и при отсроченном солевом стрессе.

Влияние БС на накопление пролина при последующем действии стрессора определялось, прежде всего, химической структурой гормона и условиями гормональной обработки. Так, при длительной (1000 нМ) и кратковременной (0.1 нМ) обработке растений БС с последующим хлоридным засолением (150 мМ NaCl) ЭБЛ стимулировал накопление пролина, тогда как ЭПК, напротив, тормозил этот процесс. При менее интенсивном солевом стрессе БС, как правило, не оказывали влияния на содержание пролина, либо снижали его уровень (1000 нМ БС и 0.1 нМ ЭПК).

Ожидаемое накопление основных фотосинтетических пигментов в листьях растений, обработанных БС, было отмечено только в отношении ЭПК. Последний стимулировал накопление каротиноидов при длительном (10 нМ) и хлорофилла *a* – при кратковременном (0.1 нМ) воздействии. При этом ЭБЛ уменьшал суммарное содержание пигментов вне зависимости от продолжительности воздействия.

Хлоридное засоление снижало содержание всех анализируемых групп пигментов. ЭПК при длительной обработке (10 нМ) сохранял протекторный эффект лишь через 1 сутки воздействия, но с увеличением продолжительности солевого стресса более выраженное защитное действие проявлялось у ЭБЛ, которое усиливалось с повышением концентрации фитогормона. Аналогичная, но менее выраженная ответная реакция растений на БС была характерна и для кратковременного воздействия гормонов.

В ответ на длительное воздействие БС возрастал максимальный квантовый выход ( $F_v/F_m$ ) – один из ключевых параметров эффективности функционирования второй фотосистемы. При этом, 10 нМ ЭБЛ и 1000 нМ ЭПК увеличивали нефотохимическое тушение флуоресценции в отсутствие стрессора. Регуляторное действие БС при последующем хлоридном засолении определялось для всех исследуемых вариантов, через 5 суток солевого воздействия. Установлено, что значение максимального квантового выхода поддерживалось на уровне контроля при длительной (исключение составил 10 нМ ЭПК при 75 мМ NaCl) и кратковременной (исключение – ЭБЛ при 150 мМ) обработках, возможно, через регулирование не-/фотохимических процессов и снижение энергии диссипации. Длительная обработка растений 10 нМ ЭПК значительно повышала рассеивание световой энергии в виде тепла (NPQ) при 75 мМ NaCl, что способствовало понижению эффективности фотосинтеза; в то время как кратковременная обработка ЭБЛ в концентрации 0.1 нМ при последующем действии 150 мМ NaCl не оказывала достоверного влияния на данные показатели по сравнению с общим и солевым контролем.

Активные формы кислорода формируются в процессе роста и развития растений в оптимальных условиях и в низких концентрациях выполняют сигнальную функцию, Клеточный уровень АФК в нормальных условиях регулируется активностью антиоксидантных ферментов. Нами показано увеличение интенсивности перекисного окисления липидов при длительной

обработке растений БС в концентрации 1000 нМ. Это что может свидетельствовать о том, что в высокой концентрации БС стимулируют генерацию АФК.

Известно, что ЭБЛ снижает интенсивность ПОЛ при хлоридном засолении. Нами показано, что характер длительного воздействия БС на ПОЛ определяется химической структурой гормона. Так, ЭБЛ снижал уровень ПОЛ, в то время как, ЭПК, наоборот, стимулировал генерацию ТБК-АП. При кратковременном воздействии БС отмечена сходная направленность действия ЭБЛ и ЭПК. Оба фитогормона понижали степень ПОЛ при 75 мМ NaCl в течение 3-х суток солевого стресса, хотя ЭБЛ – в течение 5 суток. Генерация ТБК-АП при 150 мМ NaCl значительно возрастала в ответ на обработку растений фитогормонами; так, через одни сутки воздействия 150 мМ NaCl предобработка ЭБЛ усиливала ПОЛ на 63%, а обработка растений ЭПК на 88% увеличивала интенсивность ПОЛ относительно растений, подвергнутых только солевому стрессу. Через трое суток действия 150 мМ NaCl степень ПОЛ в листьях растений, кратковременно обработанных ЭПК, снизилась до значений солевого контроля, что могло быть следствием снижения концентрации ионов натрия цитоплазме за счет их компартментации в вакуоль и/или повышением активности антиоксидантных ферментов.

Повышение антиоксидантного статуса – это следующий протекторный механизм, который мы исследовали для лактон- и кетонсодержащих БС. Кратковременная предобработка растений гормонами активировала в большей степени СОД, чем ГПО; при этом наибольшим стимулирующим эффектом на активность ферментов обладал ЭБЛ. В условиях отсроченного действия 75 мМ NaCl, спустя сутки, активность ферментов была выше у растений, обработанных ЭПК; тем не менее, активность лишь гваяколзависимой пероксидазы превышала значение солевого контроля. Через 5 суток действия 75 мМ NaCl активность всех исследованных антиоксидантных ферментов снижалась, вне зависимости от химической структуры БС. Однако с повышением концентрации NaCl до 150 мМ ЭПК, в большей степени, активировал СОД, а ЭБЛ – ГПО. Длительное воздействие БС, с последующим солевым стрессом в течение 1 суток, напротив,

продемонстрировало повышение активности обоих ферментов в листьях растений, обработанных ЭБЛ. В условиях более длительного солевого стресса (через 5 суток) активность всех ферментов снизилась, причем, в большей степени для ЭПК.

При длительном воздействии ЭБЛ и при последующем хлоридном засолении поддерживался высокий уровень экспрессии гена *CHS1a*, что может свидетельствовать о положительном влиянии гормона на биосинтез вторичных метаболитов. В то время как ЭПК стимулировал накопление транскриптов гена *ННХЗ*, что, предположительно, могло способствовать снижению содержания ионов натрия в цитоплазме клеток листа. Кратковременное воздействие гормона, напротив, снижало уровень транскриптов *ННХЗ* гена в ответ на действие ЭПК и значительно повышало транскрипты другого гена *АРХЗ*, что вполне согласуется с данными об антиоксидантном статусе растений.

Нельзя исключать, что способность ЭПК регулировать экспрессию гена *ННХЗ* имела отношение к контролю над содержанием  $\text{Na}^+$  в тканях листьев и корней. В пользу данной точки зрения свидетельствует тот факт, что при длительном воздействии ЭПК наблюдалось снижение содержания ионов натрия в тканях листа (10 нМ ЭПК) и корня (1000 нМ ЭПК). При отложенном действии хлорида натрия данный показатель также снижался в корнях (75 мМ NaCl) или листьях (150 мМ NaCl). Кратковременное воздействие ЭПК в нормальных условиях не оказывало эффекта на накопление ионов натрия, однако при отложенном действии соли, напротив, содержание ионов натрия в цитоплазме клеток повышалось.

Таким образом, совокупность полученных экспериментальных данных свидетельствует о том, что действие БС с разной химической структурой на растения картофеля в нормальных условиях и при солевом стрессе носит очень сложный характер и определяется их химической структурой, действующей концентрацией, продолжительностью обработки и интенсивностью солевого стресса. ЭБЛ и ЭПК вовлекались в регуляцию ответа растений картофеля на солевой стресс на уровнях ростовых процессов, водного и осмотического обменов,

перекисного окисления липидов и клеточной антиоксидантной системы, проявляя при этом как общие, так и специфические черты.

## ВЫВОДЫ

1. Физиологические эффекты brassinosterоидов (БС) зависят от их химической структуры, концентрации и продолжительности воздействия. 24-эпибрассинолид (ЭБЛ) и 24-эпикастастерон (ЭПК) регулируют рост, водный статус и ионный гомеостаз растений картофеля в оптимальных условиях. Растения, подвергнутые длительному воздействию ЭБЛ (10 нМ) и ЭПК (1000 нМ), повышали фотохимическую эффективность ФС II, но обнаруживали торможение роста. Оба фитогормона стимулировали ПОЛ и аккумуляцию  $Ca^{2+}$ . ЭБЛ (10 нМ) понижал осмотический потенциал клеток листа за счет повышения содержания  $Na^+$  и пролина, тогда как ЭПК, напротив, снижал содержание  $Na^+$  и  $K^+$  в листе и, тем самым, повышал осмотический потенциал.

2. Кратковременное воздействие ЭБЛ и ЭПК ускоряло рост побегов, но подавляло рост корня. ЭПК стимулировал накопление сухой биомассы, тогда как ЭБЛ увеличивал оводненность тканей. ЭПК повышал уровни хлорофилла *a* и каротиноидов. Оба сравниваемых БС стимулируют активность антиоксидантных ферментов.

3. Растения отвечали на засоление (75-200 мМ NaCl) торможением роста, дефолиацией, повышением интенсивности ПОЛ, падением осмотического потенциала клеток листа и накоплением пролина. Сильный солевой стресс понижал уровень пигментов и увеличивал активность пероксидазы (1 сутки), ингибировал фотохимическую эффективность ФС II (5 суток), подавлял экспрессию генов антиоксидантных ферментов (в 2 раза) и гена *CHS1a*, одновременно увеличивая уровни транскриптов генов-транспортёров ионов *SOS1*, *NHX2* (на 50-60%), и в 2 и 9, 10 раз – *NHX3*.

4. Длительное воздействие ЭБЛ (10 нМ) в большей степени, чем ЭПК, защищало рост побегов при солевом стрессе. ЭБЛ понижал интенсивность ПОЛ, стимулировал активность антиоксидантных ферментов и активировал накопление пролина. ЭПК (10 нМ) сохранял оводненность тканей, поддерживал уровни фотосинтетических пигментов, активность ФС II (75 мМ NaCl) и экспрессию гена *CHS1a*.



5. Кратковременная обработка растений ЭБЛ при последующем солевом стрессе в большей степени, чем ЭПК, поддерживала рост (листьев) и оводненность тканей, которая могла быть следствием аккумуляции пролина. Как и при длительной обработке, ЭБЛ, в большей степени, чем ЭПК, задерживал деградацию основных фотосинтетических пигментов. ЭПК, в свою очередь, обладал более выраженным защитным эффектом фотохимической эффективности ФС II, но стимулировал аккумуляцию  $\text{Na}^+$  в листьях. Кроме того, ЭПК при интенсивном солевом стрессе сильнее активировал СОД, в то время как ЭБЛ – пероксидазу.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Абрамченко В.В., Елизарова Г.Ю., Колтонюк К.А., Мирошниченко С.Г., Смирнов М.С., Артюхова О.В., Берестянский А.П., Дмитриев Ю.Е., Каралев М.Л., Лещенко Н.С., Надеждин Е.В., Широкоград А.И.** (2016) Государственный (национальный) доклад о состоянии и использовании земель в Российской Федерации в 2015 году. М.: Росреестр, С. 206.
2. **Аутко А.А., Хрипач В.А., Литвиновская Р.П.** (2008) Биогербицидная композиция и способ ее применения: А № 200601716 (Евразийский патент). Б.И., № 01, с. 11.
3. **Бондаренко В. Ю., Соколик А. И., Ветошкин А. А., Жабинский В. Н., Хрипач В. А., Демидчик В. В.** (2017). Анализ воздействия брассиностероидов на рост корней пшеницы с использованием феномных подходов. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология*, **1**, 31-37.
4. **Домрачева Л.И., Скугорева С.Г., Ковина А.Л., Коротких А.И., Стариков П.А., Ашихмина Т.Я.** (2022) Специфика растительно-микробных комплексов при антропогенном загрязнении почвы (обзор). *Теоретическая и прикладная экология*, **3**, 14-25.
5. **Ефимова М.В.** (2011) Физиологическая роль брассинолида в световом развитии проростков *Arabidopsis thaliana*. *Вестник Российского университета дружбы народов*, **2**, 39-46.
6. **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.** (2018) Индуцированный брассиностероидами прайминг растений картофеля снижает окислительный стресс и повышает солеустойчивость. *Доклады Академии наук*, **478**, 723-726.
7. **Иванов А.Л., Ушачев И.Г., Лачуга Ю.Ф., Завалин А.А., Захаренко В.А., Клюкач В.А., Попов В.Д.** (2008) Проблемы деградации и восстановления продуктивности земель сельскохозяйственного назначения в России. М.: ФГНУ "Росинформагротех", 68 с.

8. **Недбаев И.С., Елсукова Е.Ю.** (2021) Изучение мирового и российского опыта по разработке оптимальных путей рекультивации нарушенных земель. *Вестник евразийской науки*, **13**, 27NZVN621.
9. **Никерова К.М., Галибина Н.А., Чирва О.В.** (2021) Активные формы кислорода и компоненты антиоксидантной системы-участники метаболизма растений. Взаимосвязь с фенольным и углеводным обменом. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук*, **3**, 5-20.
10. **Омельченко А.В., Кабузенко С.Н., Белоусов А.А., Сериков В.А.** (2009) Локализация натрия в компартментах тканей корней и надземной части гибридов кукурузы нового поколения в связи с их солеустойчивостью. *Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия*, **22**, 112-121.
11. **Слонов Л.Х.** (1997) Адаптация экологических групп растений к разным условиям среды обитания. Нальчик: Эльбрус, 125 с.
12. **Сушкова Д. В., Мурган О. К., Ефимова М. В.** (2022) Влияние 24-эпибрасинолида на динамику роста микроклонов растений картофеля сорта Луговской в культуре *in vitro*. В сб. *Физиология, биотехнология и биоинформатика растений и микроорганизмов - путь в будущее: к 85-летию Р.А. Карначук: Материалы Всероссийской научной конференции*, под ред. О.В. Карначук. ООО "Дельтаплан": Томск, с. 99-101.
13. **Хрипач В.А., Литвиновская Р.П., Жабинский В.Н., Завадская М.И., Шуканов В.П., Манжелесова Н.Е., Полякова Н.В., Халецкий В.Н.** (2015) Фунгицидная композиция и способы ее применения: А № 201201347 (Евразийский патент). Б.И., № 03, с. 13.
14. **Чжоу К., Юй Б.Д.** (2009) Накопление неорганических и органических осмолитов и их роль в осмотической регуляции у проростков *Vetiveria zizanioides* при действии NaCl. *Физиология растений*, **56**, 751-758.

15. **Шевякова Н.И., Стеценко Л.А., Мещеряков А.Б., Кузнецов Вл.В.** (2002) Изменение активности пероксидазной системы в процессе стресс-индуцированного формирования САМ. *Физиология растения*, **49**, 670-677.
16. **Ali B.** (2019) Brassinosteroids: the promising plant growth regulators in horticulture. In: *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*, Hayat, S., Yusuf, M., Bhardwaj, R., Bajguz, A. (eds.) Singapore: Springer, 349-365.
17. **Azzam C.R., Zaki S.N.S., Bamagoos A.A., Rady M.M., Alharby H.F.** (2022) Soaking maize seeds in zeatin-type cytokinin biostimulators improves salt tolerance by enhancing the antioxidant system and photosynthetic efficiency. *Plants*, **11**, 1004.
18. **Bajguz A., Czerpak R.** (1998) Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (*Chlorophyceae*). *Journal of Plant Growth Regulation*, **17**, 131-139.
19. **Bartels D., Dinakar C.** (2013) Balancing salinity stress responses in halophytes and non-halophytes: a comparison between *Thellungiella* and *Arabidopsis thaliana*. *Functional Plant Biology*, **40**, 819-831.
20. **Bates L.S., Waldran R.P., Teare I.D.** (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, **39**, 205-208.
21. **Beauchamp Ch., Fridovich I.** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**, 276-287.
22. **Behnamnia M., Kalantari K.M., Rezanejad F.** (2009) Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L. *General Applied Plant Physiology*, **35**, 22-34.
23. **Blaylock A.D.** (1994) Soil salinity, salt tolerance and growth potential of horticultural and landscape plants. Laramie, WY: University of Wyoming.
24. **Brouwer C., Goffeau A., Heibloem M.** (1985) Irrigation water management: training manual no. 1-Introduction to irrigation. Rome, Italy: FAO Land and Water Development Division, 80 p.

25. **Buege J.A., Aust S.D.** (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, **52**, 302-310.
26. **Cushman J.C.** (2001) Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *American Zoologist*, **41**, 758-769.
27. **Derkaoui K.M., Sahnoune M., Belkohodja M.** (2022) The effect of salinity on accumulation proline, glycine betaine and mineral elements in four varieties of tomatoes. *Ukrainian Journal of Ecology*, *12*(2), 58-63.
28. **Dewi W.S., Amalina D.D., Romadhon M.R.** (2023) Microbial biofilm for soil health, plant growth, and productivity under multi stress. A review. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **1162**, 012008.
29. **Efimova M.V., Savchuk A.L., Hasan J.A.K., Litvinovskaya R.P., Khripach V.A., Kholodova V.P., Kuznetsov V.V.** (2014) Physiological mechanisms of enhancing salt tolerance of oilseed rape plants with brassinosteroids. *Russian journal of plant physiology*, **61**, 733-743.
30. **Efimova M.V., Khripach V.A., Boyko E.V., Malofii M.K., Kolomeichuk L.V., Murgan O. K., Vidershpan A.N., Mukhamatdinova E.A., Kuznetsov V.V.** (2018a) The priming of potato plants induced by brassinosteroids reduces oxidative stress and increases salt tolerance. *Doklady Biological Sciences*, **478**, 33-36.
31. **Efimova M.V., Kolomeichuk L.V., Boyko E.V., Malofii M.K., Vidershpan A.N., Plyusnin I.N., Golovatskaya I.F., Murgan O.K., Kuznetsov V.V.** (2018b) Physiological mechanisms of *Solanum tuberosum* L. plants' tolerance to chloride salinity. *Russian Journal of Plant Physiology*, **65**, 394-403.
32. **Efimova M.V., Danilova E.D., Zlobin I.E., Kolomeichuk L.V., Murgan O.K., Boyko E.V., Kuznetsov V.V.** (2023) Priming potato plants with melatonin protects stolon formation under delayed salt stress by maintaining the photochemical function of photosystem II, ionic homeostasis and activating the antioxidant system. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, 6134.

33. **Esen A.** (1978) A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein/ *Analytical Biochemistry*, **89**, 264-273.
34. **FAO.** (2005) Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. Rome, Italy: FAO Land and Plant Nutrition Management Service.
35. **FAO.** (2021) Global map of salt affected soils Version 1.0 Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 20 p.
36. **Gao H.-J., Yang H.-Y., Bai J.-P., Liang X.-Y., Lou Y., Zhang J.-L., Wang D., Zhang J.-L., Niu S.-Q., Chen Y.-L.** (2015) Ultrastructural and physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets to gradient saline stress. *Frontiers in Plant Science*, **5**, 1-14.
37. **Grieve C.M., Grattan S.R., Maas E.V.** (2012) Plant salt tolerance. *ASCE manual and reports on engineering practice*, **71**, 405-459.
38. **Gupta P., Seth C.S.** (2022) 24-epibrassinolide regulates functional components of nitric oxide signalling and antioxidant defense pathways to alleviate salinity stress in *Brassica juncea* L. cv. Varuna. *Journal Plant Growth Regulation*, 1-16.
39. **Hafeez M.B., Zahra N., Zahra K., Raza A., Khan A., Shaukat K., Khan S.** (2021) Brassinosteroids: molecular and physiological responses in plant growth and abiotic stresses. *Plant Stress*, **2**, 100029.
40. **Harb A., Ali S., Abu Alhaija A.A.** (2017) Possible mechanisms of increasing salt tolerance in lentil plants after pre-exposure to low salt concentration. *Russian Journal of Plant Physiology*, **64**, 478-485.
41. **Haswell E.S., Verslues P.E.** (2015) The ongoing search for the molecular basis of plant osmosensing. *Journal of General Physiology*, **145**, 389-394.
42. **Himabindu Y., Chakradhar T., Reddy M.C., Kanygin A., Redding K.E., Chandrasekhar T.** (2016) Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. *Environmental and Experimental Botany*, **124**, 39-63.

43. **Horie T., Motoda J., Kubo M., Yang H., Yoda K., Horie R., Chan W.-Y., Leung H.-Y., Hattori K., Kanomi M., Osumi M., Yamagami M., Schroeder J.I Uozumi N.** (2005) Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na<sup>+</sup> unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *The Plant Journal*, **44**, 928-938.
44. **Hussain S., Zhang R., Liu S., Li R., Zhou Y., Chen Y., Hou H., Dai Q.** (2022) Transcriptome-wide analysis revealed the potential of the high-affinity potassium transporter (HKT) gene family in rice salinity tolerance via ion homeostasis. *Bioengineering*, **9**, 410.
45. **Hussain S., Nanda S., Ashraf M., Siddiqui A.R., Masood S., Khaskheli M.A., Zhang J.** (2023) Interplay impact of exogenous application of abscisic acid (ABA) and brassinosteroids (BRs) in rice growth, physiology, and resistance under sodium chloride stress. *Life*, **13**, 498.
46. **Jaarsma R., de Vries R. S. M., de Boer A. H.** (2013) Effect of salt stress on growth, Na<sup>+</sup> accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *PLoS One*, **8**, e60183.
47. **Jan S., Alyemeni M.N., Wijaya L., Alam P., Siddique K.H., Ahmad P.** (2018) Interactive effect of 24-epibrassinolide and silicon alleviates cadmium stress via the modulation of antioxidant defense and glyoxalase systems and macronutrient content in *Pisum sativum* L. seedlings. *BMC plant biology*, **18**, 1-18.
48. **Janeczko A., Swaczynová J.** (2010) Endogenous brassinosteroids in wheat treated with 24-epibrassinolide. *Biologia plantarum*, **54**, 477-482.
49. **Katarzyna N., Žiga M., Arjen de V., Pier V.** (2022) Saline soils worldwide: Identifying the most promising areas for saline agriculture. *Journal of Arid Environments*, **203**, 104775.
50. **Katerji N., van Hoorn J., Hamdy A., Mastrorilli M.** (2000) Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. *Agricultural Water Management*, **43**, 99-109.

51. **Khalid A., Aftab F.** (2016) Effect of exogenous application of 24-epibrassinolide on growth, protein contents, and antioxidant enzyme activities of *in vitro*-grown *Solanum tuberosum* L. under salt stress. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, **52**, 81-91.
52. **Khalid A., Aftab F.** (2020) Effect of exogenous application of IAA and GA<sub>3</sub> on growth, protein content, and antioxidant enzymes of *Solanum tuberosum* L. grown *in vitro* under salt stress. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, **56**, 377-389.
53. **Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Litvinovskaya R.P.** (2011) Immunoassays of brassinosteroids. In: *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone*, Hayat S., Ahmad A. (eds.) Dordrecht: Springer. pp. 375-392.
54. **Kolomeichuk L.V., Efimova M.V., Zlobin I.E., Kreslavski V.D., Murgan O.K., Kovtun I.S., Khripach V.A., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev, S.I.** (2020) 24-Epibrassinolide alleviates the toxic effects of NaCl on photosynthetic processes in potato plants. *Photosynthesis research*, **146**, 151-163.
55. **Kolomeichuk L.V., Danilova E.D., Khripach V.A., Zhabinskyi V.N., Kuznetsov V.V., Efimova M.V.** (2021) Ability of lactone- and ketone-containing brassinosteroids to induce priming in rapeseed plants to salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, **68**, 499-509.
56. **Kovtun I.S., Kukhareno N.E., Kuznetsov V.V., Khripach V.A., Efimova M.V.** (2021) Effect of lactone- and ketone-containing brassinosteroids on photosynthetic activity of barley leaves during aging. *Russian Journal of Plant Physiology*, **68**, 440-450.
57. **Kumar P., Sharma P.K.** (2020) Soil salinity and food security in India. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, **4**.
58. **Kumar S., Korra T., Thakur R., Arutselvan R., Kashyap A.S., Nehela Y., Keswani C.** (2023) Role of plant secondary metabolites in defense and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress*, **8**, 100154.



59. **Lichtenthaler H.K.** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, **148**, 350-382.
60. **Litvinovskaya R.P., Shkliarevskiy M.A., Kolupaev Y.E., Kokorev A.I., Khripach V.A., Dmitriev A.P.** (2022) Effect of 24-epicastosterone and its monosalicylate on salt resistance of *Arabidopsis thaliana* wild type and the salicylate-deficient *NahG* transformants. *Russian Journal of Plant Physiology*, **69**, 35.
61. **Ma L., Zhang H., Sun L., Jiao Y., Zhang G., Miao C., Hao F.** (2012) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 305-317.
62. **Maas E.V., Hoffman G.J.** (1977) Crop salt tolerance – current assessment. *Journal of the irrigation and drainage division*, **103**, 115-134.
63. **Mahati K., Padmasree K.** (2023) Brassinolide promotes interaction between chloroplasts and mitochondria during the optimization of photosynthesis by the mitochondrial electron transport chain in mesophyll cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, **14**, 1099474
64. **Manickavelu A., Kambara K., Mishina K., Koba T.** (2007) An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **54**, 254-258.
65. **Mishra A., Tanna B.** (2017) Halophytes: potential resources for salt stress tolerance genes and promoters. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 829.
66. **Munns R., Tester M.** (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, **59**, 651-681.
67. **Murashige T., Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, **15**, 473-497.
68. **Murgan O.K., Kazakova A.D., Efimova M.V.** (2020) Comparison of methods for RNA extraction from potato plants for real-time PCR. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*, **51**, 86-104.

69. **Nicot N., Hausman J-F., Hoffmann L., Evers D.** (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 2907-2914.
70. **Pankova E.I., Gerasimova M.I., Korolyuk T.V.** (2018) Salt-affected soils in russian, american, and international soil classification systems. *Eurasian Soil Science*, **51**, 1297-1308.
71. **Parrey Z.A., Islam S., Shah S.H., Mohammad F.** (2023a) Agronomical strategies to improve growth, physio-biochemistry, yield and quality attributes of mint plants under the varied environmental conditions: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **23**, 1489-1514.
72. **Parrey Z.A., Shah S.H., Mohammad F., Siddiqui M.H., Alamri S., Kalaji H.M.** (2023b) Exogenous epibrassinolide application improves essential oil biosynthesis and trichome development in peppermint via modulating growth and physicochemical processes (A preprint).
73. **Pradko A.G., Litvinovskaya R.P., Sauchuk A.L., Drach S.V., Baranovsky A.V., Zhabinskii V.N., Mirantsova T.V., Khripach V.A.** (2015) A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants. *Steroids*, **97**, 78-86.
74. **Raihan M.R.H., Nahar K., Nowroz F., Siddika A., Hasanuzzaman M.** (2023) Oilseed *Brassica* responses and tolerance to salt stress. In: *Oilseed crops – biology*, Hasanuzzaman M., Nahar K. (eds.) UK, London: IntechOpen, pp. 109149
75. **Raza A., Salehi H., Rahman M.A., Zahid Z., Madadkar H.M., Najafi-Kakavand S., Charagh S., Osman H.S., Albaqami M., Zhuang Y., Siddique K.H.M., Zhuang W.** (2022) Plant hormones and neurotransmitter interactions mediate antioxidant defenses under induced oxidative stress in plants. *Frontiers in Plant Science*, **13**, 961872.
76. **Sachdev S., Ansari S.A., Ansari M.I.** (2023) Role of osmolytes in alleviation of oxidative stress. *Reactive Oxygen Species in Plants: The Right Balance*, 173-202.

77. **Saibi W., Brini F.** (2021) Ion transporters and their molecular regulation mechanism in plants. *Journal Plant Science and Phytopathology*, **5**, 28-43.
78. **Shabala S., Pottosin I.** (2014) Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia plantarum*, **151**(3), 257-279.
79. **Shahbaz M., Ashraf M.** (2016) Influence of exogenous application of brassinosteroid on growth and mineral nutrients of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. *Pakistan Journal of Botany*, **39**, 513-522.
80. **Shahid M.A., Sarkhosh A., Khan N., Balal R.M., Ali S., Rossi L., Garcia-Sanchez F.** (2020) Insights into the physiological and biochemical impacts of salt stress on plant growth and development. *Agronomy*, **10**(7), 938.
81. **Sharif I., Aleem S., Farooq J., Rizwan M., Younas A., Sarwar G., Chohan S.M.** (2019) Salinity stress in cotton: effects, mechanism of tolerance and its management strategies. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **25**, 807-820.
82. **Sharma A., Shahzad B., Kumar V., Kohli S.K., Sidhu G.P.S., Bali A.S., Handa N., Kapoor D., Bhardwaj R., Zheng B.** (2019) Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. *Biomolecules*, **9**(7), 285.
83. **Siddiqui H., Ahmed K.B.M., Hayat S.** (2018a) Comparative effect of 28-homobrassinolide and 24-epibrassinolide on the performance of different components influencing the photosynthetic machinery in *Brassica juncea* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, **129**, 198-212.
84. **Siddiqui H., Hayat S., Bajguz A.** (2018b) Regulation of photosynthesis by brassinosteroids in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, **40**, 1-15.
85. **Siddiqui H., Sami F., Faizan M., Faraz A., Hayat S.** (2019) Brassinosteroid mediated regulation of photosynthesis in plants. In: *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*, Hayat, S., Yusuf, M., Bhardwaj, R., Bajguz, A. (eds.) Singapore: Springer, pp. 185-217.
86. **Sirhindi G., Kumar S., Bhardwaj R., Kumar M.** (2009) Effects of 24-epibrassinolide and 28-homobrassinolide on the growth and antioxidant enzyme

activities in the seedlings of *Brassica juncea* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, **15**, 335-341.

87. **Sousa V.Q., Messias W.F.S., Pereira Y.C., da Silva B. R. S., Lobato E. M. S. G., Alyemeni M.N., Ahmad P., Lobato A.K. da S.** (2022) Pretreatment with 24-epibrassinolide synergistically protects root structures and chloroplastic pigments and upregulates antioxidant enzymes and biomass in Na<sup>+</sup>-stressed tomato plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, **41**, 2869-2885.

88. **Stavi I., Thevs N., Priori S.** (2021) Soil salinity and sodicity in drylands: a review of causes, effects, monitoring, and restoration measures. *Frontiers in Environmental Science*, **9**, 712831.

89. **Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., Sosan A., Kolbanov D., Sokolik A., Demidchik V.** (2015) Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants. *Steroids*, **97**, 98-106.

90. **Suprasanna P., Nikalje G.C., Rai A.N.** (2016) Osmolyte accumulation and implications in plant abiotic stress tolerance. In: *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies*, Iqbal N., Nazar R., A. Khan N. (eds.) New Delhi: Springer, pp. 1-12.

91. **Swain R., Sahoo S., Behera M., Rout G. R.** (2023) Instigating prevalent abiotic stress resilience in crop by exogenous application of phytohormones and nutrient. *Frontiers in Plant Science*, **14**, 1104874.

92. **Szabados L, Savouré A.** (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, **15**(2), 89-97.

93. **Tanji K K., Kielen N.C.** (2002) Agricultural drainage water management in arid and semi-arid areas. In *FAO Irrigation and Drainage Paper*, Tanji, K. K., Kielen, N. C. (eds.) Rome, Italy: FAO., pp. 1-109.

94. **Toscano S., Romano D., Ferrante A.** (2023) Molecular responses of vegetable, ornamental crops, and model plants to salinity stress. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**(4), 3190.

95. **Vargas, R., Pankova, E. I., Balyuk, S. A., Krasilnikov, P. V., Khasankhanova, G. M.** (2018) Handbook for saline soil management. Food and Agriculture Organization of the United Nations and Lomonosov Moscow State University: Rome, 11 p.
96. **Yang Y., Guo Y.** (2008) Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist*, **217**(2), 523-539.
97. **Yuan L., Shu S., Sun J., Guo S., Tezuka T.** (2012) Effects of 24-epibrassinolide on the photosynthetic characteristics, antioxidant system, and chloroplast ultrastructure in *Cucumis sativus* L. under  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  stress. *Photosynthesis Research*, **112**, 205-214.
98. **Zhang Z., Yang X., Cheng L., Guo Z., Wang H., Wu W., Shin K., Zhu J., Zheng X., Bian J., Li Y., Gu L., Zhu Q., Wang Z.-Y., Wang W.** (2020) Physiological and transcriptomic analyses of brassinosteroid function in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) seedlings. *Planta*, **252** (2), 27.
99. **Zlobin I.E., Pashkovskiy P.P., Kartashov A.V., Nosov A.V., Fomenkov A.A., Kuznetsov V.V.** (2020) The relationship between cellular Zn status and regulation of Zn homeostasis genes in plant cells. *Environmental and Experimental Botany*, **176**, 104104.
100. **Zlobin I.E., Danilov E.D., Murgan O.K., Kolomeichuk L.V., Litvinovskaya R.P., Sauchuk A.L., Kuznetsov V.V., Efimova M.V.** (2023) Structurally different exogenic brassinosteroids protect plants under polymetallic pollution via structure-specific changes in metabolism and balance of cell-protective components. *Molecules*, **28**(5), 2077.
101. **Zullo M.A.T., Bajguz A.** (2019) The brassinosteroids family – structural diversity of natural compounds and their precursors. In: *Brassinosteroids: Plant Growth and Development*. Hayat, S., Yusuf, M., Bhardwaj, R., Bajguz, A. (eds.) Singapore: Springer, pp. 1-44.