

УДК 581.1

## ВЛИЯНИЕ 24-ЭПИКАСТАСТЕРОНА И ЕГО МОНОСАЛИЦИЛАТА НА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ *Arabidopsis thaliana* ДИКОГО ТИПА И САЛИЦИЛАТДЕФИЦИТНЫХ ТРАНСФОРМАНТОВ *NahG*

© 2022 г. Р. П. Литвиновская<sup>а</sup>, М. А. Шкляревский<sup>б</sup>, Ю. Е. Колупаев<sup>б, \*</sup>,  
А. И. Кокорев<sup>б</sup>, В. А. Хрипач<sup>а</sup>, А. П. Дмитриев<sup>с</sup>

<sup>а</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>б</sup>Харьковский национальный аграрный университет им. В. В. Докучаева, Харьков, Украина

<sup>с</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев, Украина

\*e-mail: plant.biology.knau@gmail.com

Поступила в редакцию 11.08.2021 г.

После доработки 20.08.2021 г.

Принята к публикации 20.08.2021 г.

Исследовано влияние 24-эпикастастерона (ЭК) и его конъюгата с остатком салициловой кислоты (2-моносалицилата ЭК – МСЭК) на устойчивость растений *Arabidopsis thaliana* L. дикого типа (Col-0) и трансформированных геном бактериальной салицилатгидроксилазы (*NahG*) к 24-часовому воздействию 175 мМ NaCl. Обработка ЭК в диапазоне концентраций от 0.01 до 1 мкМ оказывала положительное влияние на солеустойчивость растений дикого типа, что проявлялось в снижении под его влиянием интенсивности ПОЛ, стабилизации пула хлорофилла и повышении содержания каротиноидов после действия NaCl. Еще более выраженный защитный эффект на растения Col-0 оказывал МСЭК. Под влиянием ЭК в условиях солевого стресса у растений дикого типа повышалась активность антиоксидантных ферментов каталазы и гваяколпероксидазы, а при обработке МСЭК происходило значительное повышение активности супероксиддисмутазы и каталазы. В то же время обработка как ЭК, так и МСЭК не изменяла активность антиоксидантных ферментов у растений *NahG*, которые не способны накапливать салициловую кислоту. Также воздействие ЭК или МСЭК на салицилатдефицитные растения *A. thaliana* не изменяло интенсивности ПОЛ и содержания фотосинтетических пигментов при солевом стрессе. Сделано заключение об участии салициловой кислоты в реализации защитного действия brassinosterоидов на растения в условиях интенсивного засоления и перспективности применения МСЭК для повышения солеустойчивости растений.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, 24-эпикастастерон, 2-моносалицилат 24-эпикастастерона, антиоксидантная система, brassinosterоиды, салициловая кислота, солеустойчивость

**DOI:** 10.31857/S0015330322020105

### ВВЕДЕНИЕ

Браassinosterоиды (БС) – класс растительных полигидроксистероидов, структурно родственных стероидным гормонам позвоночных животных и насекомых [1]. БС играют ключевую роль в поддержании нормального роста растений как в оптимальных условиях, так и при действии неблагоприятных факторов окружающей среды. Предполагается, что модификация сигнального пути БС может быть одним из стратегических направлений решения проблемы адаптации культурных растений [2]. Изученная в последние годы способность БС индуцировать устойчивость рас-

тений к “отсроченному” действию стресс-факторов [3, 4] создает дополнительные предпосылки для их использования в растениеводстве в качестве праймирующих агентов. БС оказывают протекторное влияние на растения, подвергающиеся действию абиотических стрессоров различной природы – гипо- и гипертермии, засухи, засоления, тяжелых металлов, гербицидов и т.д. [5–8]. Широкий спектр эффектов БС, вероятно, связан с их способностью регулировать экспрессию ключевых для обеспечения устойчивости растений генов, кодирующих транскрипционные факторы MYB/MYC и WRKY, белки семейства COR, дегидрины, белки теплового шока, белки цитоскелета, антиоксидантные ферменты [2, 8]. От экспрессии этих генов зависит выполнение программ адаптации к стрессорам различной природы.

**Сокращения:** БС – brassinosterоиды; ГПО – гваяколпероксидаза; КАТ – каталаза; МСЭК – 2-моносалицилат 24-эпикастастерона; СК – салициловая кислота; СОД – супероксиддисмутаза; ЭК – 24-эпикастастерон.

По крайней мере, часть таких эффектов БС реализуется за счет их функционального взаимодействия с другими фитогормонами, в частности, с гиббереллинами, ауксинами [9], цитокининами [10], АБК [11], этиленом и салициловой кислотой (СК) [12].

СК наряду с БС вовлекается в адаптацию растений к стресс-факторам различной природы [13]. Имеются данные, указывающие на участие компонентов салицилатного сигналинга в реализации стресс-протекторных эффектов БС [14]. Однако такие сведения неоднозначны. Так, при заражении корней риса *Pythium graminicola* БС действовали как факторы вирулентности, усиливая развитие болезни и подавляя защитное действие синтетического аналога СК бензотиадиазола [15]. Иной характер взаимодействия СК и БС обнаружен в экспериментах по повышению устойчивости растений к действию абиотических стрессоров. Например, показано, что экзогенный 24-эпибрассинолид значительно повышал теплоустойчивость растений *A. thaliana* дикого типа (Col-0), но слабо влиял на резистентность генотипа *npr1-1* – мутантов по ключевому гену салицилатного сигналинга [12]. При действии засоления показатель выживаемости *npr1-1* не отличался от такового у растений дикого типа, однако при обработке экзогенным 24-эпибрассинолидом повышение солеустойчивости наблюдалось только у растений Col-0 [12].

Комбинированная обработка 24-эпибрассинолидом и СК оказывала более существенные защитные эффекты на растения *Brassica juncea* при действии токсичных доз свинца, что проявлялось в усиленном накоплении антиоксидантов липидной фазы и хелаторов металлов [16]. Усиление защитного влияния обработки 28-гомобрассинолидом в сочетании с СК показано на растениях *Brassica juncea* в условиях засоления [17]. При одновременном действии двух фитогормонов в условиях засоления отмечались более высокие показатели устьичной проводимости, фиксации CO<sub>2</sub> и активности нитратредуктазы по сравнению с растениями, обработанными каждым из фитогормонов по отдельности.

Показано, что конъюгаты БС с СК, специально синтезированные с помощью реакций 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона (ЭК) с ангидридом 2-*O*-бензилсалициловой кислоты с последующим гидролизом *O*-бензильных групп, оказывали более заметное влияние на выживание проростков проса после потенциально летального нагрева не только по сравнению с исходными БС, но и со смесью соответствующих БС с СК, взятых в оптимальных концентрациях [18].

Следует отметить, что, несмотря на сложившиеся представления о защитных функциях СК у растений в условиях действия абиотических

стрессоров, в ряде исследований показано, что отсутствие эндогенного пула СК может не только не снижать устойчивость растений к действию отдельных неблагоприятных факторов, но и повышать ее. Например, установлено, что растения *A. thaliana NahG*, трансформированные бактериальной салицилатгидроксилазой и не накапливающие вследствие этого СК, проявляли более высокую устойчивость к действию ионов алюминия [19] и кадмия [20]. Неоднозначной оказалась реакция трансформантов *NahG* на действие засоления. При умеренном солевом стрессе растения *NahG* отличались повышенной по сравнению с растениями дикого типа устойчивостью, в то время как при действии высоких концентраций NaCl, их устойчивость оказалась ниже, чем у растений Col-0 [21]. Под влиянием экзогенного пероксида водорода отмечалось ингибирование роста растений дикого типа, но не трансформантов *NahG*, при этом обработка H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> повышала солеустойчивость растений обоих генотипов [22]. В связи с этим можно полагать, что повышение солеустойчивости растений экзогенным пероксидом водорода не связано с участием СК как возможного посредника.

Растения *NahG* могут служить модельным объектом для изучения роли эндогенной СК в проявлении эффектов различных соединений со стресс-протекторным действием. Однако влияние БС на адаптивные реакции таких растений до сих пор не изучено, несмотря на наличие сведений о функциональном взаимодействии БС и СК [12].

Для выяснения возможной роли СК в проявлении протекторного действия БС сравнивали влияние ЭК и его 2-моносалицилата (МСЭК) на солеустойчивость растений *A. thaliana* дикого типа и салицилатдефицитных трансформантов *NahG* и состояние их ферментативной антиоксидантной системы. Помимо получения доказательств участия СК в повышении солеустойчивости под действием БС, такие результаты могут быть полезными при оценке возможности практического применения новых синтетических производных БС, в частности МСЭК, для повышения устойчивости растений к засолению.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментов использовали 5-недельные растения *Arabidopsis thaliana* дикого типа (Col-0) и трансформированные геном *NahG*, кодирующим салицилатгидроксилазу (КФ 1.14.13.1) бактерии *Pseudomonas putida* [23]. Содержание СК в клетках листьев трансформантов *NahG* на порядок ниже, чем у растений дикого типа [23]. Семена растений *NahG* были предоставлены проф. Ж. М. Нейгаузом (Университет Нашатель, Швейцария). Растения выращивали в водной культуре на среде Хогланда с модификациями при темпе-

ратуре 22/16°C (день/ночь) [24], освещении 6000 лк и фотопериоде 10 ч. В таких условиях растения накапливали достаточную биомассу розетки, но еще не переходили к цветению [25].

ЭК или МСЭК, синтезированные в лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, вносили в питательную среду и инкубировали на ней растения в течение 24 ч. После этого их переносили на питательную смесь без исследуемых БС, но с добавлением 175 мМ NaCl. После 24-часовой инкубации растений в присутствии хлорида натрия среду заменяли на обычную. Ранее было установлено, что такое воздействие соли не приводило к потере тургора, но вызывало увеличение водного дефицита, усиление ПОЛ и снижение содержания хлорофилла в листьях при дальнейшем росте растений на обычной среде [25].

В первой серии экспериментов с использованием ЭК и МСЭК в концентрациях 0,01, 0,1 и 1 мкМ изучали концентрационную зависимость влияния этих соединений на солеустойчивость растений *A. thaliana* дикого типа. В качестве критериев стресс-протекторного действия БС использовали изменения водного дефицита, интенсивности ПОЛ и содержания фотосинтетических пигментов в листьях после воздействия на растения 175 мМ NaCl в течение 24 ч.

Во второй серии опытов использовали оптимальные концентрации ЭК и МСЭК для сравнения их влияния на солеустойчивость растений дикого типа и трансформантов *NahG*. В этой серии экспериментов определяли активность антиоксидантных ферментов, а также содержание продуктов ПОЛ и фотосинтетических пигментов в листьях. Для анализов использовали развитые розеточные листья 5–6 ярусов. Все показатели за исключением содержания фотосинтетических пигментов определяли сразу после окончания 24-часового стрессового воздействия.

Водный дефицит оценивали по насыщению интактных листьев водой в течение 12–14 ч и выражали в процентах от общего содержания воды в состоянии полного насыщения [25].

Для определения продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (преимущественно МДА), листья гомогенизировали в реакционной среде, содержащей 0,25% 2-тиобарбитуровую кислоту в 10% ТХУ, гомогенат помещали в кипящую водяную баню на 30 мин. Затем пробы охлаждали и центрифугировали 15 мин при 10000 g на центрифуге MPW 350R (MedInstruments, Польша). Оптическую плотность надосадочной жидкости определяли при 532 нм (максимум светопоглощения МДА) и 600 нм (для поправки на неспецифическое светопоглощение) [26]. Содержание МДА выражали в мкмоль/г сухой массы. Сухую массу растений определяли путем высушивания при температуре (103 ± 1°C) до постоянной массы.

Содержание фотосинтетических пигментов анализировали через 2 суток после действия соли на растения. Как показано ранее [22, 25], именно через такое время после стрессового воздействия наблюдалось наиболее заметное снижение содержания хлорофилла в листьях. Пигменты экстрагировали из листьев этанолом и определяли их содержание спектрофотометрическим методом [27]. Их количество выражали в мг/г сухой массы.

Активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1), каталазы (КАТ, КФ 1.11.1.6) и гваяколпероксидазы (ГПО, КФ 1.11.1.7) – определяли методами, подробно описанными ранее [22]. Свежесрезанные листья гомогенизировали на холоде в 0,15 М К, Na-фосфатном буфере, pH 7,6, содержащем 0,1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотрейтола. Гомогенат центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин при температуре 2–4°C. Супернатант использовали для анализа. Активность СОД определяли при pH 7,6 по методу, основанному на способности фермента конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные анионы, образующиеся вследствие аэробного взаимодействия НАДН и феназинметосульфата. Ее выражали в условных единицах/г сухой массы мин. Активность каталазы определяли по количеству пероксида водорода, разложившегося за единицу времени, и выражали в ммоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/г сухой массы мин. При определении активности ГПО в качестве донора водорода использовали гваякол, а в качестве субстрата – пероксид водорода. Активность фермента выражали в условных единицах/г сухой массы мин.

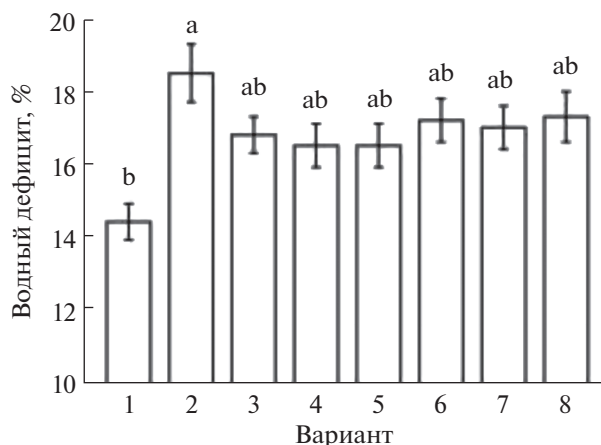
Эксперименты проводили в 3-кратной биологической повторности; каждый опыт независимо воспроизводили 3 раза. На рисунках и в таблице приведены средние величины и их стандартные ошибки. Достоверность различий определяли по *t*-критерию Стьюдента. Кроме специально оговоренных случаев, обсуждаются различия, достоверные при  $P \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Концентрационная зависимость стресс-протекторного влияния ЭК и МСЭК на растения Arabidopsis thaliana дикого типа*

Воздействие NaCl вызывало увеличение водного дефицита листьев (рис. 1). Предварительная обработка как ЭК, так и МСЭК в разных концентрациях смягчала его проявление. Однако влияние изучаемых БС на этот показатель проявлялось на уровне тенденции и было значимым лишь при  $P \leq 0,1$ . В связи с этим различий в эффектах ЭК и МСЭК зафиксировать не удалось.

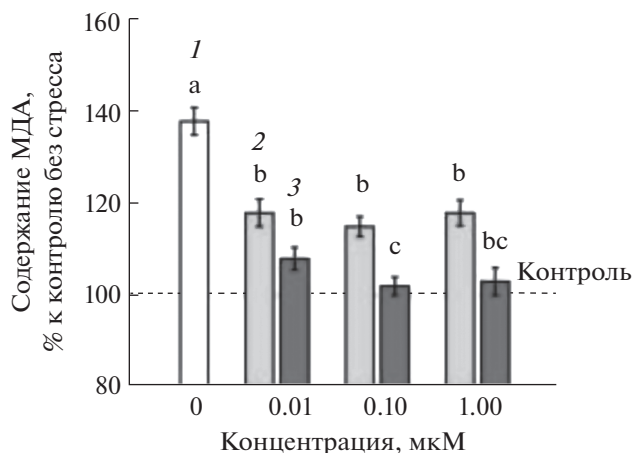
После 24 ч воздействия 175 мМ NaCl содержание продуктов ПОЛ в листьях увеличивалось почти на 40% (рис. 2). Обработка ЭК во всех трех исследуе-



**Рис. 1.** Водный дефицит листьев *A. thaliana* дикого типа (Col-0) при обработке ЭК, МСЭК в условиях солевого стресса (175 мМ NaCl, 24 ч). 1 – контроль; 2 – NaCl (175 мМ); 3 – NaCl (175 мМ) + ЭК (0.01 мкМ); 4 – NaCl (175 мМ) + ЭК (0.10 мкМ); 5 – NaCl (175 мМ) + ЭК (1.00 мкМ); 6 – NaCl (175 мМ) + МСЭК (0.01 мкМ); 7 – NaCl (175 мМ) + МСЭК (0.10 мкМ); 8 – NaCl (175 мМ) + МСЭК (1.00 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ .

мых концентрациях частично снимала проявление окислительного стресса, вызываемое действием хлорида натрия. Протекторное действие МСЭК было более эффективным: это соединение в минимальной концентрации (0.01 мкМ) частично, а в более высоких (0.1 и 1 мкМ) почти полностью устранило повышение содержания МДА в листьях, вызываемое солевым стрессом (рис. 2).

Инкубация растений на среде с добавлением хлорида натрия вызывала не только окислительный стресс в листьях, но и существенно (на 27%) уменьшала содержание хлорофиллов *a* и *b* (табл. 1). Обработка растений ЭК в концентрации 0.1 мкМ способствовала сохранению пула хлорофиллов.



**Рис. 2.** Влияние ЭК и МСЭК на содержание МДА (% к контролю без стресса) в листьях *A. thaliana* дикого типа после 24-часового воздействия 175 мМ NaCl. 1 – без обработки ЭК и МСЭК; 2 – ЭК; 3 – МСЭК. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ .

При действии ЭК в концентрациях 0.01 и 1 мкМ его защитные эффекты не были статистически значимыми при  $P \leq 0.05$ . Стабилизирующее влияние МСЭК на пул хлорофиллов было более существенным и проявлялось во всем диапазоне исследуемых концентраций (табл. 1). Наибольший протекторный эффект обнаружили при использовании МСЭК в концентрации 0.1 мкМ.

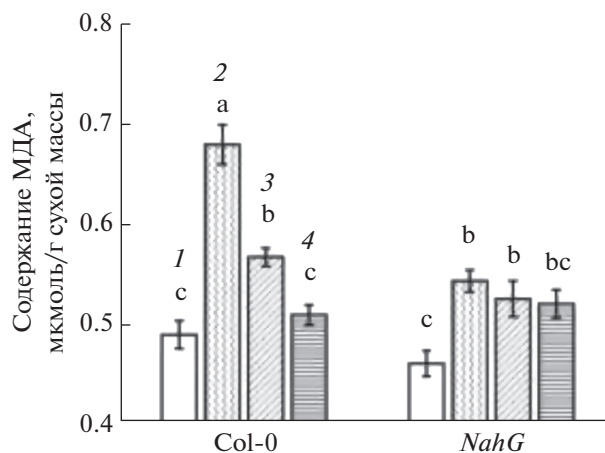
Содержание каротиноидов в листьях после воздействия 175 мМ NaCl существенно не изменялось. Обработка ЭК и МСЭК в концентрации 0.1 мкМ вызывала значимое увеличение содержания каротиноидов в листьях в условиях солевого стресса, эффект других концентраций изучаемых БС проявлялся на уровне тенденции (табл. 1).

В целом можно констатировать, что наиболее заметный защитный эффект ЭК и его моносали-

**Таблица 1.** Влияние различных концентраций ЭК и МСЭК на содержание фотосинтетических пигментов (мг/г сухой массы) в листьях *A. thaliana* (Col-0) после 24-часового воздействия NaCl

Вариант	Хлорофилл <i>a</i>	Хлорофилл <i>b</i>	Хлорофиллы <i>a + b</i>	Каротиноиды
Контроль	11.17 ± 0.19 <sup>a*</sup>	5.49 ± 0.07 <sup>a</sup>	16.66 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.06 <sup>b</sup>
NaCl (175 мМ)	8.16 ± 0.14 <sup>c</sup>	4.02 ± 0.06 <sup>c</sup>	12.18 ± 0.15 <sup>d</sup>	2.02 ± 0.06 <sup>b</sup>
NaCl (175 мМ) + ЭК (0.01 мкМ)	8.48 ± 0.16 <sup>c</sup>	4.29 ± 0.07 <sup>c</sup>	12.77 ± 0.17 <sup>d</sup>	2.26 ± 0.08 <sup>ab</sup>
NaCl (175 мМ) + ЭК (0.10 мкМ)	9.22 ± 0.16 <sup>b</sup>	4.65 ± 0.08 <sup>bc</sup>	13.87 ± 0.18 <sup>c</sup>	2.43 ± 0.07 <sup>a</sup>
NaCl (175 мМ) + ЭК (1.00 мкМ)	8.78 ± 0.14 <sup>c</sup>	4.08 ± 0.08 <sup>c</sup>	12.86 ± 0.16 <sup>cd</sup>	2.35 ± 0.10 <sup>ab</sup>
NaCl (175 мМ) + МСЭК (0.01 мкМ)	9.12 ± 0.18 <sup>bc</sup>	4.64 ± 0.10 <sup>bc</sup>	13.76 ± 0.21 <sup>c</sup>	2.17 ± 0.08 <sup>ab</sup>
NaCl (175 мМ) + МСЭК (0.10 мкМ)	10.06 ± 0.16 <sup>b</sup>	5.33 ± 0.07 <sup>a</sup>	15.39 ± 0.17 <sup>b</sup>	2.40 ± 0.08 <sup>a</sup>
NaCl (175 мМ) + МСЭК (1.00 мкМ)	9.37 ± 0.19 <sup>bc</sup>	4.88 ± 0.09 <sup>b</sup>	14.25 ± 0.21 <sup>c</sup>	2.35 ± 0.10 <sup>ab</sup>

Примечание. \*Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ .



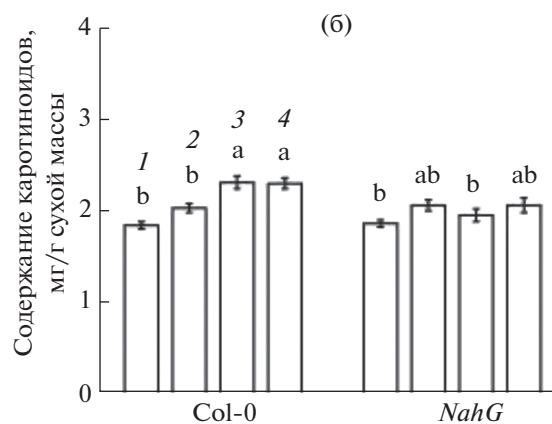
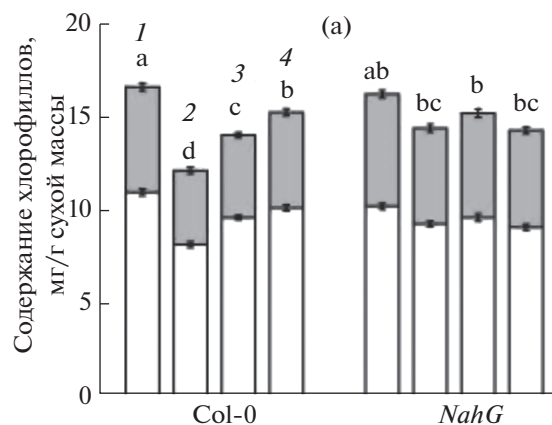
**Рис. 3.** Содержание МДА в листьях *A. thaliana* дикого типа (Col-0) и салицилатдефицитных трансформантов (*NahG*) после 24-часового воздействия 175 мМ NaCl. 1 – контроль; 2 – NaCl (175 мМ); 3 – NaCl (175 мМ) + ЭК (0.10 мкМ); 4 – NaCl (175 мМ) + МСЭК (0.10 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ .

цилата проявлялся в концентрации 0.1 мкМ. Эту концентрацию использовали в дальнейших экспериментах по сравнению влияния ЭК и МСЭК на солеустойчивость *A. thaliana* дикого типа и салицилатдефицитных трансформантов и функционирование антиоксидантной системы растений двух генотипов.

#### Влияние ЭК и МСЭК на солеустойчивость салицилатдефицитного трансформанта *NahG* растений *Arabidopsis thaliana*

Растения салицилатдефицитного трансформанта *NahG* проявляли более высокую базовую устойчивость к действию 175 мМ NaCl по сравнению с растениями дикого типа (рис. 3). Так, если у растений дикого типа под влиянием стрессора содержание МДА возрастало почти на 40%, то у растений *NahG* оно увеличивалось лишь на 18%. Суммарное содержание хлорофиллов у растений дикого типа после солевого воздействия снижалось почти на треть, в то время как у трансформанта такое снижение составило всего 12% (рис. 4). Содержание каротиноидов при солевом стрессе у растений обоих генотипов существенно не изменялось.

Обработка ЭК и МСЭК, препятствуя развитию окислительного стресса и способствуя сохранению пула хлорофиллов в условиях действия NaCl у растений дикого типа, почти не оказывала такого влияния на растения *NahG* (рис. 3, 4). Под влиянием ЭК и МСЭК приблизительно в одинаковой степени повышалось содержание каротиноидов в листьях растений *A. thaliana* Col-0. При



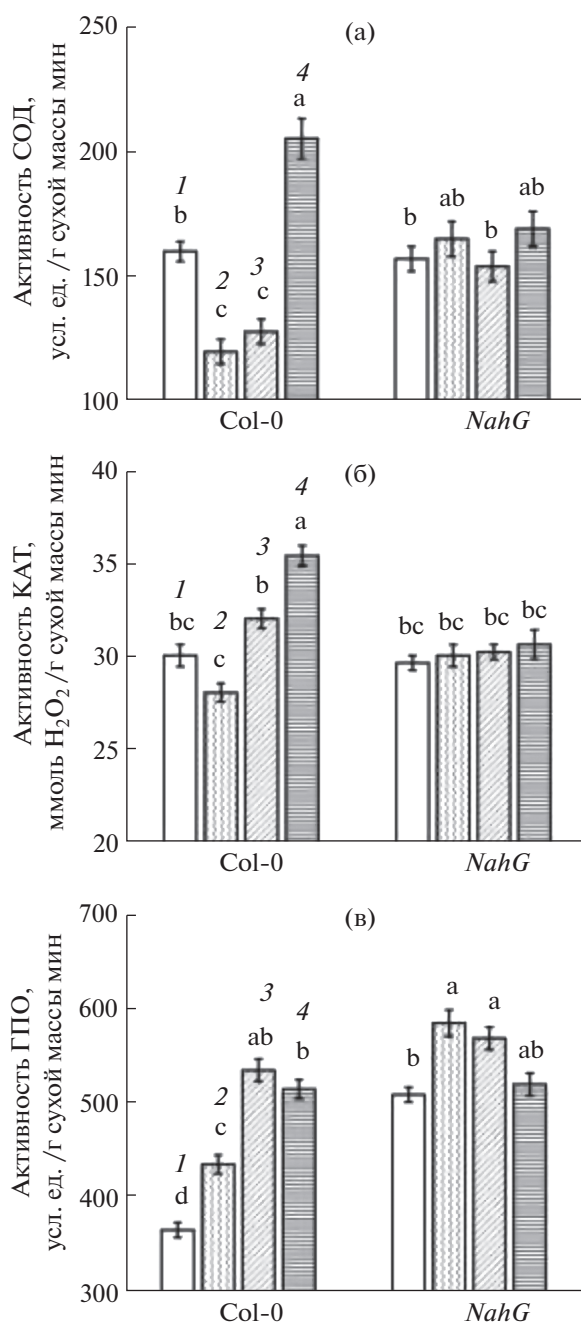
**Рис. 4.** Содержание хлорофиллов (а) и каротиноидов (б) в листьях *A. thaliana* дикого типа (Col-0) и салицилатдефицитных трансформантов (*NahG*) при действии NaCl и brassinостероидов. 1 – контроль; 2 – NaCl (175 мМ); 3 – NaCl (175 мМ) + ЭК (0.10 мкМ); 4 – NaCl (175 мМ) + МСЭК (0.10 мкМ). (а) светлая часть столбиков – хлорофилл а, темная – хлорофилл b. Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ .

этом обработка исследуемыми БС не влияла на содержание каротиноидов у салицилатдефицитных растений (рис. 4). Таким образом, можно констатировать отсутствие существенного влияния как ЭК, так и его моносалицилата на солеустойчивость трансформанта *NahG*.

#### Влияние ЭК и МСЭК на ферментативную антиоксидантную систему растений при солевом стрессе

После воздействия NaCl у растений *A. thaliana* дикого типа существенно снижалась активность СОД (рис. 5а). У салицилатдефицитного трансформанта активность фермента сохранялась на уровне контрольных значений. Обработка ЭК не влияла на активность СОД у растений дикого типа. В то же время воздействие МСЭК приводило к существенному повышению активности фермента у





**Рис. 5.** Активность СОД (а), КАТ (б) и ГПО (в) в листьях *A. thaliana* дикого типа (Col-0) и салицилатдефицитных трансформантов (*NahG*) при действии NaCl и брассиностероидов. 1 – контроль; 2 – NaCl (175 мМ); 3 – NaCl (175 мМ) + ЭК (0.10 мкМ); 4 – NaCl (175 мМ) + МСЭК (0.10 мкМ). Одинаковыми латинскими буквами обозначены величины, различия между которыми не достоверны при  $P \leq 0.05$ .

этих растений в условиях солевого стресса (рис. 5а). Обработка ЭК и МСЭК не вызвала изменений активности СОД в листьях трансформантов *NahG*.

Активность КАТ после стрессового воздействия NaCl у растений обоих исследуемых генотипов существенно не изменялась (рис. 5б). У

растений дикого типа под влиянием ЭК активность КАТ не изменялась, в то же время обработка МСЭК вызвала ее повышение. Исследуемые БС не оказывали влияния на активность КАТ у салицилатдефицитных растений *NahG*.

Базовая активность ГПО у трансформантов *NahG* была значительно выше, чем у растений Col-0 (рис. 5в). В ответ на солевой стресс активность фермента повышалась у растений обоих генотипов. Предварительная обработка растений дикого типа ЭК и МСЭК приблизительно в одинаковой степени способствовала дополнительному повышению активности ГПО после воздействия NaCl (рис. 5в). В то же время у растений *NahG* при обработке ЭК перед солевым стрессом активность ГПО не отличалась от таковой в варианте с действием только NaCl, а обработка МСЭК вызвала даже тенденцию к снижению активности фермента, хотя этот эффект не был значимым при  $P \leq 0.05$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе получены экспериментальные данные, указывающие на вовлечение СК в процесс повышения солеустойчивости растений *A. thaliana* одним из распространенных БС – ЭК. О значении СК для реализации стресс-протекторных эффектов БС, в частности, свидетельствует отсутствие заметного защитного действия ЭК и МСЭК на растения трансформанты *NahG*, экспрессирующие бактериальную салицилатгидроксилазу и не способные к накоплению СК. Так, если у растений *A. thaliana* дикого типа обработка ЭК, и особенно МСЭК, смягчала проявление процесса ПОЛ и деградации хлорофилла при солевом стрессе, то у трансформантов *NahG* защитные эффекты обоих БС не проявились (рис. 3, 4). Также, в отличие от растений дикого типа, у трансформантов *NahG* под влиянием обработки ЭК и МСЭК не обнаружено повышения ни одного из трех изученных антиоксидантных ферментов (рис. 5).

Как уже отмечалось, в литературе имеются данные о вовлечении ключевого белка салицилатного сигналинга NPR1 в проявление эффектов БС [12]. Этот белок в мономерной форме активирует транскрипционные факторы TGA, контролирующие экспрессию салицилат-чувствительных генов. У мутантов *npr1-1* не происходило повышения солеустойчивости в ответ на обработку экзогенным 24-эпибрассинолидом [12]. Эти данные указывают на возможную роль белка NPR1 в передаче сигнала БС, однако они не являются доказательством непосредственного участия СК в реализации эффектов БС. Обнаруженное в нашей работе отсутствие выраженного стресс-протекторного влияния БС на салицилатдефицитные растения *NahG* можно рассматривать как аргумент в пользу вовлечения эндогенной СК в реализацию

эффектов БС. Примечательно, что у трансформантов *NahG* не происходило изменений активности антиоксидантных ферментов, содержания МДА и хлорофиллов при обработке не только ЭК, но и МСЭК. Такой результат представляется нам достаточно закономерным, поскольку МСЭК использовался в довольно низкой концентрации (0.1 мкМ). В литературе имеются данные о том, что у растений *A. thaliana NahG* не происходило усиления экспрессии гена *PR1*, кодирующего ключевой белок, синтезирующийся под влиянием СК, даже при обработке 5 мМ СК, также СК в указанной концентрации не повышала устойчивость салицилатдефицитных трансформантов к заражению патогенным грибом *Botrytis cinerea* [28]. Отсутствие индукции синтеза белка PR1 при действии экзогенной СК отмечено и в более поздних исследованиях [29]. Высокая активность салицилатгидроксилазы исключает накопление СК растениями *NahG* даже при ее экзогенном введении в концентрациях, существенно превышающих физиологические.

Отдельного пояснения требует проявившаяся в наших экспериментах повышенная солеустойчивость салицилатдефицитных трансформантов *NahG*. Такие эффекты наблюдались и в работе, выполненной ранее с использованием более высокой концентрации NaCl – 200 мМ [22]. Также показана способность растений *NahG* к эффективной стабилизации содержания активных форм кислорода при действии не только солевого стресса, но и экзогенного пероксида водорода [22]. В работе Нао и соавт. [30] сообщается о повышенном соотношении между восстановленным и окисленным глутатионом у растений *NahG* в условиях умеренного солевого стресса. Одной из причин повышенной устойчивости растений *NahG* к окислительному стрессу может быть высокая активность ГПО. В свою очередь, условием для ее поддержания у этих растений может быть высокое содержание катехола [31], способного выступать в пероксидазных реакциях в роли восстановителя H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В частности, показано положительное влияние экзогенного катехола на прорастание семян *A. thaliana* в условиях солевого стресса [32]. С другой стороны, показано, что растения *NahG*, не способные к накоплению СК, но аккумулирующие значительное количество катехола, отличались повышенной устойчивостью к токсическому действию алюминия [19] и кадмия [33]. Тем не менее, при определенных условиях, например, при воздействии высоких концентраций NaCl (400 мМ) устойчивость растений *NahG* может быть ниже резистентности растений дикого типа [21]. При этом известно, что экзогенная СК может эффективно усиливать адаптацию растений к засолению, хотя ее протекторные эффекты обычно проявляются в довольно узком концентрационном диапазоне. Например, пока-

зано, что обработка растений *A. thaliana* дикого типа 10 мкМ СК повышала их солеустойчивость, в то время как под действием 200 мкМ она снижалась [34].

Есть основания полагать, что наличие остатка СК в конъюгате ЭК (МСЭК) при его попадании в клетки растений за счет гидролиза эфирной связи создает эффект “мягкого” повышения содержания СК и условия для комбинированного синергического действия СК и ЭК. Естественно, это предположение требует специальной экспериментальной проверки. Однако сравнение влияния ЭК и МСЭК на солеустойчивость растений *A. thaliana* дикого типа показывает значительно более эффективное стресс-протекторное действие последнего (рис. 3, 4). Особенностью действия МСЭК оказалось повышение под его влиянием активности СОД в листьях *A. thaliana* дикого типа, в то время как ЭК подобного эффекта не проявлял (рис. 5а). Следует отметить, что выраженная способность повышать активность СОД при солевом стрессе на растениях разных видов показана для СК [35], остаток которой содержится в МСЭК. Как известно, СОД является единственным антиоксидантным ферментом, обезвреживающим супероксидный анион-радикал, в связи с чем этот фермент относят к “первому эшелону” антиоксидантной защиты [35]. Примечательно также, что обработка МСЭК, но не обычным ЭК, также повышала активность КАТ у растений Col-0 при солевом стрессе (рис. 5б). Вероятно, одновременное повышение СОД и КАТ способствовало сбалансированному обезвреживанию как супероксидного анион-радикала, так и пероксида водорода, образующегося в реакции с участием СОД. Также исследуемые БС способствовали повышению активности ГПО у растений дикого типа, хотя в этом случае действие ЭК и МСЭК значительно не отличалось (рис. 5в). Изменение активности антиоксидантных ферментов при солевом стрессе под влиянием БС зарегистрировано у растений различных видов [4, 36, 37]. На растениях рапса показано, что обработка ЭК, в отличие от действия 24-эпибрассинолида, вызывала повышение активности пероксидазы при воздействии 150 мМ NaCl, а активность СОД при этом повышалась только под влиянием 24-эпибрассинолида [4]. С другой стороны, обработка 24-эпибрассинолидом и 28-гомобрассинолидом не оказывала влияния на активность СОД и пероксидазы у растений картофеля, подвергнутых действию 100 мМ NaCl. При этом предстрессовое воздействие БС способствовало усилению накопления пролина в условиях засоления [3]. По-видимому, БС, в зависимости от химического строения, видовых особенностей растений и других факторов, могут индуцировать различные компоненты антиоксидантной защиты, находящиеся между собой в функциональном взаимодействии. Так, известно, что пролин яв-

ляется низкомолекулярным компонентом антиоксидантной системы и может находиться в реципрокных отношениях с ее ферментативными компонентами, в первую очередь, с СОД [38, 39].

Еще одним эффектом ЭК и МСЭК, обуславливающим предотвращение развития окислительного стресса, является усиление накопления каротиноидов в листьях растений дикого типа (рис. 4). Известно, что каротиноиды обеспечивают гашение синглетного кислорода и инактивируют пероксидные радикалы, которые генерируются при избыточном возбуждении хлорофилла [40].

Таким образом, в целом исследуемые БС – ЭК и МСЭК – способствовали поддержанию редокс-гомеостаза и сохранению пула фотосинтетических пигментов у растений *A. thaliana* в условиях солевого стресса. При этом действие МСЭК было более эффективным. Этот факт, а также отсутствие положительного влияния исследуемых БС на показатели редокс-гомеостаза и солеустойчивость трансформантов *NahG*, не способных накапливать СК, указывают на ее роль в реализации стресс-протекторного действия БС. При этом конъюгат ЭК, содержащий остаток СК (МСЭК) и превосходящий по интенсивности защитного действия ЭК, можно рассматривать в качестве физиологически активного вещества со стресс-протекторными эффектами, перспективного для практического применения.

Авторы благодарны к.б.н. Т. О. Ястреб за ценные методические консультации.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bajguz A. Brassinosteroids – occurrence and chemical structures in plants // *Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone* / Eds. Hayat S., Ahmad A. Springer Science+Business Media B.V. 2011. P. 1. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0189-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0189-2_1)
2. 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>
3. Efimova M.V., Khrpach V.A., Boyko E.V., Malofiy M.K., Kolomeychuk L.V., Murgan O.K., Vidershpan A.N., Mukhamatdinova E.A., Kuznetsov V.I. The priming of potato plants induced by brassinosteroids reduces oxidative stress and increases salt tolerance // *Dokl. Biol. Sci.* 2018. V. 478. P. 33. <https://doi.org/10.1134/S0012496618010106>
4. Kolomeichuk L.V., Danilova E.D., Khrpach V.A., Zhabinnyi V.N., Kuznetsov V.I., Efimova M.V. Ability of lactone- and ketone-containing brassinosteroids to induce priming in rapeseed plants to salt stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 499. <https://doi.org/10.1134/S1021443721020084>
5. Efimova M.V., Hasan J.A.K., Kholodova V.P., Kuznetsov V.V., Savchuk A.L., Litvinovskaya R.P., Khrpach V.A. Physiological mechanisms of enhancing salt tolerance of oilseed rape plants with brassinosteroids // *Russ. J. Plant Physiol.* 2014. V. 61. P. 733. <https://doi.org/10.1134/S1021443714060053>
6. Nawaz F., Naeem M., Zulfiqar B., Akram A., Ashraf M.Y., Raheel M., Shabbir R.N., Hussain R.A., Anwar I., Aurangzaib M. Understanding brassinosteroid-regulated mechanisms to improve stress tolerance in plants: a critical review // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017. V. 24. P. 15959. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9163-6>
7. Karpets Yu.V., Kolupaev Yu.E. Participation of nitric oxide in 24-epibrassinolide-induced heat resistance of wheat coleoptiles: functional interactions of nitric oxide with reactive oxygen species and Ca ions // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. V. 65. P. 177. <https://doi.org/10.1134/S1021443718010053>
8. Ahammed G.J., Li X., Liu A., Chen S. Brassinosteroids in plant tolerance to abiotic stress // *J. Plant Growth Regul.* 2020. V. 39. P. 1451. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10098-0>
9. Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses // *Plant Physiol. Biochem.* 2009. V. 47. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.10.002>
10. Kudryakova N.V., Efimova M.V., Danilova M.N., Zubkova N.K., Khrpach V.A., Kuznetsov V.V., Kulaeva O.N. Exogenous brassinosteroids activate the expression of the genes of cytokinin signaling pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* // *Plant Growth Regul.* 2013. V. 70. P. 61. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9778-z>
11. Allagulova C.R., Maslennikova D.R., Avalbaev A.M., Fedorova K.A., Yuldashev R.A., Shakirova F.M. Influence of 24-epibrassinolide on growth of wheat plants and the content of dehydrins under cadmium stress // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 465. <https://doi.org/10.1134/S1021443715040020>
12. Divi U.K., Rahman T., Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways // *BMC Plant Biology.* 2010. V. 10. P. 151. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-151>
13. Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease // *Ann. Rev. Phytopathol.* 2009. V. 47. P. 177. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
14. Ahanger M.A., Ashraf M., Bajguz A., Ahmad P. Brassinosteroids regulate growth in plants under stressful environments and crosstalk with other potential phytohormones // *J. Plant Growth Regul.* 2018. V. 37. P. 1007. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9855-2>
15. De Vleeschauwer D., Van Buyten E., Satoh K., Balidion J., Mauleon R., Choi I.R., Vera-Cruz C., Kikuchi S., Höfte M. Brassinosteroids antagonize gibberellin- and salicylate-mediated root immunity in rice // *Plant Physiol.* 2012. V. 158. P. 1833. <https://doi.org/10.1104/pp.112.193672>
16. Kohli S.K., Handa N., Sharma A., Gautam V., Arora S., Bhardwaj R., Alyemeni M.N., Wijaya L., Ahmad P. Combined effect of 24-epibrassinolide and salicylic acid mitigates lead (Pb) toxicity by modulating various



- metabolites in *Brassica juncea* L. seedlings // Protoplasma. 2018. V. 255. P. 11.  
<https://doi.org/10.1007/s00709-017-1124-x>
17. Hayat S., Maheshwari P., Wani A.S., Irfan M., Alyemeni M.N., Ahmad A. Comparative effect of 28 homobrassinolide and salicylic acid in the amelioration of NaCl stress in *Brassica juncea* L. // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 53. P. 61.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.011>
  18. Litvinovskaya R.P., Vayner A.A., Zhylitskaya H.A., Kolupaev Yu.E., Savachka A.P., Khripach V.A. Synthesis and stress-protective action on plants of brassinosteroid conjugates with salicylic acid // Chem. Nat. Compd. 2016. V. 52. P. 452.  
<https://doi.org/10.1007/s10600-016-1671-y>
  19. Guo D.Y., Zhao S.Y., Huang L.L., Ma C.Y., Hao L. Aluminum tolerance in *Arabidopsis thaliana* as affected by endogenous salicylic acid // Biol. Plant. 2014. V. 58. P. 725.  
<https://doi.org/10.1007/s10535-014-0439-0>
  20. Guo B., Liu C., Liang Y., Li N., Fu Q. Salicylic acid signals plant defence against cadmium toxicity // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 2960.  
<https://doi.org/10.3390/ijms20122960>
  21. Cao Y., Zhan Z. W., Xue L. W., Du J. B., Shang J., Xu F., Yuan S., Lin H.H. Lack of salicylic acid in *Arabidopsis* protects plants against moderate salt stress // Z. Naturforsch. C. J. Biosci. 2009. V. 64. P. 231.  
<https://doi.org/10.1515/znc-2009-3-414>
  22. Yastreb T.O., Kolupaev Yu.E., Lugovaya A.A., Dmitriev A.P. Hydrogen peroxide-induced salt tolerance in the *Arabidopsis* salicylate-deficient transformants *NahG* // Appl. Biochem. Microbiol. 2017. V. 53. P. 719.  
<https://doi.org/10.1134/S000368381706014X>
  23. Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negrotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryals J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance // Science. 1993. V. 261. P. 754.  
<https://doi.org/10.1126/science.261.5122.754>
  24. Gibeaut D.M., Hulett J., Cramer G.R.J., Seemann R. Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions // Plant Physiol. 1997. V. 115. P. 317.  
<https://doi.org/10.1104/pp.115.2.317>
  25. Yastreb T.O., Kolupaev Yu.E., Shkliarevskiy M.A., Dmitriev A.P. Participation of jasmonate signaling components in the development of *Arabidopsis thaliana*'s salt resistance induced by H<sub>2</sub>S and NO donors // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 827.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443720050192>
  26. Fazlieva E.R., Kiseleva I.S., Zhuikova T.V. Antioxidant activity in the leaves of *Melilotus albus* and *Trifolium medium* from man-made disturbed habitats in the Middle Urals under the influence of copper // Russ. J. Plant Physiol. 2012. V. 59. P. 333.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443712030065>
  27. Шлык А.А. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. О.А. Павлиновой. Москва: Наука, 1971. С. 154.
  28. Ferrari S., Plotnikova J.M., De Lorenzo G., Ausubel F.M. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4* // Plant J. 2003. V. 35. P. 193.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01794.x>
  29. Nagashima Y., Iwata Y., Ashida M., Mishiba K., Koizumi N. Exogenous salicylic acid activates two signaling arms of the unfolded protein response in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. P. 1772.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcu108>
  30. Hao L., Zhao Y., Jin D., Zhang L., Bi X.H., Chen H.X., Xu Q., Ma C.Y., Li G.Z. Salicylic acid-altering *Arabidopsis* mutants response to salt stress // Plant Soil. 2012. V. 354. P. 81.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-011-1046-x>
  31. van Wees S.C.M., Glazebrook J. Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid // Plant J. 2003. V. 33. P. 733.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01665.x>
  32. Lee S., Kim S.-G., Park C.-M. Salicylic acid promotes seed germination under high salinity by modulating antioxidant activity in *Arabidopsis* // New Phytol. 2010. V. 188. P. 626.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03378.x>
  33. Tao S., Sun L., Ma C., Li L., Li G., Hao L. Reducing basal salicylic acid enhances *Arabidopsis* tolerance to lead or cadmium // Plant Soil. 2013. V. 372. P. 309.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-013-1749-2>
  34. Yu L.-L., Liu Y., Zhu F., Geng X.-X., Yang Y., He Z.-Q., Xu F. The enhancement of salt stress tolerance by salicylic acid pretreatment in *Arabidopsis thaliana* // Biol. Plant. 2020. V. 64. P. 150.  
<https://doi.org/10.32615/bp.2019.151>
  35. Kolupaev Yu.E., Karpets Yu.V., Kabashnikova L.F. Antioxidative system of plants: cellular compartmentalization, protective and signaling functions, mechanisms of regulation (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. P. 441.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683819050089>
  36. Talaat N.B., Shawky B.T. 24-Epibrassinolide alleviates salt-induced inhibition of productivity by increasing nutrients and compatible solutes accumulation and enhancing antioxidant in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Acta Physiol. Plant. 2013. V. 35. P. 729.  
<https://doi.org/10.1007/s11738-012-1113-9>
  37. Vázquez M.N., Guerrero Y.R., de la Noval W.T., González L.M., Zullo M.A. Advances on exogenous applications of brassinosteroids and their analogs to enhance plant tolerance to salinity: A review // Austr. J. Crop Sci. 2019. V. 13. P. 115.  
<https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.01.p1404>
  38. Radyukina N.L., Kartashov A.V., Ivanov Y.V., Shevyakova N.I., Kuznetsov V.I. Functioning of defense systems in halophytes and glycophytes under progressing salinity // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 806.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443707060131>
  39. Carvalho K., Campos M.K., Domingues D.S., Pereira L.F., Vieira L.G. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic *Swingle citrumelo* // Mol. Biol. Rep. 2013. V. 40. P. 3269.  
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2402-5>
  40. Demmig-Adams B., Adams W.W., III. The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis // Trends Plant Sci. 1996. V. 1. P. 21.  
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80019-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80019-7)