

АНАЛИЗ ВОЗДЕЙСТВИЯ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА РОСТ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕНОМНЫХ ПОДХОДОВ

**В. Ю. БОНДАРЕНКО¹⁾, А. И. СОКОЛИК¹⁾, А. А. ВЕТОШКИН¹⁾,
В. Н. ЖАБИНСКИЙ²⁾, В. А. ХРИПАЧ²⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾**

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь

²⁾ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
ул. Академика В. Ф. Купревича, 5, корп. 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

Изучено воздействие значимых с точки зрения фундаментальной и прикладной биологии растений brassinостероидов (эпибрасинолид, гомобрасинолид и эпикастастерон) на ростовые процессы и архитектуру корней злаковых культур. В качестве объекта были использованы корни яровой пшеницы сорта Василиса белорусской селекции. Эксперименты проводились в оригинальной феномной установке, разработанной авторами и состоящей из прямоугольных стеклянных сосудов, в которые помещались пластиковые пластины с каналами 4 × 4 мм. Все испытанные brassinостероиды оказывали ингибирующее влияние на удлинение корней проростков пшеницы. Выявлено значительное различие дозовых зависимостей эффектов гомобрасинолида и эпикастастерона и внешнее сходство эффектов гомобрасинолида и эпикастастерона. Установлено, что отрицательный эффект ингибирования длины корней сопровождался увеличением их толщины, а также возрастанием длины корневых волосков вплоть до концентрации 10^{-10} – 10^{-9} моль/л для всех испытанных brassinостероидов. Таким образом, развит и апробирован новый подход к анализу фенотипа корня, позволяющий быстро и точно измерять интегральные ростовые реакции и изменения корневой архитектуры. С использованием данного подхода выявлены закономерности изменения фенотипических показателей корней пшеницы при воздействии brassinостероидов.

Ключевые слова: brassinостероиды; рост и развитие корней; феномные подходы; пшеница.

Образец цитирования:

Бондаренко В. Ю., Соколик А. И., Ветошкин А. А., Жабинский В. Н., Хрипач В. А., Демидчик В. В. Анализ воздействия brassinостероидов на рост корней пшеницы с использованием феномных подходов // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 1. С. 31–37.

For citation:

Bondarenko V. Y., Sokolik A. I., Vetoshkin A. A., Zhabinsky V. N., Khripach V. A., Demidchik V. V. The analysis of brassinosteroid effects on wheat root growth using phenotyping techniques. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 1. P. 31–37 (in Russ.).

Авторы:

Владислав Юрьевич Бондаренко – студент биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

Анатолий Иосифович Соколик – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Алексей Александрович Ветошкин – студент биологического факультета. Научный руководитель – А. И. Соколик.

Владимир Николаевич Жабинский – доктор химических наук, доцент; главный научный сотрудник лаборатории химии стероидов.

Владимир Александрович Хрипач – академик НАН Беларуси, доктор химических наук, профессор; заведующий лабораторией химии стероидов.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, доцент; заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета.

Authors:

Vladislav Bondarenko, student at the faculty of biology.
vlad.bondarenko.1995@list.ru

Anatoliy Sokolik, PhD (biology), docent; associate professor at the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

sokolik@bsu.by

Alexey Vetoshkin, student at the faculty of biology.

aleksey.vetoshkin@mail.ru

Vladimir Zhabinsky, doctor of science (chemistry), docent; chief researcher at the laboratory of steroid chemistry.

vz@ns.iboch.ac.by

Vladimir Khripach, academician of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (chemistry), full professor; head of the laboratory of steroid chemistry.

khripach@iboch.bas-net.by

Vadim Demidchik, doctor of science (biology), docent; head of the department of plant cell biology and bioengineering, faculty of biology.

demidchik@bsu.by

Благодарность. Работа проводилась в рамках проекта «Установление сигнальной роли экзогенного аскорбата в клетках корня высших растений» (2015–2017), № ГР 20151026 (научный руководитель – В. В. Демидчик), Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований. Работа также финансировалась Министерством образования Республики Беларусь в рамках ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограммы «Биорегуляторы растений» по заданию «Установление закономерностей воздействия брассиностероидов на корневую систему для направленного синтеза новых биорегуляторов растений» (научный руководитель – А. И. Соколик).

THE ANALYSIS OF BRASSINOSTEROID EFFECTS ON WHEAT ROOT GROWTH USING PHENOTYPING TECHNIQUES

V. Y. BONDARENKO^a, A. I. SOKOLIK^a, A. A. VETOSHKIN^a,
V. N. ZHABINSKY^b, V. A. KHRIPACH^b, V. V. DEMIDCHIK^b

^aBelarusian State University, Nezavisimosti avenue, 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus

^bInstitute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,
acad. V. F. Kuprevich street, 5, building 2, 220141, Minsk, Republic of Belarus

Corresponding author: sokolik@bsu.by

Growth reactions of wheat root on 10^{-12} – 10^{-7} mol/l 24-epibrassinolide (EB), 28-homobrassinolide (HB) and 24-epicastasteron (EC) were examined. Wheat cultivar Vasilisa was used. All tested BRs demonstrated inhibitory action on wheat root length. Dose-dependence of the effect showed complex bell-like shape. Low BR levels induced reactions similar to highest BR levels. Concentrations of 10^{-10} – 10^{-9} mol/l caused maximal inhibition of root growth rate. At the same time, root diameter significantly increased after BR treatment, as did mean roots hair length. So the volume of the root did not change significantly while their architecture was dramatically modified by BRs. Manually performed root growth measurements were compared with tests by phenotyping and demonstrated that the designed phenotyping techniques provided very accurate data. The root architecture phenotyping also yielded accurate results. Overall, phenotyping method showed that BRs inhibited wheat root growth and induced increase of root diameter and length of root hairs.

Key words: brassinosteroids; root growth and development; phenomic approach; wheat.

Acknowledgements. This study was carried out as a part of the project «Establishing signalling role of exogenous ascorbate in plant root cells» (2015–2017), state registration number 20151026, supervisor – V. V. Demidchik, funded by Belarusian republican foundation for fundamental research. It was also supported by Belarusian ministry of education and State research program scheme «Chemical technologies and materials», project «Determination of mechanisms of brassinosteroid action on plant root system for directed synthesis of new plant bio-regulators» (supervisor – A. I. Sokolik).

Введение

Брассиностероиды (БС) – класс растительных полигидроксистероидов, структурно родственных стероидным гормонам животных. Одной из особенностей БС является способность воздействовать на процессы роста и развития растения в крайне низких концентрациях (10^{-12} – 10^{-7} моль/л) [1; 2]. Проведенные исследования продемонстрировали эффективность БС в качестве регуляторов ключевых физиологических процессов у высших растений, в частности стрессовых ответов, роста корней, развития цветка и апикального доминирования [3; 4]. Кроме того, есть данные, согласно которым брассиностероиды взаимодействуют с растением путем связывания со специфическими рецепторными киназами BRI-1 на поверхности плазматической мембраны, что приводит к запуску брассиностероид-специфических сигнальных реакций и модификации метаболических и физиологических процессов [1]. Активация BRI-1-рецепторов приводит к стимуляции входа Ca^{2+} через плазматическую мембрану в клетку и росту цитоплазматической активности Ca^{2+} [2; 5]. Данная реакция обнаружена для эпикастастерона (ЭК), эпибрассинолида (ЭБ), ряда других брассиностероидов и опосредуется активацией Ca^{2+} -проницаемых катионных каналов плазматической мембраны [2; 5].

Исследования физиологической роли БС сфокусированы на надземных органах растений. Работ по анализу воздействия данных гормонов на развитие корневой системы, особенно выполненных в модельных опытах с помощью современных подходов, недостаточно, хотя корневая система растений также играет важнейшую роль в обеспечении ключевых процессов в них, а ее рост и развитие обуславливают

устойчивость к неблагоприятным факторам среды и «программируют» высокую продуктивность растений. Проблема исследования эффектов воздействия БС на корневую систему растений заключается в высокой трудоемкости и субъективности проводимых анализов, чаще всего выполняемых полностью вручную. Феномные подходы, развивающиеся в последние годы, могут существенно повысить эффективность измерений роста и развития корня, а также избавить от проблемы субъективности анализа.

Феномика – новое направление в современной биологии, решающее задачи выявления закономерностей формирования и изменения фенотипа организма при помощи неинвазивных методов измерения и биоинформационных подходов. Отличием феномики от классических низкоэффективных морфометрических измерений является автоматизация получения изображений, сохранения и обсчета данных, а также использование алгоритмов распознавания изображений.

Цель настоящей работы – выявление влияния наиболее значимых с точки зрения фундаментальной и прикладной биологии растений БС – гомобрассинолида (ГБ) и ЭК – на ростовые процессы и архитектуру корня высших растений с использованием феномных подходов. В качестве объекта исследования была взята пшеница как важнейший для сельского хозяйства вид, в то же время плохо изученный в плане воздействия БС.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовались корни проростков яровой пшеницы сорта Василиса белорусской селекции. Была сконструирована специальная установка, состоящая из прямоугольных стеклянных сосудов, в которые помещали прозрачные пластиковые пластины с каналами шириной 4×4 мм, заключенные в изготовленный из оргстекла держатель. Общий вид установки представлен на рис. 1.

Сосуды заполняли необходимым по условиям опыта раствором – разбавленной в соотношении 1 : 5 средой Кнопа (контроль) и с добавлением к контролю испытуемого БС в заданной концентрации (диапазон – от 10^{-12} до 10^{-7} моль/л). Далее, корни проростков пшеницы, выращенных в бумажных рулонах до 3–4-дневного возраста, аккуратно отделяли от бумаги и помещали в каналы пластин так, чтобы каждый корешок размещался в отдельном канале. Среда в камере и каналах периодически обновлялась с помощью подведенной тонкой пластиковой канюли в нижнюю часть каждого канала. Раствор подавался в направлении снизу вверх. Световой режим выбран в последовательности 8 ч темноты и 16 ч света.

Камеры с растениями фотографировали два раза в сутки в определенные моменты времени, затем по фотографиям определяли длину корней. Кроме этого, проводили микрофотографирование зоны корневых волосков: определяли толщину каждого корня и длину корневых волосков. Продолжительность выращивания растений в камерах феномной установки составляла 8 сут.

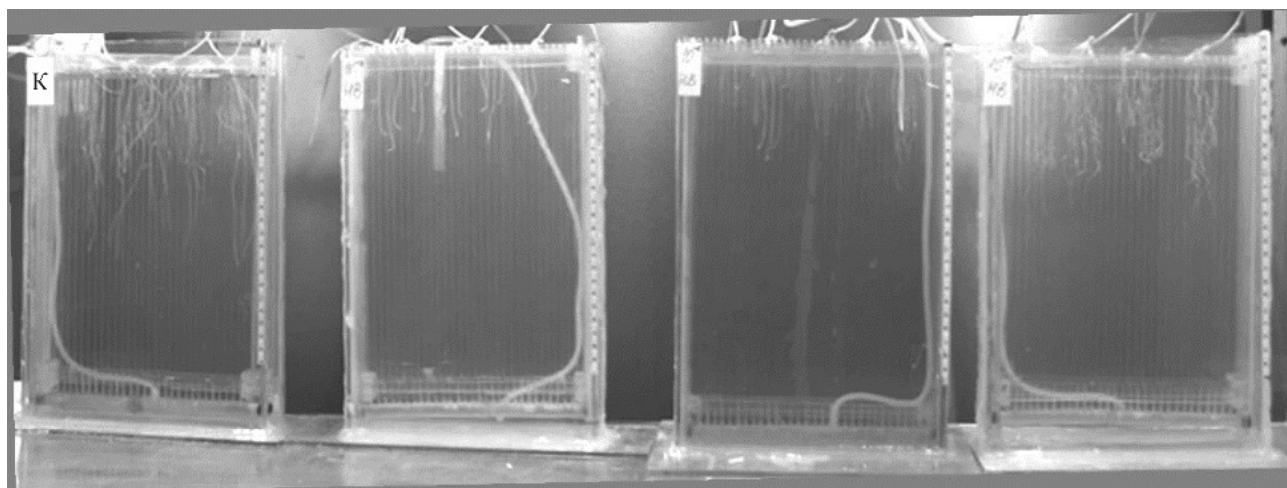


Рис. 1. Общий вид феномной установки для изучения корней проростков пшеницы. Буквой «К» отмечен вариант контроля, затем (слева – направо) расположены варианты с добавлением 10^{-7} ; 10^{-8} и 10^{-9} моль/л ГБ соответственно

Fig. 1. Setup-up for phenotyping wheat roots. «K» is control, then (from left to right) there are treatments by 10^{-7} ; 10^{-8} and 10^{-9} mol/l HB respectively

Результаты исследований и их обсуждение

Концентрационные зависимости воздействия БС на длину корней пшеницы представлены на рис. 2. Величина эффекта определялась как разность средней длины корней в контроле (0,0) в конце выращивания и в среде с БС по отношению к длине корней в контроле. Характер наблюдаемого воздействия был сложным и варьировал в зависимости от концентрации БС в среде. Можно отметить, что ЭБ (см. рис. 2, в) вызывал практически полное торможение роста при наименьшей концентрации (10^{-12} моль/л), в то время как ГБ (см. рис. 2, а) обуславливал схожий эффект при концентрациях на порядок выше. Обращает на себя внимание «выпадение» значений эффекта ингибирования при концентрации 10^{-9} – 10^{-10} моль/л для всех веществ. Примечательной особенностью воздействия ЭБ было то, что при повышении его уровня (начиная с 10^{-12} моль/л) первично сильное ингибирование сменялось менее выраженным и постепенно снижалось до величины порядка 0,25 при 10^{-7} моль/л (см. рис. 2, в).

Имеется очень мало сведений о влиянии БС на корень высших растений, полученных с использованием неинвазивных методов измерения [1; 12; 13]. Чаще всего в литературе регистрировались показатели, характеризующие надземные части растений [1], например степень раскрытия листа пшеницы, степень удлинения эпи- и гипокотилей бобов и томатов [6]. Хорошо известны мощные эффекты воздействия ЭБ на увеличение урожая, массы семян при действии на растения ячменя и пшеницы [8; 9]. Тем не менее зарегистрировано и ингибирующее воздействие БС на рост корней некоторых растений,

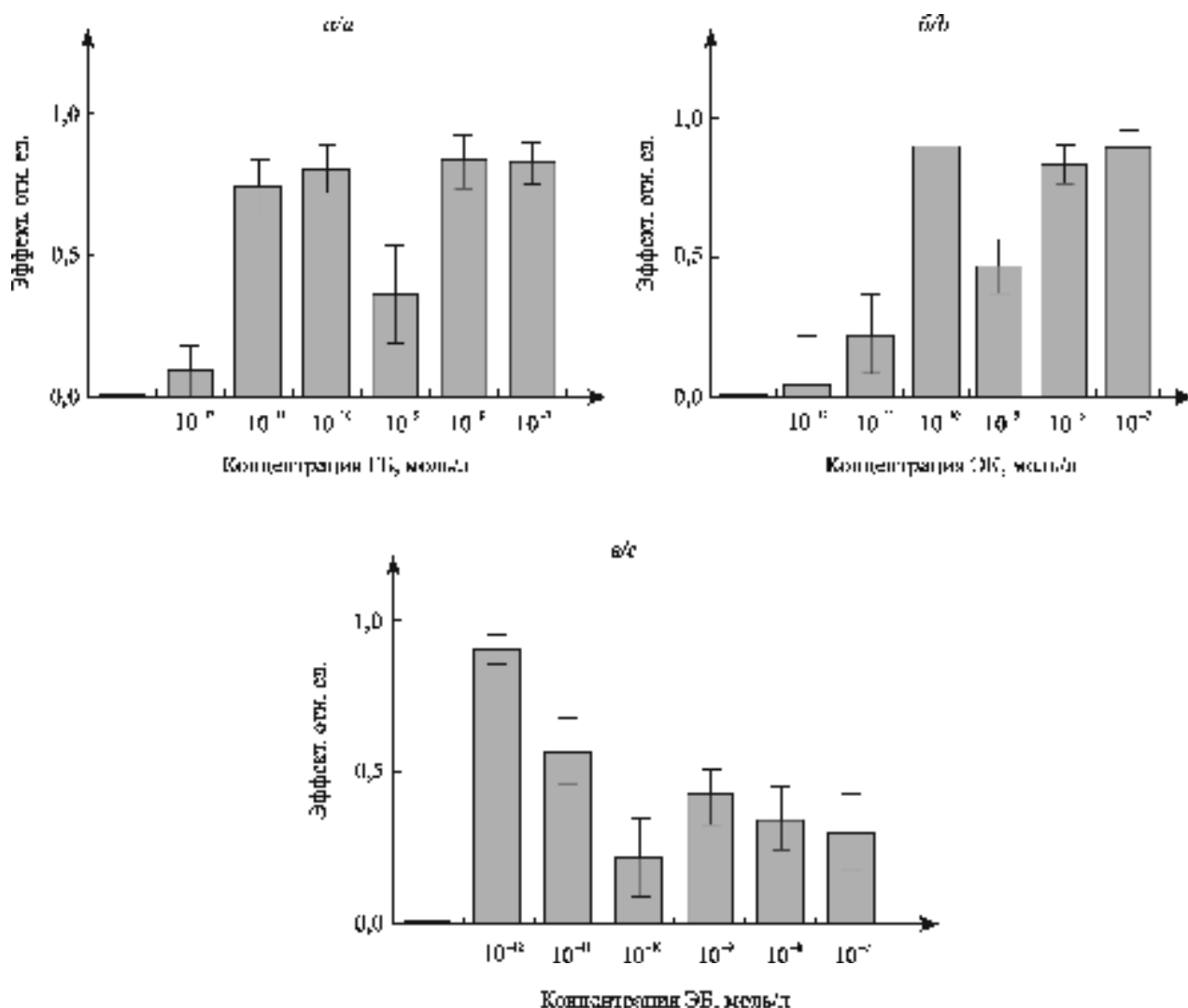


Рис. 2. Концентрационные зависимости ингибирующего действия БС на рост корней проростков пшеницы.

Относительная величина эффекта вычислялась как разность средней длины корней в контроле в конце выращивания и в среде с брассиностероидом по отношению к длине корней в контроле

Fig. 2. The mean inhibitory effect of brassinosteroids on wheat root growth. Values of inhibitory effect were calculated as difference between mean root length in control and mean root length after treatment by brassinosteroid divided by root length in control

например арабидопсиса и плаунов [7]. Имеются данные по увеличению размера корней риса при низких уровнях БС в среде [10]. У растений турецкого гороха отмечено увеличение длины корней на 25 % при воздействии 10^{-9} моль/л ЭБ [11].

Детальное исследование воздействия БС на рост корней было проведено с использованием модельных растений арабидопсиса [13]. Оно показало, что в концентрациях $5 \cdot 10^{-11}$ моль/л важнейшие БС стимулируют рост корней у растений дикого типа, а также восстанавливают нормальный рост у БС-дефицитных нокаутных мутантов [13]. Однако более высокие уровни БС подавляли рост корней растений дикого типа. Примечательно, что действие БС в этом случае было синергичным с важнейшими природными ауксинами, что дает возможность предположить наличие общей мишени для действия данных гормонов в корневой системе. Тем не менее для злаковых растений систематические исследования широкого диапазона концентраций БС пока не проводились.

Полученные данные по влиянию БС на важные показатели функциональной активности корня – его толщину и длину корневых волосков – приведены на рис. 3. Можно отметить возрастание толщины корня по мере роста концентрации всех веществ (см. рис. 3, а). Эпибрассинолид и гомобрассинолид индуцировали монотонное увеличение этого параметра, в то время как действие эпикастастерона имеет более сложный характер. Относительно небольшой положительный эффект вещества в диапазоне концентраций 10^{-12} – 10^{-8} моль/л прерывается значительным возрастанием толщины корня при концентрации препарата 10^{-10} моль/л. При повышении концентрации до 10^{-7} моль/л толщина корня вновь существенно возрастала. Отметим, что при этой концентрации все три испытанных БС вызывали практически одинаковое значительное увеличение толщины корня.

Эффекты носили иной характер в случае влияния БС на длину корневых волосков (см. рис. 3, б). Эпибрассинолид вызывал возрастание их длины по мере роста концентрации до 10^{-9} моль/л, после чего зафиксировано постепенное укорочение. Аналогичное воздействие оказывал ГБ. Действие ЭК и в этом случае имеет существенные отличия: удлинение волосков, вызванное концентрацией вещества 10^{-12} моль/л, при дальнейшем ее росте уменьшалось и сменялось укорочением (10^{-10} моль/л), которое, в свою очередь, снижалось при концентрации 10^{-8} моль/л. Затем при концентрации 10^{-7} моль/л происходило более сильное укорочение. Заметно, что начиная с концентрации 10^{-9} моль/л все испытанные БС оказывали схожее воздействие на длину корневых волосков.

Данные, приведенные на рис. 2, показывают, что ингибирующее воздействие на рост корней пшеницы оказывают все испытанные БС независимо от природы (как лактонной – ГБ и ЭБ, так и кетонной – ЭК). Следует отметить значительное различие дозовых зависимостей эффекта ГБ и ЭБ и внешнее сходство эффектов ГБ и ЭК. В целом снижение скорости роста корней можно считать отрицательным эффектом для растения, так как при этом снижается поглотительная активность корневой системы.

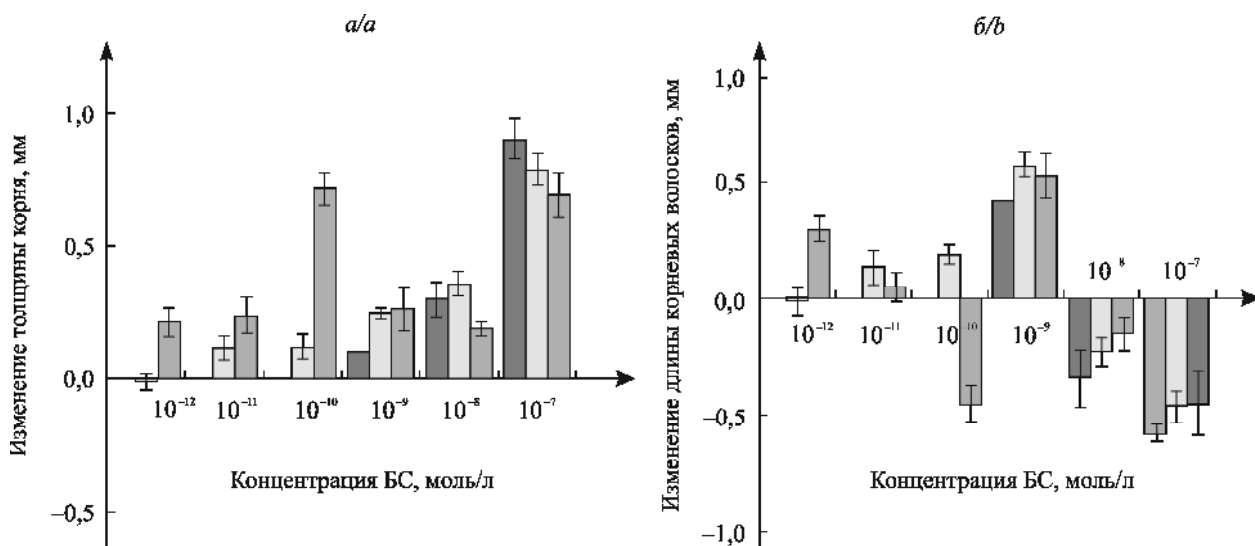


Рис. 3. Влияние ГБ, ЭБ и ЭК на толщину корней (а) и длину корневых волосков (б) проростков пшеницы.

Показатели на вертикальных осях в обоих случаях (а/а; б/б) представляют разность значений параметра в варианте опыта и контроле.
■ – ГБ; □ – ЭБ; ▨ – ЭК

Fig. 3. The effect of HB, EB and EC on wheat root diameter (a) and length of root hairs (b).

In both panels, Y-axis shows difference between test and control.
■ – HB; □ – EB; ▨ – EC

Однако, как показывают результаты рис. 3, а, этот отрицательный эффект может компенсироваться увеличением толщины корня и, что может быть более важным, возрастанием длины корневых волосков вплоть до концентрации 10^{-9} моль/л для всех испытанных БС. Ранее в литературе не были описаны обработки фитогормонами, которые достоверно вызывали значительное усиление роста корневых волосков и увеличение диаметра основного корня. Такие реакции могут быть необходимы при росте растения на участках почвы, богатых минеральными элементами и водой. Торможение роста при увеличении объема корня и его всасывательной поверхности – фундаментальное физиологическое явление, регуляция которого под действием БС может быть критически значимой в жизни высших растений, включая важнейшие сельскохозяйственные культуры, например пшеницу.

Заключение

Таким образом, можно констатировать, что действие БС на ростовые процессы корня пшеницы и его корневых волосков носит сложный многофазный характер и в значительной степени зависит от вида БС. Оно выражается в ингибировании удлинения основного корня при одновременном значительном увеличении диаметра и длины корневых волосков. Данная реакция может иметь большое физиологическое значение как в развитии ответа на стресс-факторы, так и в процессах онтогенеза. Можно заключить, что развитый метод фенотипирования корневой системы злаковых растений позволяет быстро и точно изучить интегральную реакцию растений на действие различных внешних факторов.

Библиографические ссылки

1. Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence // *Nature*. 2007. № 448 (7152). P. 497–500.
2. Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., et al. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants // *Steroids*. 2015. Vol. 97, № 5. P. 98–106.
3. Хрипач В. А., Жабинский В. Н., Лахвич Ф. А. Брассиностероиды. Минск, 1993.
4. Pereira-Netto A. B. Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health. New York, 2012.
5. Dodd A. N., Kudla J., Sanders D. The Language of Calcium Signaling // *Annual Review Plant Biol.* 2010. Vol. 61. P. 593–620.
6. Zullo M. A. T., Adam G. Brassinosteroid phytohormones – structure, bioactivity and applicatios // *Brazilian J. Plant physiol.* 2002. № 14 (3). P. 143–181.
7. Cheon J., Fujioka S., Dilkes B. P., et al. Brassinosteroids Regulate Plant Growth through Distinct Signaling Pathways in *Selaginella* and *Arabidopsis* // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, issue 12. e81938.
8. Прусакова Л. Д., Чижова С. И., Хрипач В. А. Устойчивость к полеганию и продуктивность ярового ячменя и многолетней пшеницы под влиянием брассиностероидов // *Сельскохозяйственная биология*. 1995. № 1. С. 93.
9. Takematsu T., Ikekawa N., Shida A. Increasing the yield of cereals by means of brassinolide derivatives // *US Patent*. 1988. 4,767,442.
10. Kim K. S., Sa J. G. Effects of plant growth regulator, brassinolide, on seedling growth in rice (*Oryza sativa* L.) // *Research Reports of Rural Development Administration (Suweon)*. 1989. Vol. 31 (1, Rice). P. 49–53.
11. Singh J., Nakamura S., Ota Y. Effect of epibrassinolide on gram (*Cicer arietinum*) plants grown under water stress in juvenil stage // *Indian J. of Agricult. Sciences*. 1993. Vol. 63. P. 395–397.
12. Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses // *Plant Physiol. and Biochem.* 2009. Vol. 47, № 1. P. 1–8.
13. Müssig C., Shin G.-H., Altmann T. Brassinosteroids Promote Root Growth in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133, № 3. P. 1261–1271.

References

1. Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*. 2007. No. 448 (7152). P. 497–500. DOI: 10.1038/nature05999.
2. Straltsova D., Chykun P., Subramaniam S., et al. Cation channels are involved in brassinosteroid signalling in higher plants. *Steroids*. 2015. Vol. 97, No. 5. P. 98–106.
3. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., Lakhvich F. A. Brassinosteroids. Minsk, 1993 (in Russ.).
4. Pereira-Netto A. B. Brassinosteroids: Practical Applications in Agriculture and Human Health. New York, 2012. DOI: 10.2174/97816080529811120101.
5. Dodd A. N., Kudla J., Sanders D. The Language of Calcium Signaling. *Annual Review Plant Biol.* 2010. Vol. 61. P. 593–620. DOI: 10.1146/annurev-arplant-070109-104628.
6. Zullo M. A. T., Adam G. Brassinosteroid phytohormones – structure, bioactivity and applicatios. *Brazilian J. Plant physiol.* 2002. No. 14 (3). P. 143–181.
7. Cheon J., Fujioka S., Dilkes B. P., et al. Brassinosteroids Regulate Plant Growth through Distinct Signaling Pathways in *Selaginella* and *Arabidopsis*. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, issue 12. e81938. DOI: 10.1371/journal.pone.0081938.
8. Prusakova L. D., Chizhova S. I., Khripach V. A. Resistance to lodging and yielding capacity of cereals under effect of brassinosteroids. *Agric. Biol.* 1995. No. 1. P. 93 (in Russ.).

9. Takematsu T., Ikekawa N., Shida A. Increasing the yield of cereals by means of brassinolide derivatives. *US Patent*. 1988. 4,767,442.
10. Kim K. S., Sa J. G. Effects of plant growth regulator, brassinolide, on seedling growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Research Reports of Rural Development Administration (Suweon)*. 1989. Vol. 31 (1, Rice). P. 49–53.
11. Singh J., Nakamura S., Ota Y. Effect of epibrassinolide on gram (*Cicer arietinum*) plants grown under water stress in juvenil stage. *Indian J. Agricult. Sciences*. 1993. Vol. 63. P. 395–397.
12. Bajguz A., Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. and Biochem.* 2009. Vol. 47, No. 1. P. 1–8. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002.
13. Müssig C., Shin G.-H., Altmann T. Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2003. Vol. 133, No. 3. P. 1261–1271. DOI: 10.1104/pp.103.028662.

Статья поступила в редколлегию 20.01.2017.
Received by editorial board 20.01.2017.