

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ЛАКТОН- И КЕТОНСОДЕРЖАЩИХ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИСТЬЕВ ЯЧМЕНЯ ПРИ СТАРЕНИИ

© 2021 г. И. С. Ковтун^а, *, Н. Е. Кухаренко^а, В. В. Кузнецов^б, В. А. Хрипач^с, М. В. Ефимова^а

^аНациональный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

^бФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^сИнститут биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

*e-mail: kovtunirina2@gmail.com

Поступила в редакцию 28.08.2020 г.

После доработки 17.09.2020 г.

Принята к публикации 20.09.2020 г.

Проведено сравнение физиологической активности brassinosteroidов (БС) разного химического строения – лактонсодержащего 24-эпибрасинолида (ЭБЛ) и кетонсодержащего brassinosteroidа 24-эпикастастерона (ЭПК), при темновом старении отсеченных листьев ячменя. Оценивали функциональное состояние фотосинтетического аппарата, количество фотосинтетических пигментов, содержание продуктов перекисного окисления липидов, а также экспрессию гена *HvS40* – маркера старения. Отделенные листья ячменя инкубировали на растворах ЭБЛ и ЭПК в диапазоне концентраций 0.01–1 мкМ в чашках Петри на фильтровальной бумаге. В качестве положительного контроля использовали синтетический цитокинин – 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 10 мкМ, в качестве отрицательного – дистиллированную воду. Чашки Петри с листьями выдерживали в течение пяти суток в темноте. Измерения анализируемых показателей проводили на 1, 3 и 5 сутки с начала инкубации, преимущественно в средней части листовой пластины. ЭПК в концентрации 1 мкМ снижал окислительный стресс к пятым суткам инкубации в большей степени, чем ЭБЛ в аналогичной концентрации. В отношении поддержания уровня хлорофилла *a* (Хл *a*) 24-эпикастастерон (1 мкМ) был более эффективен, чем 24-эпибрасинолид. Показано, что экзогенные brassinosteroidы проявляли протекторный эффект на основные фотохимические процессы второй фотосистемы при старении листьев ячменя. Причем при оценке коэффициента нефотохимического тушения (q_N), показателей регулируемого ($Y(NPQ)$) и нерегулируемого ($Y(NO)$) рассеивания тепловой энергии ЭПК демонстрировал более выраженное защитное действие для второй фотосистемы по сравнению с ЭБЛ. Установлено, что обработка brassinosteroidами снижала уровень экспрессии гена *HvS40* – маркера старения на пять суток инкубации, что было особенно характерно для кетонсодержащего brassinosteroidа. Таким образом, можно заключить, что кетонсодержащий brassinosteroid не только проявляет высокую биологическую активность, но и, по ряду параметров, является более эффективным по сравнению с лактонсодержащим brassinosteroidом для уменьшения повреждений, вызванных старением.

Ключевые слова: *Hordeum vulgare*, brassinosteroidы, старение, фотосинтетические пигменты, фотосистема II, 24-эпибрасинолид, 24-эпикастастерон

DOI: 10.31857/S0015330321030088

ВВЕДЕНИЕ

Старение растений представляет собой сложный физиологический процесс, реализация которого значительно влияет на жизнедеятельность растений, приводя к угнетению функционирующего

аппарата, снижению продуктивности растений и их естественной гибели [1]. С одной стороны, благодаря искусственной регуляции процессов старения можно добиться сокращения жизненного цикла растений для ускоренного получения плодов и семян, что представляет значительный интерес в регионах с коротким летним периодом в условиях быстрого сокращения длины светового дня. С другой стороны, управляемое ингибирование процесса ста-

Сокращения: БЛ – брасинолид, БС – brassinosteroidы, ТБК-активные вещества – вещества, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, Хл – хлорофилл, ФлХ – флуоресценция хлорофилла, ЭБЛ – 24-эпибрасинолид, ЭПК – 24-эпикастастерон.

рения позволит дольше поддерживать активное физиологическое состояние растения, что представляет особый интерес при транспортировке и хранении срезанных цветов, фруктов и овощей. Исследование влияния различных факторов на замедление или ускорение старения растений имеет большое практическое значение [2].

Старение является четко контролируемым процессом, который регулируется и реализуется в определенном порядке. В ходе старения наблюдаются значительные морфологические, физиологические, молекулярные и цитологические преобразования, что выражается в изменении экспрессии определенных генов, колебании уровня и соотношения фитогормонов, а также в запуске процессов разрушения клетки. В листьях одним из начальных признаков старения является деградация хлоропластов, что, в свою очередь, приводит к угнетению фотосинтеза. Кроме того, существуют сведения, что старение может запускаться хлоропластами, а механизмы его развития могут зависеть как от факторов окружающей среды, так и от вида растения [3].

Значительную роль в регуляции старения играют фитогормоны. Известно, что этилен, жасмоновая и абсцизовая кислоты могут способствовать старению, тогда как цитокинины, напротив, замедляют его. Среди всех гормонов особое место занимают brassinosteroids (БС), представляющие собой полигидроксильрованные производные стероидов, близкие по строению стероидным гормонам млекопитающих [4]. Они выполняют решающую роль в реализации жизненного цикла растений: от прорастания семян до естественной смерти. БС на протяжении всего онтогенеза растений способны влиять на процессы деления и растяжения клеток, сосудистую дифференцировку, процесс этиоляции, фотоморфогенез, иммунитет, репродуктивное развитие, а также могут оказывать протекторный эффект в ответ на действие различных стрессоров [5]. В настоящее время выделено около 70 природных brassinosteroidов. На основании различий в структуре циклической части молекулы их можно отнести к В-лактонам, 6-кетонам и 6-дезоксопроизводным [6].

Для некоторых представителей brassinosteroidов, таких как brassinolid (БЛ), 24-эпибрассинолид и 28-гомобрассинолид, показана высокая биологическая активность, которая обусловлена такими структурными особенностями молекул, как присутствие 6-кето- или 7-окса-6-оксо структурного фрагмента в кольце В, наличие 2 α -, 3 α -диольной группировки в кольце А, существование диольной системы в положениях 22 и 23 с R-конфигурацией гидроксильных групп, наличие метильной или этильной группы в положении 24 (боковая цепь), *транс*-сочленение циклов А/В [7].

Лактонсодержащие brassinosteroids являются продуктом ключевой стадии биосинтеза brassinosteroidов из их кетонсодержащих предшественников. 24-эпибрассинолид (ЭБЛ) относится к лактонсодержащим БС, тогда как 24-эпикастастерон (ЭПК) – к кетонсодержащим. Предполагается, что наличие *цис*-диольной группировки в цикле А, а также присутствие гидроксильных групп в положениях 22 и 23 боковой цепи необходимы для проявления высокой биологической активности БС в растениях [7], что характерно для молекул ЭБЛ и ЭПК. Важно отметить, что физиологическое действие ЭБЛ, как лактонсодержащего brassinosteroidа, исследовано более детально, в отличие от его кетонсодержащего предшественника.

Исследование влияния brassinosteroidов на старение растений представляет значительный интерес, однако до сих пор остается невыясненной их роль в этом процессе. Ряд исследований свидетельствует о том, что brassinosteroids способны ускорять старение [8–11], однако существуют доказательства, указывающие на их способность ингибировать эти процессы [12, 13]. На примере мутантного растения *Arabidopsis thaliana*, у которого инактивирован ген, кодирующий один из ключевых ферментов биосинтеза brassinosteroidов, было показано, что недостаток гормонов приводит к замедлению старения и формированию карликовых растений с продолжительным жизненным циклом [14]. С другой стороны, экзогенные лактонсодержащие brassinosteroids способствуют мобилизации фотосинтетических процессов, повышению уровня пигментов и активности транскрипции хлоропластных генов у растений исходного родительского фенотипа [15]. Показано, что у растений картофеля баланс кетон- и лактонсодержащих БС характеризуется органоспецифичностью, а также зависит от возраста растений. Так, например, в корнях преобладали представители лактонового ряда, в побегах – кетонового, при этом по мере роста растений содержание лактонов снижалось, а кетонов возрастало [16]. Тем не менее, данные о динамике и балансе brassinosteroidов разного химического строения в растениях представлены недостаточно, а влияние экзогенных фитогормонов на уровень эндогенных brassinosteroidов слабо изучено.

Можно предположить, что в зависимости от химического строения (лактон- или кетонсодержащие) и действующей концентрации brassinosteroids могут оказывать различное по направленности и степени выраженности влияние на процесс старения. Кроме того, до сих пор остается открытым вопрос об эффективности действия лактон- (ЭБЛ) и кетонсодержащих (ЭПК) brassinosteroidов на состояние фотосинтетической системы, как одного из основных маркеров оптимального физиологического состояния растений при темновом старении срезанных листьев ячменя. Для исследова-

дования специфичности действия ЭБЛ и ЭПК не только на физиологическом, но и на молекулярном уровне изучена активность экспрессии гена *HvS40*, продукт которого участвует в регуляции старения и может быть использован в качестве молекулярного маркера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на растениях ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare* L.) сорта “Луч”. Это однодольное травянистое растение семейства Злаковые (*Poaceae*), которое широко используется во многих странах мира как одна из основных сельскохозяйственных культур. Удобство экспериментального использования ячменя для оценки активности и эффективности действия веществ гормональной природы обусловлено доступностью семенного материала, неприхотливостью растений, возможностью их выращивания в лабораторных условиях с быстрым получением большого количества растений.

Семена ячменя проращивали в почве в климатической камере при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$, с фото-периодом 16/8 ч (день/ночь), при 150 мкмоль фотонов/м²с под люминесцентными лампами (“OSRAM”, Германия) в течение 5 суток. Перед началом эксперимента часть растительного материала фиксировали для определения содержания фотосинтетических пигментов, показателей активности ФС II и оценки уровня транскриптов гена *HvS40* – исходная точка (ИТ). Отделенные листья *H. vulgare* инкубировали на растворах 24-эпикастастерона и 24-эпикастастерона в концентрациях 0.01, 0.1 и 1 мкМ в чашках Петри на фильтровальной бумаге. В качестве положительного контроля использовали синтетический аналог природного цитокинина – 6-бензиламинопурина в концентрации 10 мкМ, в качестве отрицательного – дистиллированную воду. Важно отметить, что именно БАП используется в качестве положительного контроля, поскольку ранее были получены данные о его ингибирующем влиянии на старение [17]. Чашки Петри со срезанными листьями выдерживали в течение пяти суток без света. Измерения анализируемых показателей проводили на 1, 3 и 5 сутки после начала инкубации, фиксацию растительного материала осуществляли на зеленом свете низкой интенсивности (0.25 мкмоль/м² с). Каждый лист условно разделяли на три части – низ (2 см от основания листа), верх (2 см от верхушки листа), середина (часть листа между верхом и низом, около 2–3 см).

О возникновении окислительного стресса при старении отделенных листьев ячменя судили по накоплению веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные вещества). Зафиксированную в жидком азоте пробу листьев

(около 100 мг) растирали в 1 мл 20% трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Перемешивали на вортексе, центрифугировали 15 мин, при 12000 g при 4°C. 500 мкл супернатанта отбирали и добавляли в стеклянные пробирки, содержащие 1.5 мл тиобарбитуровой кислоты. В контрольные образцы вместо супернатанта добавляли равный объем ТХУ. Реакцию с образованием окрашенного комплекса проводили в течение 30 мин при 98°C на водяной бане [18]. Оптическую плотность полученных растворов измеряли на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, “ThermoScientific”, США) при длине волны 532 и 600 нм.

Содержание фотосинтетических пигментов в листьях рассчитывали на сырую массу. Навеску растительного материала (около 10 мг), зафиксированную в 96% спирте, растирали и центрифугировали (MiniSpin, “Eppendorf”, Германия) в течение 8 мин при 8000 g. Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку типа Эппендорф и доводили объем до 1.5 мл 96% спиртом. Оптическую плотность растворов промеряли при длине волн: 470, 664, 648, 720 нм на спектрофотометре (Genesys 10S UV-Vis, “ThermoScientific”, США). В качестве контрольного образца использовали 96% этанол. Количество фотосинтетических пигментов в спиртовой вытяжке рассчитывали по формулам согласно Lichtenthaler [19].

Исследование фотохимической активности ассимиляционного аппарата растений проводили при помощи модулирующего импульсного флуориметра Junior-PAM (“Heinz-Walz”, Germany) [20]. Параметры флуоресценции регистрировали при наведении светодиода флуориметра на пробы листьев после 20 минут темновой адаптации. Хлорофиллы фотосистемы II (ФС II) возбуждали светодиодом при длине волны 450 нм. Детекция флуоресценции хлорофилла (ФлХ) осуществлялась PIN-фотодиодом, защищенным фильтром (длина волны при 50% пропускании – 645 нм). Максимальная плотность светового потока составляла 10000 мкмоль фотонов/(м²с), продолжительность светового импульса – 0.6 с. Параметры флуоресценции рассчитывали в программе WinControl. Параметры флуоресценции хлорофиллов: F_0 – базовый уровень ФлХ при низкой интенсивности света, не вызывающей фотохимических реакций; F_m – максимальный уровень ФлХ, вызванный импульсом света после адаптации тканей к темноте; F'_m – максимальный уровень ФлХ, вызванный импульсом света после адаптации тканей к свету; F_v – “вариабельность” ФлХ, рассчитывается как разность F_0 и F_m ; F'_v – “вариабельность” ФлХ, рассчитывается как разность F_0 и F'_m ; F_v/F_m – максимальный фотохимический квантовый выход ФС II после адаптации тканей к темноте; $Y(II)$, или F'_v/F'_m – эффективный фотохимический

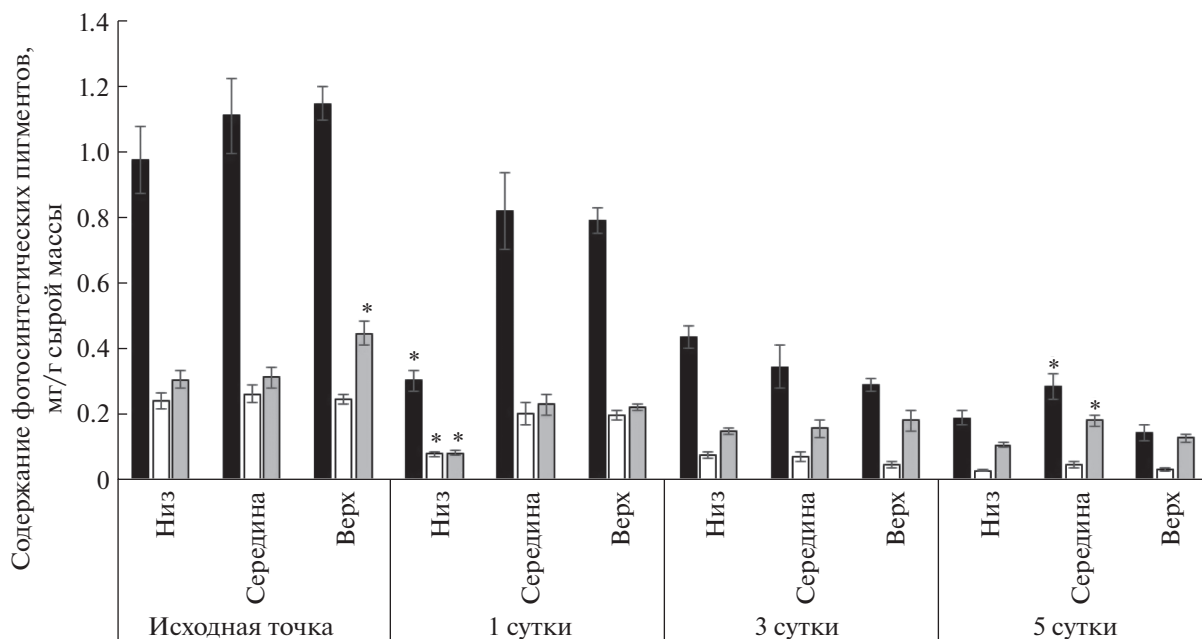


Рис. 1. Содержание фотосинтетических пигментов в разных частях листовой пластины ячменя при темновой инкубации. Столбики черного цвета – хлорофилл *a*, белого цвета – хлорофилл *b*, серого цвета – каротиноиды. Достоверные различия в пределах одних суток на уровне $P \leq 0.05$ отмечены звездочкой (*).

квантовый выход ФС II после адаптации тканей к свету; qP , или $(F'_m - F_t)/(F'_m - F_o)$ – коэффициент фотохимического тушения ФЛХ; qN , или $(F_m - F'_m)/(F_m - F_o)$ – коэффициент нефотохимического тушения ФЛХ; доля открытых центров второй фотосистемы – qL ; $Y(NPQ)$ – регулируемое рассеяние тепловой энергии; $Y(NO)$ – нерегулируемое рассеяние тепловой энергии; ETR – плотность транспорта электронов по электрон-транспортной цепи тилакоидных мембран.

Нуклеотидную последовательность гена *HvS40* (маркера старения) брали из биоинформатической базы данных NCBI (National Center for Biotechnological Information, USA – FI496079.1). Специфические праймеры подбирали с использованием программ Primer-BLAST и Vector NTI 11 [21]. Выделение ДНК, для проверки специфичности отжига праймеров, проводили с помощью коммерческого набора Сорб-ГМО-А (“Синтол”, Россия). РНК выделяли с использованием коммерческого набора RNeasy miniKit (“Qiagen”, Германия). Для синтеза кДНК использовали набор MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). Оценку уровня экспрессии целевого гена проводили методом ПЦР в режиме реального времени в амплификаторе LightCycler96 (“Roche”, Швейцария) с применением красителя SybrGreen I (“Евроген”, Россия). Амплификацию проводили с использованием специфических праймеров для референсных генов (*Ef1* (KP293845.1), прямой: GAAGATGATTCCCAAGC, обратный: TGACACCAACAGCCACAGTT; *TubB* (AM502854),

прямой: TCCAAGGTTTCCAGGTGTG, обратный: AGACGGAGAAGGTGAGCATC [22], при температуре отжига 60°C) и целевого гена – маркера старения – *HvS40* (прямой: GGAGACATCGC-CAAGGTGTC, обратный: TGCAGTCGTCGTTGCACT, при температуре отжига 62°C).

Каждый эксперимент был повторен не менее трех раз. Для каждого биологического повтора использовали не менее 25 листьев. Полученные результаты представлены на рисунках в виде средней арифметической со стандартной ошибкой. Для оценки достоверности различий использовали критерий Стьюдента. Значения t -критерия находили для 95% уровня значимости ($P < 0.05$). Статистическая обработка данных была проведена с использованием программы Statistica 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка пигментного состава в разных частях листовой пластины

Известно, что листья однодольных растений растут основанием, поэтому распределение фотосинтетических пигментов в разных частях листовой пластины неодинаково. Мы проанализировали содержания фотосинтетических пигментов в разных частях листьев ячменя при их темновой инкубации на 1, 3 и 5 сутки (рис. 1).

В исходной точке эксперимента (ИТ) содержание хлорофиллов было одинаково во всех частях листа, при этом уровень каротиноидов в верхней

Таблица 1. Параметры фотосинтеза в разных частях листовой пластины.

	низ	середина	верх
F_v/F_m	0.764 ± 0.014	0.761 ± 0.006	0.779 ± 0.005
Y(II)	0.656 ± 0.007	0.646 ± 0.006	0.651 ± 0.008
Y(NPQ)	0.072 ± 0.003*	0.126 ± 0.009	0.138 ± 0.010
Y(NO)	0.272 ± 0.008*	0.229 ± 0.014	0.211 ± 0.003
ETR	52.322 ± 0.532	51.511 ± 0.445	51.956 ± 0.589
qP	0.912 ± 0.021*	0.962 ± 0.019	0.956 ± 0.005
qN	0.255 ± 0.010*	0.431 ± 0.033	0.470 ± 0.026
qL	0.745 ± 0.060*	0.894 ± 0.054	0.875 ± 0.017

Примечание. F_v/F_m – максимальная фотохимическая эффективность второй фотосистемы, Y(II) – эффективный квантовый выход, Y(NPQ) – регулируемое рассеивание тепловой энергии, Y(NO) – нерегулируемое рассеивание тепловой энергии, ETR – плотность потока электронов, qP – коэффициент фотохимического тушения, qN – коэффициент нефотохимического тушения, qL – доля открытых центров второй фотосистемы. Достоверные различия на уровне $P \leq 0.05$ отмечены звездочкой (*).

части листовой пластины был выше. После суток инкубации, в нижней части листа, содержание всех исследуемых групп пигментов снизилось примерно в 2 раза. На пятые сутки наибольшее содержание хлорофилла *a* наблюдалось в средней части листовой пластины (рис. 1).

Оценка функционального состояния второй фотосистемы в разных частях листовой пластины

При исследовании фотохимической активности второй фотосистемы в разных частях листа 5-дневных проростков ячменя было показано, что величины максимального (F_v/F_m) и эффективного (Y(II)) квантового выхода, показатель плотности потока электронов (ETR) существенно не отличались в разных частях листа, тогда как показатели регулируемого (Y(NPQ)) и нерегулируемого (Y(NO)) рассеивания тепловой энергии, коэффициентов фотохимического (qP) и нефотохимического (qN) тушения, а также доля открытых центров второй фотосистемы (qL) были сходны в верхней и средней части листа, при этом значительно отличаясь от данных показателей в нижней части листовой пластины (табл. 1).

Таким образом, основываясь на этих результатах, для проведения дальнейших исследований использовали среднюю часть листовой пластины.

Влияние ЭБЛ и ЭПК на пигментный состав листьев ячменя

Для определения оптимальной действующей концентрации гормонов исследовали содержание основных фотосинтетических пигментов в отделенных листьях ячменя при их старении, индуцированном темнотой. Использовали ЭБЛ и ЭПК в диапазоне концентраций 0.01–1 мкМ. Обработка brassinosterоидами не оказала значительного влияния на содержание хлорофилла *b*

(Хл *b*) и каротиноидов. К пятым суткам инкубации наблюдалось большее содержание хлорофилла *a* при обработке 1 мкМ ЭПК в сравнении с точным контролем (табл. 2).

Влияние ЭПК и ЭБЛ на перекисное окисление липидов

Наряду с содержанием фотосинтетических пигментов определяли степень окислительного стресса по накоплению веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Анализ показал, что как лактон-, так и кетонсодержащие БС снижали перекисное окисление липидов к пятым суткам воздействия при большинстве исследуемых концентраций. Особенно ярко данный эффект выражен для ЭБЛ и ЭПК в концентрации 1 мкМ (рис. 2).

Опираясь на полученные данные, для дальнейшей оценки эффективности функционирования второй фотосистемы нами была использована концентрация brassinosterоидов 1 мкМ.

Влияние ЭБЛ и ЭПК на активность фотосинтетических процессов второй фотосистемы

РАМ-флуориметрия, основанная на импульсной амплитудной модуляции, широко используется для исследования активности фотосинтетических процессов [23]. Одним из основных показателей функционирования фотосинтетического аппарата является максимальный фотохимический квантовый выход, который определяют как отношение значения переменной флуоресценции к максимальной (F_v/F_m). В течение пяти суток показатель F_v/F_m постепенно снижался у всех вариантов, включая контрольный и варианты с гормональной обработкой (рис. 3а). Тем не менее, на третьи сутки величина данного показателя у контрольного варианта была выше, чем у опытных. На пя-

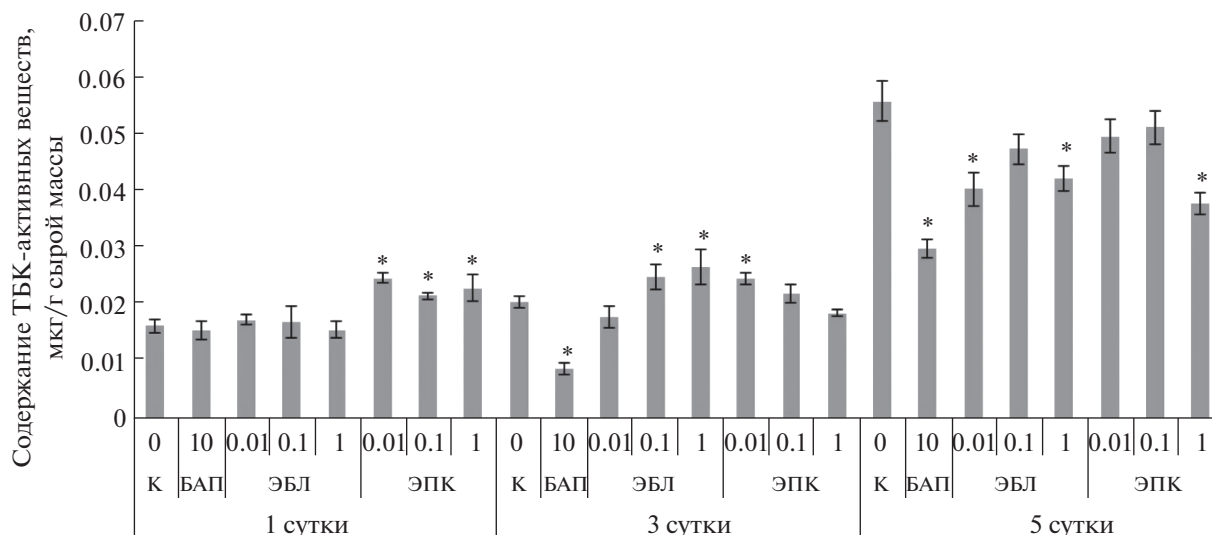


Рис. 2. Влияние ЭБЛ (0.01, 0.1 и 1 мкМ) и ЭПК (0.01, 0.1 и 1 мкМ) на содержание ТБК-активных веществ в средней части листа ячменя в динамике. Достоверные различия относительно суточного контроля на уровне $P \leq 0.05$ отмечены звездочкой (*).

Таблица 2. Влияние ЭБЛ и ЭПК на содержание фотосинтетических пигментов в отделенных листьях ячменя

	Вариант	Концентрация, мкМ	Хл <i>a</i> , мг/г сырой массы	Хл <i>b</i> , мг/г сырой массы	Каротиноиды, мг/г сырой массы
ИТ	ИТ	0	0.73 ± 0.05	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.01
1 сутки	К	0	0.83 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.26 ± 0.00
		10	0.98 ± 0.06*	0.26 ± 0.02*	0.29 ± 0.02*
	ЭБЛ	0.01	0.81 ± 0.07	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.02
		0.1	0.78 ± 0.07	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02
		1	0.90 ± 0.07	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02
	ЭПК	0.01	0.95 ± 0.07*	0.26 ± 0.02*	0.27 ± 0.02
		0.1	0.79 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01*
		1	0.85 ± 0.06	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02
	3 сутки	К	0	0.64 ± 0.06	0.17 ± 0.02
10			0.83 ± 0.03*	0.23 ± 0.01*	0.26 ± 0.01*
ЭБЛ		0.01	0.57 ± 0.04	0.15 ± 0.01	0.20 ± 0.01
		0.1	0.59 ± 0.05	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02
		1	0.57 ± 0.04	0.16 ± 0.01	0.19 ± 0.01
ЭПК		0.01	0.58 ± 0.04	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.02
		0.1	0.68 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.01
		1	0.65 ± 0.09	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.03
5 сутки		К	0	0.29 ± 0.03	0.10 ± 0.01
	10		0.75 ± 0.03*	0.20 ± 0.01*	0.24 ± 0.01*
	ЭБЛ	0.01	0.22 ± 0.04	0.07 ± 0.01*	0.12 ± 0.01
		0.1	0.23 ± 0.02*	0.07 ± 0.01*	0.12 ± 0.01
		1	0.31 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02
	ЭПК	0.01	0.26 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.02
		0.1	0.25 ± 0.02	0.07 ± 0.00*	0.13 ± 0.00
		1	0.39 ± 0.04*	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02

Примечание. Достоверные различия относительно суточного контроля на уровне $P \leq 0.05$ отмечены звездочкой (*).

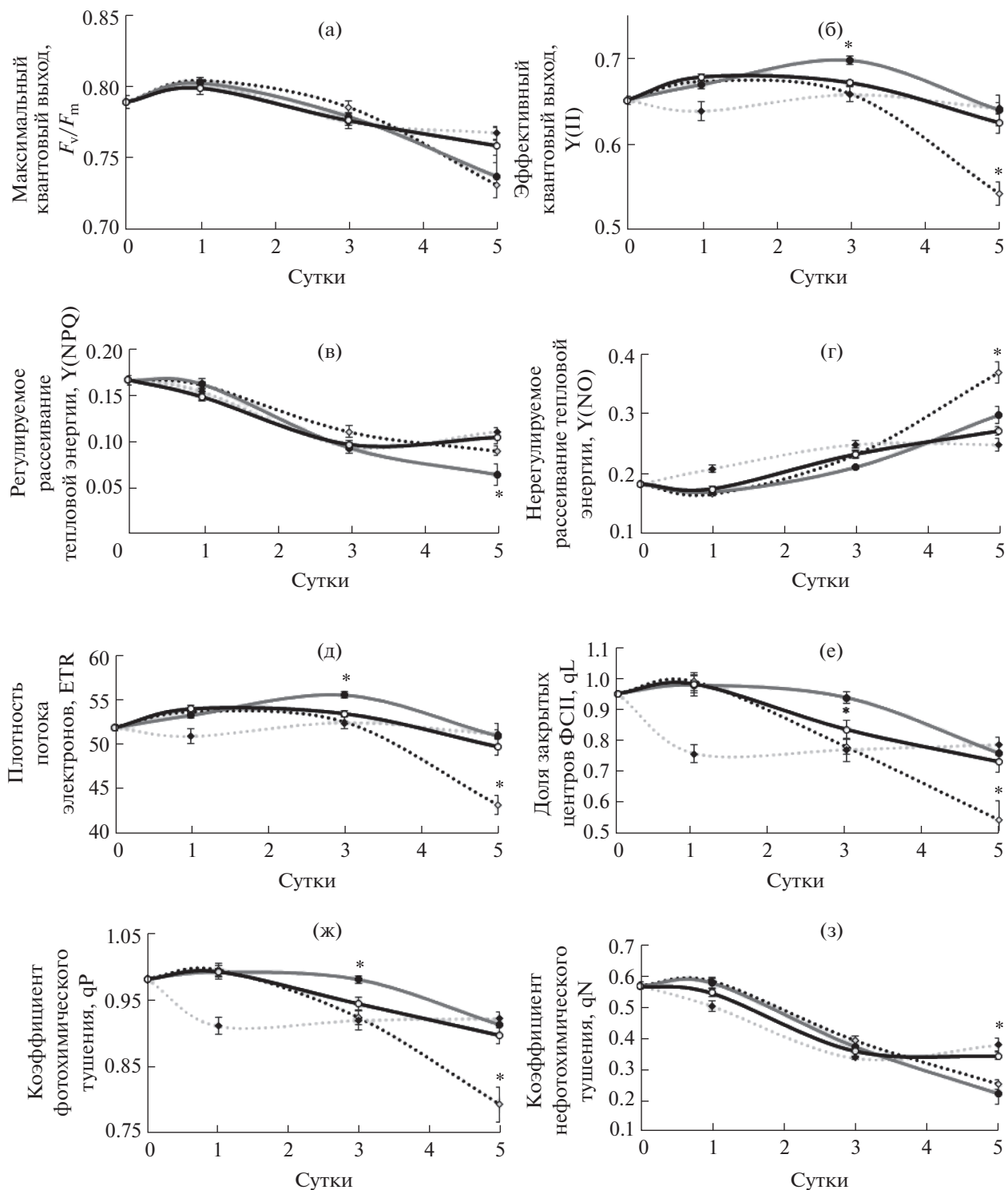


Рис. 3. Влияние ЭБЛ (1 мкМ) и ЭПК (1 мкМ) на параметры фотосинтеза: максимальный квантовый выход (а), эффективный квантовый выход (б), регулируемое рассеивание тепловой энергии (в), нерегулируемое рассеивание тепловой энергии (г), плотность потока электронов (д), доля открытых центров второй фотосистемы (е), коэффициент фотохимического тушения (ж), коэффициент нефотохимического тушения (з). Черная пунктирная линия – контроль, серая пунктирная линия – БАП, серая сплошная линия – ЭБЛ, черная сплошная линия – ЭПК. Достоверные различия на уровне $P \leq 0.05$ отмечены звездочкой (*).

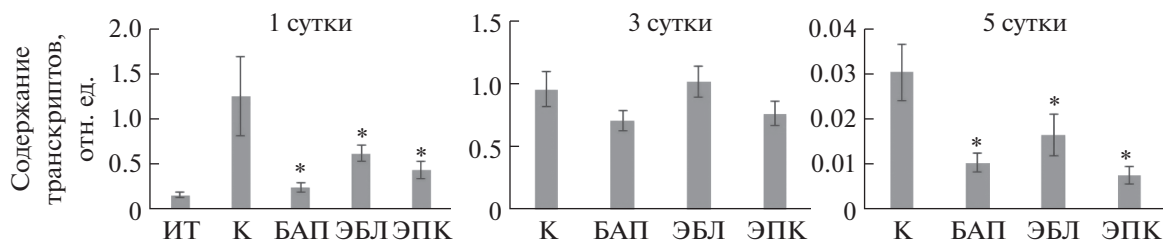


Рис. 4. Влияние ЭБЛ (1 мкМ) и ЭПК (1 мкМ) на относительный уровень транскриптов гена *HvS40* в листьях ячменя. Достоверные различия относительно суточного контроля на уровне $P \leq 0.05$ отмечены звездочкой (*).

тые сутки отмечалось некоторое повышение показателя F_v/F_m у опытных вариантов в сравнении с суточным контролем (рис. 3а).

На протяжении всего периода инкубации было отмечено снижение эффективного квантового выхода ($Y(II)$) во всех исследуемых вариантах. При этом уже на третьи сутки данный показатель увеличивался у вариантов с обработкой brassinosterоидами относительно контроля. У всех вариантов с гормональной обработкой на пятые сутки показатель $Y(II)$ был выше примерно на 17%, чем у суточного контроля (рис. 3б).

Для оценки нефотохимического тушения флуоресценции используется параметр регулируемого рассеяния тепловой энергии ($Y(NPQ)$). Данный показатель служит оценкой интенсивности нефотохимического тушения возбужденных состояний хлорофилла – защитного механизма регуляции фотосинтеза от избыточного облучения. Было отмечено незначительное повышение данного показателя на пятые сутки воздействия ЭПК, тогда как для варианта с ЭБЛ этот параметр был ниже суточного контроля (рис. 3в). Величина нерегулируемого рассеивания тепловой энергии ($Y(NO)$) повышалась к пятым суткам инкубации, особенно в контрольном варианте. Гормональная обработка приводила к снижению данного показателя на 20–30% (рис. 3г).

О стабильной эффективности ФС II свидетельствует восстановление скорости переноса электронов (ETR) в ответ на гормональное воздействие. Так, на рисунке 3д показано, что относительная скорость транспорта электронов совпадала с динамикой эффективного квантового выхода $Y(II)$.

Показатель qL отражает долю открытых реакционных центров ФС II. ЭПК и ЭБЛ способствовали увеличению данного показателя на третьи и пятые сутки воздействия (рис. 3е).

Данные, представленные на рисунке 3ж, свидетельствуют о том, что значение коэффициента фотохимического тушения флуоресценции (qP) в присутствии лактон- и кетонсодержащих brassinosterоилов было выше в сравнении с контролем на третьи и пятые сутки инкубации. qN – коэффициент нефотохимического тушения флуорес-

ценции – к пятым суткам эксперимента повышался при инкубации с 24-эпикастестероном и не отличался от суточного контроля при обработке 24-эпибрассинолидом (рис. 3з).

Оценка экспрессии гена *HvS40*

Ген *HvS40* ячменя относится к семейству генов *S40*, участвующих в регуляции старения растений, и может быть использован для оценки процесса старения, индуцированного темнотой, у отделенных листьев ячменя. После суток инкубации экспрессия гена *HvS40* была выше, чем в исходной точке эксперимента (до начала воздействия) (рис. 4). При этом гормональная обработка листьев снижала активность экспрессии гена старения.

На третьи сутки воздействия наблюдалось выравнивание с суточным контролем уровня транскриптов гена *HvS40* при обработке brassinosterоидами. К пятым суткам эксперимента экспрессия гена *HvS40* в суточном контроле была выше, чем в вариантах с гормональным воздействием (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Брассиностероиды, как класс фитогормонов, открыты сравнительно недавно и значительные успехи по исследованию их свойств и функций в растениях достигались благодаря использованию мутантных растений. При этом у разных видов растений, содержащих мутации по генам, отвечающим за синтез или сигналинг brassinosterоилов, наблюдалось проявление сходных фенотипических черт, в частности, карликовость [24]. Данные исследования положили начало изучению стероидных гормонов растений, как регуляторов развития, оказывающих значительное воздействие на рост, растяжение, деление и дифференциацию клеток. Позже было установлено, что влияние БС на рост осуществляется путем сложного сигнального каскада, модулирующего активность генов и баланс других фитогормонов [25]. Также было показано, что brassinosterоиды способны участвовать в формировании защитного потенциала растений от биотических и абиотических стрессоров [26].

Несмотря на то, что ученые вплотную приблизились к пониманию механизмов действия brassinosterоидов, вопрос об их регуляторной роли при старении до сих пор остается открытым. Также не определено, зависит ли направленность действия разных представителей БС от их химической структуры.

Например, отмечено ускорение процессов старения отделенных листьев гороха в результате изменения липидного состава при действии 0.1 мкМ 24-эпибрасинолида [8]. Кроме того, на 15 сутки воздействия снижалось накопление хлорофиллов *a* и *b* при действии 0.1 мкМ ЭБЛ по сравнению с контролем и ЭБЛ в концентрациях 1 и 10 нМ [8]. Брасинолид способствовал ускорению старения отделенных семядолей проростков огурца [9] и листьев пшеницы [10]. Было показано, что брасинолид способствовал опосредованному этиленом послеуборочному созреванию плодов томатов, увеличивая содержание растворимых сахаров, аскорбиновой кислоты, содержание ликопина, скорости дыхания и выработки этилена, но значительно снижал содержание хлорофилла по сравнению с контролем. При этом применение брасиназола — ингибитора биосинтеза brassinosterоидов — задерживало созревание томатов [11]. В исследованиях по влиянию брасинолида на рост и развитие сои продемонстрировано замедление процесса опадения и пожелтения листьев при физиологическом старении растений. Анализ экспрессии генов белков семейства WRKY, участвующих в регуляции старения, показал снижение их активности при действии брасинолида [12]. Кроме того, важно учитывать зависимость эффекта brassinosterоидов от возраста листьев. Было показано, что обработка brassinosterоидами зрелых листьев папайи отсрочила их пожелтение и опадение, тогда как развитию старения более молодых листьев она не препятствовала [13]. По большей части исследование влияния brassinosterоидов на старение проводится с применением гормонов лактонового ряда — брасинолида, 24-эпибрасинолида. Тогда как кастастерон и 24-эпикастастерон — представители кетонового ряда БС, предшественники БЛ и ЭБЛ, в данном аспекте изучены недостаточно [27].

Ведущая роль в функционировании ассимилирующих систем листа принадлежит фотосинтетическим пигментам. Содержание и соотношение разных групп пигментов отражает состояние фотосинтетического аппарата. Важной характеристикой фотосинтетической активности также является соотношение скорости образования новых и разрушение старых молекул хлорофилла. Последнее же напрямую зависит от физиологического состояния клетки и растения в целом. К условиям, снижающим фотосинтетическую активность, относится и старение. На пятые сутки инкубации листьев ячменя отмечено положи-

тельное влияние 1 мкМ 24-эпикастастерона на содержание фотосинтетических пигментов (табл. 2).

Хлорофиллы содержатся в составе фотосистем растений, и снижение их количества может значительно тормозить протекание фотохимических процессов. Оценка функционального состояния второй фотосистемы показала зависимость ее активности от старения. Так, к пятым суткам воздействия наблюдалось значительное снижение максимального и эффективного квантового выхода, плотности потока электронов, регулируемого рассеивания тепловой энергии, коэффициентов фотохимического и нефотохимического тушения электронов, а также доля открытых центров второй фотосистемы. При этом наблюдалось увеличение нерегулируемого рассеивания тепловой энергии (рис. 3а-з). Все это, несомненно, свидетельствует об угнетении активности фотосинтетического аппарата при старении.

ЭБЛ и ЭПК способствовали поддержанию ряда показателей на уровне выше суточного контроля к пятым суткам эксперимента. Величина эффективного квантового выхода, плотности потока электронов и доля открытых центров второй фотосистемы была выше как при обработке ЭБЛ, так и ЭПК в сравнении с суточным контролем (рис. 3б, д, е).

Чтобы избежать повреждений реакционных центров повышенной инсоляцией, растениям необходимо рассеивать в виде тепла часть энергии поглощенных квантов света. Такие процессы также активизируются, когда листья повреждены в результате действия других стрессовых факторов. Ведущую роль в этом процессе играют каротиноиды. Для оценки нефотохимического тушения флуоресценции используется параметр регулируемого рассеивания тепловой энергии ($Y(NPQ)$), служащий для оценки функционирования защитного механизма регуляции фотосинтеза от избыточного облучения. Исходя из полученных данных, 24-эпикастастерон влиял на поддержание данного показателя на уровне выше суточного контроля, тогда как ЭБЛ снижал его на пятые сутки (рис. 3в). Показатель, характеризующий нерегулируемое рассеивание тепловой энергии, повышался к пятым суткам во всех исследуемых вариантах в сравнении с исходной точкой эксперимента. При этом на пятый день воздействия гормональная обработка значительно снижала данный показатель относительно суточного контроля, а кетонсодержащий brassinosterоид — ЭПК, в сравнении с лактонсодержащим — ЭБЛ, оказался более эффективен (рис. 3г).

В основе фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла лежит тот факт, что, в зависимости от окислительно-восстановительного состояния первичного акцептора второй фотосистемы — пластохинона, уровень флуоресценции

хлорофиллов может различаться в несколько раз: увеличиваться при восстановлении пластохинона и уменьшаться при его окислении. Для оценки доли окисленных пластохинонов используют коэффициент фотохимического тушения (qP). Чем выше значение qP , тем больше количество окисленных пластохинонов, а значит эффективность использования энергии света и пропускной способности фотосинтетической электрон-транспортной цепи достаточно высока для продуктивного функционирования фотосинтетического аппарата. При этом как 24-эпибрасинолид, так и 24-эпикастастерон повышали данный показатель уже на третьи сутки воздействия (рис. 3ж).

Старение способно вызывать разрушение хлоропластов. Во время деструкции пластид одновременно с уменьшением содержания хлорофиллов значительно понижается и содержание воды в листьях. Возникновение водного дефицита ведет к развитию осмотического стресса и, как следствие, к усилению генерации активных форм кислорода [28]. АФК обладают высокой реакционной способностью и могут окислять липиды, значительное количество которых содержится в клеточных мембранах [29]. При распаде жирных кислот, сопровождающим перекисное окисление липидов, первоначально образуются нестойкие и довольно быстро разрушающиеся диеновые конъюгаты [30]. Они быстро разрушаются с образованием вторичных продуктов, таких как малоновый диальдегид, составляющий основной компонент группы так называемых ТБК-активных веществ, которые взаимодействуют с тиобарбитуровой кислотой. Таким образом, нагрузка на фотосинтетический аппарат при старении значительно возрастает не только за счет АФК, образующихся в процессе фотосинтеза, но и за счет окислительного стресса, возникающего в клетках растений. Нами показано значительное увеличение ПОЛ к пятым суткам инкубации в контрольном варианте, при этом гормональная обработка способствовала снижению стрессорного воздействия на липидную мембрану, о чем свидетельствует уменьшение содержания ТБК-активных веществ в пробах. На основании описанных параметров можно сделать заключение об эффективности ЭБЛ и ЭПК в поддержании структуры фотосинтетического аппарата и фотосинтетической активности стареющих листьев ячменя (рис. 2).

Оценка уровня экспрессии гена старения *HvS40* на пятые сутки инкубации показала снижение накопления его транскриптов при гормональной обработке, причем кетонсодержащий брасиностероид оказался более эффективным (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют о том, что кетонсодержащий брасиностероид – 24-эпикастастерон – оказывает значительное физиологическое действие на растения. В условиях старения отделен-

ных листьев как лактон-, так и кетонсодержащие брасиностероиды оказали протекторное действие, однако при обработке 24-эпикастастероном защитный эффект был выражен сильнее. На фотосинтетический аппарат брасиностероиды также оказали положительное влияние, поддерживая фотохимическую активность второй фотосистемы. Однако в отношении защиты фотосинтетического аппарата кетонсодержащий брасиностероид оказался эффективнее лактонсодержащего. Снижение накопления транскриптов гена *HvS40* при действии брасиностероидов на 5 сутки может свидетельствовать о замедлении развития старения в сравнении с суточным контролем. При этом для большинства анализируемых параметров гормоны играли решающую роль к пятым суткам воздействия. Таким образом, кетонсодержащий брасиностероид, как предшественник лактонсодержащего брасиностероида, не менее эффективен, а в некоторых случаях биологически более активен в отношении исследуемых показателей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 19-34-50076 мол_нр.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Woo H.R., Koo H.J., Kim J., Jeong H., Yang J.O., Lee H., Jun J.H., Choi S.H., Park S.J., Kang B., Kim Y.W., Phee B.K., Kim J.H., Seo C., Park C., Kim S.C., Park S., Lee B., Hwang D., Nam H.G., Lim P.O. Programming of plant leaf senescence with temporal and inter-organelle coordination of transcriptome in *Arabidopsis* // Plant physiology. 2016. V. 171. P. 452. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01929>
2. Woo H.R., Kim H.J., Kim P.O., Nam H.G. Leaf senescence: systems and dynamics aspects // Annu Rev Plant Biol. 2019. V. 70. P. 347. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095859>
3. Krieger-Liszkay A., Krupinska K., Shimakawa G. The impact of photosynthesis on initiation of leaf senescence // Physiologia plantarum. 2019. V. 166. № 1. P. 148. <https://doi.org/10.1111/ppl.12921>
4. Lakhvich F., Khrpach V., Zhabinskii V. The synthesis of brassinosteroids? A new class of plant hormones // Russian chemical reviews. 1991. V. 60. № 6. P. 658. <https://doi.org/10.1070/RC1991v060n06ABEH001100>
5. Khrpach V., Zhabinskii V., Groot A. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century // Annals of Botany. 2000. V. 86. № 3. P. 441. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1227>
6. Литвиновская Р.П. Применение фитогормональных стероидов в технологии выращивания карто-

- феля // Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Актуальные проблемы картофелеводства: фундаментальные и прикладные аспекты”. Томск, 2018. С. 15.
7. Kanwar M.K., Bajguz A., Zhou J., Bhardwaj R.J. Analysis of brassinosteroids in plants // *J Plant Growth Regul.* 2017. V. 36. P. 1002. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9732-4>
 8. Fedina E.O., Yarin A.Y., Mukhitova F.K., Blufard A.S., Chechetkin I.R. Brassinosteroid-induced changes of lipid composition in leaves of *Pisum sativum* L. during senescence // *Steroids.* 2017. V. 117. P. 25. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.10.009>
 9. Zhao Y.J., Xu R.J., Luo W.H. Inhibitory effects of abscisic acid on epibrassinolide-induced senescence of detached cotyledons in cucumber seedlings // *Chin. Sci. Bull.* 1990. V. 35. P. 928.
 10. Saglam-Cag S. The effect of epibrassinolide on senescence in wheat leaves // *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2007. V. 21. P. 63. <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817415>
 11. Zhu T., Tan W.-R., Deng X.-G., Zheng T., Zhang D.-W., Lin H.-H. Effects of brassinosteroids on quality attributes and ethylene synthesis in postharvest tomato fruit // *Postharvest Biology and Technology.* 2015. V. 100. P. 196. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.016>
 12. Yin W., Yin Y., Dong N., Niu M., Zhang X., Li L., Liu J., Liu B., Tong H. Brassinosteroid-regulated plant growth and development and gene expression in soybean // *The Crop Journal.* 2019. V. 7. P. 411. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.10.003>
 13. Assis-Gomes M.D., Pinheiro D.T., Bressan-Smith R.E., Campostrini E. Exogenous brassinosteroid application delays senescence and promotes hyponasty in *Carica papaya* L. leaves // *Theor. Exp. Plant Physiol.* 2018. V. 30. P. 193. <https://doi.org/10.1007/s40626-018-0114-5>
 14. Chory J., Nagpal P., Peto C.A. Phenotypic and genetic analysis of *det2*, a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.* 1991. V. 3. P. 445. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.5.445>
 15. Ефимова М.В., Кузнецов В.В., Кравцов А.К., Барташевич Д.А., Карначук Р.А., Ковтун И.С., Кузнецов В.В. Особенности экспрессии пластидного генома и развития растений *Arabidopsis thaliana* с нарушенным синтезом брассиностероидов // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. С. 32.
 16. Ефимова М.В., Литвиновская Р.П., Медведева Ю.В., Мурган О.К., Савчук А.Л., Кузнецов В.В., Хрипач В.А. Содержание и баланс эндогенных брассиностероидов у микроклонов картофеля определяется органо-специфичностью и скороспелостью сорта // *Доклады академии наук.* 2019. Т. 485. № 1. С. 117. <https://doi.org/10.31857/S0869-56524851117-121>
 17. Кулаева О.Н. Цитокинины их структура и функция. Москва: Наука, 1973. 264 с.
 18. Buege J.A., Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation // *Methods Enzymol.* 1978. V. 52. P. 302.
 19. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic biomembranes // *Methods enzymology.* 1987. V. 148. P. 350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
 20. Pfundel E. Junior-PAM Chlorophyll fluorometer: Operator's guide // Germany, Heinz Walz GmbH. 2007. P. 58.
 21. Ковтун И.С., Ефимова М.В. Особенности подбора праймеров конститутивного гена для проведения полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции // *Вестник Томского государственного университета. Биология.* 2013. № 2 (22). С. 160.
 22. Hua W., Zhu J., Shang Y., Wang J., Jia Q., Yang J. Identification of suitable reference genes for barley gene expression under abiotic stresses and hormonal treatments // *Plant Mol. Biol. Rep.* 2015. V. 33. P. 1002. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0807>
 23. Kolomeichuk L.V., Efimova M.V., Zlobin I.E., Kreslavskii V.I., Murgan O.K., Kovtun I.S., Khripach V.I., Kuznetsov V.V., Allakhverdiev S.I. 24-Epibrassinolide alleviates the toxic effects of NaCl on photosynthetic processes in potato plants // *Photosynth. Res.* 2020. V. 146. P. 151. <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00708-z>
 24. Castorina G., Consonni G. The role of brassinosteroids in controlling plant height in *Poaceae*: a genetic perspective // *International journal of molecular sciences.* 2020. V. 21. P. 1191. <https://doi.org/10.3390/ijms21041191>
 25. Clouse S.D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development // *Plant Cell.* 2011. V. 23. P. 1219. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084475>
 26. Nolan T., Chen J., Yin Y. Cross-talk of Brassinosteroid signaling in controlling growth and stress responses // *Biochem. J.* 2017. V. 474. P. 2641. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160633>
 27. Xu Y., Li K., Zhu K., Tian Y., Yu Q., Zhang W., Wang Z. Effect of exogenous plant hormones on agronomic and physiological performance of a leaf early-senescent rice mutant *osled* // *Plant Growth Regulation.* 2020. V. 92. P. 517. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00653-w>
 28. Sharma A., Shahzad B., Kumar V., Kohli S.K., Sidhu G.P.S., Bali A.S., Handa N., Kapoor D., Bhardwaj R., Zheng B. Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress // *Biomolecules.* 2019. V. 9. № 7. P. 285. <https://doi.org/10.3390/biom9070285>
 29. Rasool S., Hameed A., Azooz M.M., Rehman M., Siddiqi T.O., Ahmad P. Salt stress: causes, types and responses of plants // *Ecophysiology and responses of plants under salt stress.* Springer, New York, NY. 2013. P. 1.
 30. Alche J.D. A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants // *Redox biology.* 2019. V. 23. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101136>