

Г. Н. Смоликова, Ю. В. Задворнова, Н. А. Ламан, С. С. Медведев

ВЛИЯНИЕ БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА УСТОЙЧИВОСТЬ СЕМЯН BRASSICA OLERACEA L. К УСКОРЕННОМУ СТАРЕНИЮ*

Введение

Старение семян представляет собой процесс накопления структурных и метаболических повреждений, приводящий к нарушению их функций и снижению устойчивости к неблагоприятным внешним условиям вплоть до потери жизнеспособности [1–3]. Принципиальное отличие старения семян от старения растений заключается в том, что время его наступления и скорость протекания не запрограммированы генетически, а зависят от внешних воздействий.

Большинство исследователей считают, что в основе старения семян лежит окислительный стресс [4]. Образование активных форм кислорода (АФК) может происходить в хлоропластах, митохондриях, глиоксисомах и апопласте [5]. Мощными источниками АФК являются процессы перекисного окисления липидов, приводящие к каскаду свободно-радикальных реакций и образованию разнообразных спиртов, эфиров и альдегидов.

Важным фактором, влияющим на скорость старения семян, могут быть оставшиеся в них хлорофиллы. Несмотря на то что о наличии таких «остаточных» хлорофиллов известно давно [6], в литературе очень мало уделено внимания изучению их роли в функционировании физиологически зрелых семян. Хлорофиллы являются мощными фотосенсибилизаторами, т. е. способны возбуждаться под действием света, передавать энергию возбуждения на различные акцепторы или являться источником образования АФК.

При созревании семян по мере снижения содержания воды происходит нарушение гранальной структуры хлоропластов, распад фотосистем и хлорофилл-белковых комплексов, в результате чего хлоропласты превращаются в зопласты, структура которых подобна пропластидам [7, 8]. При этом хлорофиллы деградируют не полностью и могут присутствовать в физиологически зрелых семенах в значительных количествах, что отрицательно коррелирует с их всхожестью [9–11]. Однако причины этого пока не ясны.

Хорошо известно, что обработка брассиностероидами (БС) повышает устойчивость растений к низкой и высокой температуре, засухе, засолению, аноксии

Смоликова Галина Николаевна — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: galina.smolikova@gmail.com

Задворнова Юлия Валентиновна — кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси; e-mail: zadvornova_julia@mail.ru

Ламан Николай Афанасьевич — доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси; заведующий лабораторией, Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси; e-mail: nikolai.laman@gmail.com

Медведев Сергей Семенович — доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой, Санкт-Петербургский государственный университет; e-mail: ssmmedvedev@mail.ru

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 11-04-00701а).

© Г. Н. Смоликова, Ю. В. Задворнова, Н. А. Ламан, С. С. Медведев, 2013

и окислительному стрессу [12–19]. Однако действие БС на устойчивость семян к различным видам стрессов, в том числе к окислительному, практически не изучено.

Очень эффективным способом, позволяющим изучать метаболические изменения, происходящие в семенах под действием неблагоприятных условий среды, является метод ускоренного старения, который заключается в том, что всхожесть семян оценивается после того, как они выдерживаются при повышенных температуре и влажности воздуха [20]. Цель данной работы — анализ влияния БС на устойчивость семян капусты белокочанной с различным содержанием остаточных хлорофиллов к стрессовым воздействиям, индуцированным ускоренным старением.

Объект и методы исследования

Семена капусты белокочанной (*Brassica oleraceae* L.) сорта Bartolo сортировали по интенсивности флуоресценции хлорофиллов в семенных оболочках (ИФХ) по методу [21] на установке SeedScan I Laser Sorter (Sataka, USA). Семена размещали на вращающемся диске с углублениями, облучали светом с длиной волны 650 нм и регистрировали флуоресценцию хлорофиллов при 730 нм. Полученное значение ИФХ использовали для разделения семян на фракции с низким и высоким содержанием хлорофиллов (НСХ и ВСХ соответственно).

Семена обрабатывали 24-эпибрассинолидом (ЭБ). Исходный раствор ЭБ в концентрации 10^{-4} М готовили на этиловом спирте, а далее доводили бензолом до концентрации 10^{-6} М. Семена инкубировали в растворе ЭБ в течение 30 мин, затем раствор сливали, а семена проветривали сутки в вытяжном шкафу для удаления остатков органических растворителей. В работе использовали три контроля: контроль 1 — необработанные семена, контроль 2 — семена инкубировали 30 мин в бензоле, контроль 3 — семена инкубировали 30 мин в смеси бензол : этанол (100 : 1, по объему).

Обработанные семена подвергали ускоренному старению (УС). Для этого их помещали на 7 дней в эксикатор над насыщенным раствором KCl, создающим 86%-ную равновесную влажность воздуха. Далее семена запаковывали в герметичные алюминиевые пакеты и выдерживали 3 дня при температуре 40 °С. После УС семена подсушивали над насыщенным раствором CaCl₂ и хранили до использования при температуре 5 °С.

Для оценки **скорости прорастания** и **всхожести** семена проращивали на фильтровальной бумаге при 22 °С. Количество проросших семян учитывали каждые сутки. Проросшими считали семена, у которых зародышевый корешок проклюнулся сквозь семенную оболочку. **Всхожесть семян** учитывали как количество нормально развитых проростков, ненормально развитых проростков и непроросших семян через 10 дней прорастания.

Целостность мембран в семенах определяли по количеству синапина, вышедшего из набухающих семян в инкубационный раствор, по методу из работы [22]. Синапин (3,5-диметокси-4-гидроксициннамоилхолин) — холиновый эфир синаповой кислоты. Семена в количестве 25 штук помещали в 50 мл воды на 18 ч при температуре 25 °С. Количество синапина определяли по оптической плотности раствора при 330 нм на спектрофотометре СФ-46.

Проницаемость плазматических мембран клеток корней определяли по выходу свободных нуклеотидов [23]. У 14-дневных проростков отсекали корни и брали навески по 0,5 г. Отделенные корни помещали в стеклянные пробирки, промывали

несколько раз дистиллированной водой и затем заливали 5 мл дистиллированной воды. Навески растительной ткани инкубировали в течение часа при температуре 20 и 50 °С. Изменение проницаемости мембран для свободных нуклеотидов регистрировали по оптической плотности инкубационной среды на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 260 нм.

Проницаемость клеточных мембран семядольных листьев определяли по выходу электролитов при помощи кондуктометра (HANNA HI9932) [24]. Навески растительных тканей по 0,5 г заливали 5 мл дистиллированной воды и инкубировали в термостате при 20 и 40 °С в течение 3 ч. Затем измеряли электропроводность раствора, которую выражали в мкСм/см.

Клеточный цикл в зародышевых корешках семян капусты изучали на проточном цитометре Coulter Epics XL-MCL (Beckman-Coulter, США). Растительную ткань измельчали в 1 мл охлажденного буфера, содержащего 137 мМ NaCl; 268 мкМ KCl; 0,5 мкМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$; 2,0 мкМ Na_2HPO_4 с рН 7,3. После измельчения суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 30 мкм. К раствору, содержащему ядра, добавляли РНКазу (10 мкл/мл) и флуоресцентный краситель (10 мкл/мл) и инкубировали 30 мин при 22 °С. В качестве флуоресцентного красителя использовали иодистый пропиридиум и 7-амино-актиномицин D. Инициацию клеточного цикла оценивали по отношению количества ядер в G2-фазе клеточного цикла с 4С, 8С и т. д. набором ДНК к количеству ядер в G1-фазе с 2С набором ДНК (G2/G1-отношение).

Эксперименты проводили в 4-кратной биологической повторности. На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические значения и стандартные ошибки средних.

Результаты исследования и их обсуждение

Сортировка семян капусты на установке SeedScan I Laser Sorter позволила получить фракции с низкой и высокой интенсивностью флуоресценции хлорофиллов в семенных оболочках. Для сортировки использовали физиологически зрелые семена, собранные на стадии технической спелости. Семена полученных фракций не различались по массе (3,5 г) и содержанию воды (0,06 г/г), однако существенно различались по количеству хлорофиллов.

Эффект обработки семян 24-эпибрассинолидом (ЭБ) оценивали по их скорости прорастания и всхожести (рис. 1). При этом оценивали нефракционированные семена (НФС) и семена, сортированные на фракции с разным содержанием хлорофиллов (НСХ и ВСХ). Содержание хлорофиллов у нефракционированных семян составляло 9,3 мкг/г, у семян из фракции НСХ — 3,1 мкг/г, у семян из фракции ВСХ — 44,7 мкг/г.

В методике уже было отмечено, что для приготовления раствора ЭБ использовали этиловый спирт, а для более эффективного поступления в семена гормонов применяли 30-минутную предобработку бензолом. Поэтому для выявления эффектов брассиностероидов использовали три контрольных варианта: *контроль 1* — необработанные семена; *контроль 2* — предобработка семян бензолом; *контроль 3* — предобработка семян бензолом с добавлением этанола. Поскольку ЭБ вводили в семена в бензол-этанольном растворе, его эффекты, как правило, сравнивали с контролем 3.

Как можно видеть на рис. 1, инкубация семян в бензоле (*контроль 2*), а также в смеси бензола с этанолом (*контроль 3*) практически не изменяла их всхожесть по сравнению с контролем 1.

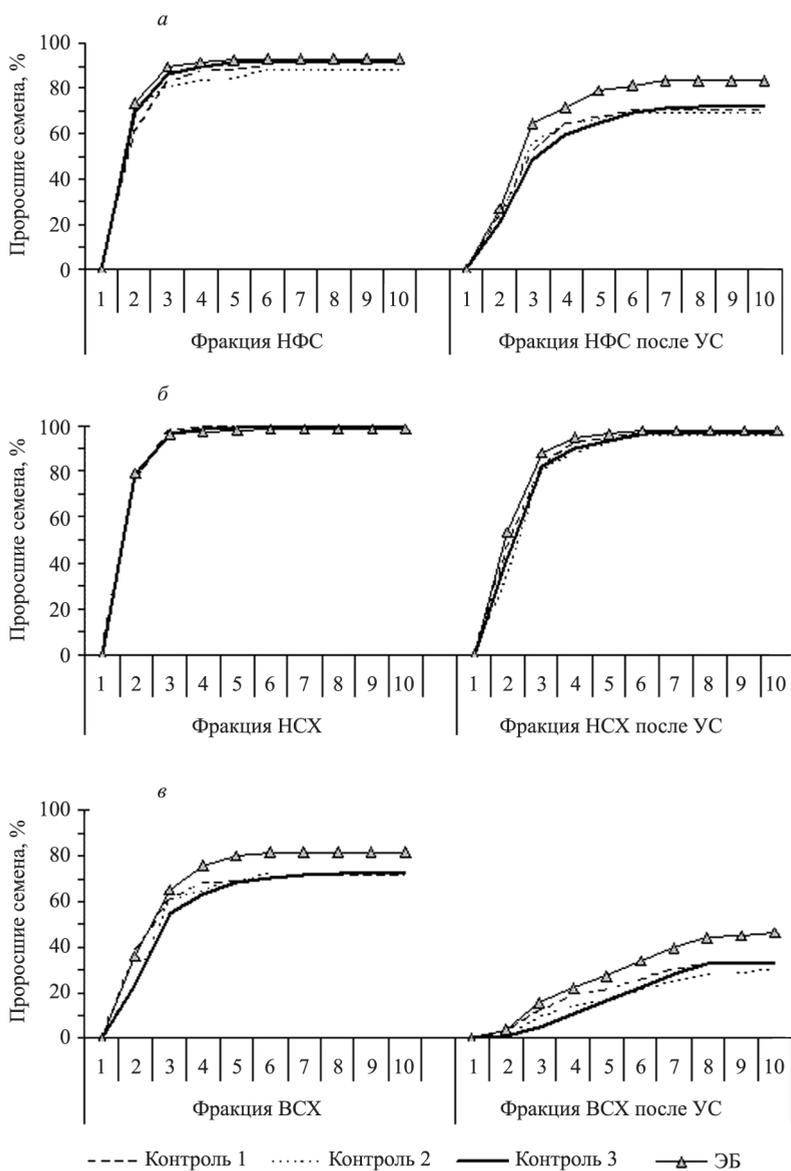


Рис. 1. Динамика прорастания семян капусты:

a — нефракционированные семена (НФС); *б* — семена с низким содержанием хлорофиллов (НСХ); *в* — семена с высоким содержанием хлорофиллов (ВСХ); контроль 1 — необработанные семена; контроль 2 — предобработка семян бензолом; контроль 3 — предобработка семян в смеси бензола с этанолом; ЭБ — предобработка семян в бензольно-этанольном растворе 24-эпибрасинолида.

Семена капусты, не фракционированные по содержанию хлорофилла, имели достаточно высокую скорость прорастания и всхожесть (92%). При этом обработка ЭБ не оказывала на них заметного влияния (рис. 1, *a*). Такая же картина наблюдалась и у семян из фракции НСХ (рис. 1, *б*). Всхожесть семян с высоким содержанием хлорофилла была ниже (73%), а обработка ЭБ повышала ее до 82%.

В условиях ускоренного старения всхожесть нефракционированных семян снижалась с 92 до 72%, а семян из фракции ВСХ — с 73 до 33%. Предобработка семян капусты ЭБ вызывала повышение всхожести семян в условиях ускоренного старения у нефракционированных семян на 12%, а у семян из фракции с высоким содержанием хлорофилла на 14%. Обработка ЭБ не оказывала влияния на семена из фракции НСХ, поскольку они исходно имели высокую всхожесть и устойчивость к ускоренному старению и, вероятно, не нуждались в обработке БС. Поэтому в дальнейшей работе для выявления эффектов brassinosteroidов использовались нефракционированные семена и семена с высоким содержанием хлорофиллов.

В табл. 1 показано, как ЭБ, введенный в воздушно-сухие семена в бензольно-этанольном растворе, влиял на рост проростков капусты. Сравнительную оценку ростовых параметров проводили на 14-дневных проростках капусты, выросших из нефракционированных семян.

Таблица 1. Ростовые параметры 14-дневных проростков капусты, выросших из семян, обработанных 24-эпибрасинолидом, и подвергнутых ускоренному старению

Варианты	Длина главного корня, см		Кол-во боковых корней, шт.		Длина гипокотыля, см	
	Контроль 4	УС	Контроль 4	УС	Контроль 4	УС
Контроль 1	16,1±0,5	12,7±0,8	5,1±0,6	4,9±0,4	3,0±0,1	3,1±0,2
Контроль 2	16,2±0,4	12,1±0,7	5,5±0,7	4,7±0,4	3,6±0,2	2,9±0,2
Контроль 3	13,8±0,6	12,6±0,6	5,7±0,5	4,5±0,4	3,4±0,2	3,3±0,2
ЭБ	17,5±0,5	14,5±0,6	7,0±0,5	5,3±0,4	3,7±0,2	3,3±0,2

Примечание. УС — ускоренное старение; контроль 1 — необработанные семена; контроль 2 — предобработка семян бензолом; контроль 3 — предобработка семян в смеси бензола с этанолом; ЭБ — предобработка семян в бензольно-этанольном растворе 24-эпибрасинолида; контроль 4 — семена не подвергали ускоренному старению; УС — семена подвергали ускоренному старению (86%-ная влажность воздуха, 40 °С, 3 дня) (то же для табл. 3–4).

Как видно из приведенных данных, ускоренное старение приводило к снижению роста корневой системы проростков на фоне отсутствия изменений в длине гипокотыля. Обработка семян ЭБ приводила к увеличению длины главного корня и количества боковых корней во всех вариантах опыта.

Известно, что БС, наряду с другими фитогормонами, принимают участие в регуляции деления клеток [25, 26]. Показано, что в присутствии цитокининов они стимулируют деление клеток китайской капусты и петунии [27, 28]. Обработка ЭБ суспензии клеток арабидопсиса *det2* (мутант по синтезу brassinosteroidов) повышала уровень транскриптов гена, кодирующего белок СусD3 (циклин D-типа), который участвует в регуляции перехода клеток из G1-фазы в S-фазу клеточного цикла [29].

Следующий этап нашей работы был посвящен анализу влияния ЭБ на инициацию клеточного цикла и активность репликации ДНК в клетках зародышевых корешков капусты (рис. 2). Для этой цели использовались нефракционированные прорастающие семена капусты, и было установлено, что предобработка ЭБ повышала скорость их прорастания.



Рис. 2. Отношение количества ядер в G₂-фазе клеточного цикла к количеству ядер в G₁-фазе (G₂/G₁) в клетках зародышевых корешков прорастающих семян капусты

Контроль 1 — необработанные семена; контроль 2 — предобработка семян бензолом; контроль 3 — предобработка семян в смеси бензола с этанолом; ЭБ — предобработка семян в бензольно-этанольном растворе 24-эпибрассинолида; ПР — проклевание зародышевого корешка сквозь семенную оболочку.

Активность репликации ДНК выражали как отношение количества ядер в G₂-фазе клеточного цикла к количеству ядер в фазе G₁. G₂/G₁-отношение рассчитывали по формуле: $(4C + 8C + 16C)/2C$, где C — количество ДНК в гаплоидном наборе хромосом.

Инициация клеточного цикла, связанная с репликацией ДНК и переходом клеток из G₁- в G₂-фазу клеточного цикла, наступала через 36 ч набухания семян к моменту проклевания зародышевого корешка сквозь семенную оболочку. Наблюдающееся до этого момента плавное увеличение отношения G₂/G₁ связывают с процессами репарации ДНК, имеющими место при набухании семян.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что ЭБ стимулирует начало репликации ДНК в ядрах клеток непосредственно перед проклеванием зародышевого корешка (через 36 ч). Это согласуется с данными по действию брассинолида на семена табака, который стимулировал проклевание зародышевого корешка путем гидролиза полимеров эндосперма [30].

Ускоренное старение приводило к задержке инициации клеточного цикла. В результате резкое увеличение отношения G₂/G₁ наступало только через 54 ч прорастания семян. На фоне ускоренного старения эффект ЭБ проявлялся наиболее сильно. В семенах, обработанных ЭБ, отношение G₂/G₁ составляло 0,8, в то время как в контроле этот показатель был равен 0,5.

Таким образом, ЭБ, введенный в воздушно-сухие семена, задерживал развитие повреждений, возникающих в семенах при ускоренном старении. Клетки зародышевой семян, обработанных ЭБ, быстрее выходили из состояния клеточного покоя (G₀/G₁-фаза) и входили в клеточный цикл. Известно, что скорость выхода клеток из состояния покоя и активация прорастания у семян связана с количеством повреждений в ДНК и эффективностью их репарации [31]. Поэтому можно предположить, что полученный эффект связан либо с более эффективной работой системы репарации повреждений

в семенах, обработанных ЭБ, либо с меньшим количеством накопленных повреждений вследствие протекторной функции ЭБ в процессе старения семян.

В ряде работ было показано, что экзогенные БС оказывают защитное действие на целостность мембран растительных клеток и повышают таким образом их устойчивость к высокой температуре, холоду и засолению [13, 32–34]. Нами было изучено, как ЭБ влияет на целостность мембран в условиях ускоренного старения в семенах, а также в семядольных листьях и корнях проростков капусты.

Целостность мембран семян оценивалась по выходу холинового эфира синаповой кислоты (синапина) при их набухании в течение 18 ч (табл. 2).

Таблица 2. Выход синапина при набухании нефракционированных семян капусты (НФС) и семян с высоким содержанием хлорофиллов (ВСХ)

Варианты	Оптическая плотность раствора при 330 нм			
	Фракция НФС		Фракция ВСХ	
	Контроль 4	УС	Контроль 4	УС
Контроль 1	0,051 ± 0,008	0,121 ± 0,012	0,084 ± 0,005	0,159 ± 0,005
Контроль 2	0,055 ± 0,006	0,124 ± 0,011	0,087 ± 0,005	0,156 ± 0,006
Контроль 3	0,057 ± 0,004	0,131 ± 0,004	0,087 ± 0,004	0,157 ± 0,004
ЭБ	0,041 ± 0,004	0,097 ± 0,008	0,067 ± 0,006	0,141 ± 0,004

Семена из фракции ВСХ характеризовались более высокой проницаемостью мембран по сравнению с нефракционированными семенами. В условиях повышенной влажности и температуры воздуха, т.е. ускоренного старения, выход синапина из семян возрастал почти в 2 раза. При этом обработка семян ЭБ задерживала выход синапина, инициированный стрессовыми условиями.

На следующем этапе работы изучали влияние повышенных температур и ЭБ на проницаемость клеточных мембран семядольных листьев и корней 14-дневных проростков капусты. Проницаемость мембран семядольных листьев оценивали кондуктометрически, а клеток корней по количеству низкомолекулярных соединений с максимумом поглощения 260 нм, выделяемых в инкубационный раствор.

В табл. 3 показано влияние ЭБ на выход электролитов из семядольных листьев проростков капусты при температуре 20 и 40 °С в условиях ускоренного старения. Повышение температуры инкубационного раствора, в котором находились высечки листьев, с 20 до 40 °С усиливало выход электролитов из семядольных листьев капусты более чем в 2 раза. Стрессовые условия ускоренного старения также почти в два раза повышали выход электролитов из клеток в раствор. Предобработка ЭБ приводила к снижению утечки электролитов в стрессовых условиях во всех вариантах опыта.

В табл. 4 показано влияние эпибрассинолида и ускоренного старения на выход низкомолекулярных метаболитов из клеток корней проростков капусты при температуре 20 и 50 °С. Проницаемость клеточных мембран в корнях проростков оценивали по выходу в окружающую среду низкомолекулярных метаболитов с максимумом поглощения 260 нм.

Можно видеть, что проницаемость клеточных мембран корней проростков, выросших из семян, подвергнутых УС, незначительно отличалась от проницаемости

Таблица 3. Выход электролитов из семядольных листьев проростков капусты при инкубации их при температуре 20 и 40 °С

Варианты	Количество электролитов в инкубационном растворе, мкСм / см			
	20 °С		40 °С	
	Контроль 4	УС	Контроль 4	УС
Контроль 1	7,7 ± 0,5	13,2 ± 0,1	20,4 ± 0,7	42,9 ± 3,8
Контроль 2	7,5 ± 0,8	12,8 ± 0,9	18,7 ± 0,7	31,5 ± 2,2
Контроль 3	7,3 ± 0,7	15,7 ± 0,4	19,1 ± 0,7	28,9 ± 2,3
ЭБ	5,4 ± 0,2	7,6 ± 0,1	12,6 ± 0,7	10,9 ± 2,0

Таблица 4. Выход низкомолекулярных метаболитов из корней проростков капусты при инкубации их в воде при температуре 20 и 50 °С

Варианты	Оптическая плотность раствора при 260 нм			
	20 °С		50 °С	
	Контроль 4	УС	Контроль 4	УС
Контроль 1	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,68 ± 0,07	0,65 ± 0,01
Контроль 2	0,32 ± 0,03	0,33 ± 0,03	0,61 ± 0,05	0,64 ± 0,01
Контроль 3	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,54 ± 0,04	0,64 ± 0,01
ЭБ	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,52 ± 0,01

клеточных мембран корней проростков, выросших из необработанных семян. Инкубация корней при 50 °С приводила к повышению проницаемости мембран, что выразилось в увеличении выхода низкомолекулярных метаболитов примерно в 2 раза. Обработка семян ЭБ приводила к тому, что выход низкомолекулярных метаболитов из клеточных мембран снижался примерно на 20–30%.

Заключение

Подводя итог полученным результатам, можно сделать вывод о том, что обработка brassinosterоидами усиливает, а повышенное содержание хлорофиллов в семенах, наоборот, ослабляет устойчивость семян к стрессовым воздействиям, инициируемым повышенными температурами и влажностью при хранении. На уровне целого организма влияние ЭБ проявлялось в увеличении скорости прорастания и всхожести обработанных семян. При этом эффективность обработки зависела от содержания в семенах остаточных хлорофиллов. Фракции семян с повышенным содержанием хлорофиллов были более чувствительны к ускоренному старению и более отзывчивы на применение ЭБ.

Выявлен пролонгированный стимулирующий эффект ЭБ на рост и развитие проростков, если семена были обработаны им до начала прорастания. Установлено, что ростстимулирующее действие ЭБ связано с активацией репликации ДНК в зародышах прорастающих семян. Проростки, выращенные из семян, обработанных ЭБ, характеризовались более развитой корневой системой, при этом повышалась целостность клеточных мембран семядольных листьев и корней проростков капусты.

В чем же заключается механизм защитного эффекта БС и повреждающего действия остаточных хлорофиллов при стрессовых воздействиях, индуцируемых

ускоренным старением семян? Один из возможных механизмов защитного эффекта БС может быть обусловлен хорошо известной способностью этих гормонов активировать Н-АТФазу плазматической мембраны [18, 35–38]. Нами было показано, что в стрессовых условиях происходит нарушение проницаемости клеточных мембран и выход электролитов и низкомолекулярных органических соединений во внеклеточную среду (см. табл. 2–4). Предобработка БС тормозит этот процесс. Можно предположить, что БС, создавая на плазматической мембране электрохимический градиент ионов водорода (за счет активации протонной помпы), формируют энергетическую основу для работы системы переносчиков, осуществляющей вторично-активный транспорт ионов и низкомолекулярных органических соединений. В результате повышаются репарационные возможности мембранных переносчиков, которые обеспечивают поддержание необходимого уровня транспортируемых ионов и органических соединений в клеточных компартаментах.

Усиление устойчивости растений к повышенным температурам при обработке brassinosterоидами (см. табл. 2–4) можно объяснить тем, что эти гормоны даже в условиях нормальных температур индуцируют синтез белков теплового шока. В работе О. Н. Кулаевой и соавторов [39] было показано, что обработка БС листьев пшеницы увеличивала порог чувствительности белкового синтеза к гипертермии на несколько градусов. С индукцией синтеза БТШ под влиянием ЭБ связывают также термотолерантность проростков рапса и томата [40]. Показано, что в присутствии 24-эпибрасинолида проростки томатов и рапса были более устойчивы к действию повышенных температур, чем контрольные растения. При электрофорезе белков, полученных из таких проростков, было выявлено увеличение синтеза белков теплового шока (hsp 70 и hsp 90) и белков класса shsp II [14, 40].

Причина более низкой устойчивости к стрессовым воздействиям у семян с высоким содержанием остаточных хлорофиллов может быть в том, что хлорофиллы оказывают повреждающее действие на семена путем усиления окислительного стресса. Поскольку хлорофиллы в семенах находятся в пропластидах с разрушенными гранами [7, 8], система акцептирования электронов от возбужденных светом хлорофиллов не работает. Поэтому электроны от возбужденного хлорофилла могут передаваться на кислород с образованием супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot -}$) и других активных форм кислорода, что, в итоге, будет приводить к индукции свободно-радикальных процессов.

* * *

Авторы благодарят чл.-корр. НАН Беларуси В. А. Хрипача (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) за предоставление 24-эпибрасинолида, Dr. S. P. C. Groot и J. Bergervoet (Plant Research International, Wageningen, the Netherlands) за сортировку семян и помощь в проведении проточно-цитометрических измерений.

Литература

1. McDonald M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment // *Seed Science and Technology*. 1999. Vol. 27, N 1. P. 177–237.
2. Алексейчук Г. Н. Механизмы старения семян при неблагоприятных условиях хранения // Ботаника (исследования): сб. науч. тр. / Ин-т экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАНБ / под ред. Н. А. Ламана. Мн.: ИООО «Право и экономика», 2008. Вып. 36. С. 311–325.
3. Гипоксия и повреждения при набухании стареющих семян / Веселова Т. В., Веселовский В. А.,

- Усманов П. Д., Усманова О. В., Козарь В. И. // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 6. С. 930–937.
4. Vailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology // Seed Science Research. 2004. Vol. 14, N 2. P. 93–107.
5. Полесская О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: учеб. пособие. М.: КДУ, 2007. 140 с.
6. Яковлев М. С., Жукова Г. Я. Покрытосеменные растения с зеленым и бесцветным зародышем (хлоро- и лейкоэмбриофиты). Л.: Наука, 1973. 116 с.
7. Ruppel N. J., Hangarter R. P. Mutations in a plastid-localized elongation factor G alter early stages of plastid development in *Arabidopsis thaliana* // BMC plant biology. 2007. Vol. 7, N 37. doi:10.1186/1471–2229/7/37.
8. Asokanathan P. S., Johnson R. W., Griffith M., Krol M. The photosynthetic potential of canola embryos // Physiologia Plantarum. 1997. Vol. 101, N 2. P. 353–360.
9. Булда О. В., Рассадина В. В., Алексейчук Г. Н., Ламан Н. А. Спектрофотометрический метод определения содержания каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах семян растений // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 604–611.
10. Смоликова Г. Н., Ламан Н. А., Борискевич О. В. Роль хлорофиллов и каротиноидов в устойчивости семян к абиотическим стрессорам // Физиология растений. 2011. Т. 58, № 6. С. 817–825.
11. Смоликова Г. Н. Потеря устойчивости к обезвоживанию у прорастающих семян *Brassica oleracea* L. с разным содержанием остаточных хлорофиллов // Труды КарНЦ РАН. Сер. эксперим. биол. 2011. № 3. С. 105–111.
12. Khripach V. A., Zhabinskii V. N., de Groot A. Brassinosteroids: a new class of plant hormones. San Diego: Academic Press, 1999. 263 p.
13. Еришова А. Н., Хрипач А. Н. Влияние эпибрасинолида на процессы перекисного окисления липидов *Pisum sativum* в нормальных условиях и при кислородном стрессе // Физиология растений. 1996. Т. 43, № 6. С. 870–873.
14. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress / Dhaubhadel S., Karen S., Browning K. S., Gallie D. R., Krishna P. // Plant J. 2002. Vol. 29, N 6. P. 681–691.
15. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber / Xia X. J., Wang Y. J., Zhou Y. H., Tao Y., Mao W. H., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J. Q. // Plant Physiology. 2009. Vol. 150, N 2. P. 801–814.
16. Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus* / Xia X. J., Zhou Y. H., Ding J., Shi K., Asami T., Chen Z., Yu J. Q. // New Phytology. 2011. Vol. 191, N 3. P. 706–720.
17. Brassinosteroid alleviates polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress by enhancing antioxidant enzymes activity in tomato / Ahammed G. J., Ruan Y. P., Zhou J., Xia X. J., Shi K., Zhou Y. H., Yu J. Q. // Chemosphere. 2013. Vol. 90, N 11. P. 2645–2653.
18. Haubrick L. L., Assmann S. M. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles // Plant, Cell and Environment. 2006. Vol. 29. P. 446–457.
19. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses / Kagale S., Divi U. K., Krochko J. E., Keller W. A., Krishna P. // Planta. 2007. Vol. 225. P. 353–364.
20. Алексейчук Г. Н. Сила роста семян зерновых культур и ее оценка методом ускоренного старения / под ред. Н. А. Ламана. Мн.: Право и экономика. 2009. 44 с.
21. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance / Jalink H., van der Schoor R., Frandas A., van Pijlen J. G., Bino R. J. // Seed Science Research. 1998. Vol. 8, N 4. P. 437–443.
22. Lee P. C., Taylor A. G., Paine D. H. Sinapine leakage for detection of seed quality in *Brassica* // Basic and Applied Aspects of Seed Biology / ed. by R. H. Ellis, M. Black et al. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 537–545.
23. Насонова Г. В., Прокопова Ж. В., Гамезо Н. В. Идентификация свободных нуклеотидов и их компонентов, выделяющихся из переуплотненных культур дрожжей // Весці акад. навук Беларусі. Сер. биол. навук. 1977. № 6. С. 57–58.
24. Перепадя Ю. Г., Ивакин А. П. Электролитический метод оценки коллекции овощных культур на жаростойкость // Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды / под ред. Г. В. Удовенко. Л.: Колос, 1976. С. 312–315.
25. Nakaya M., Tsukaya H., Murakami N., Masahiro K. Brassinosteroids control proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana* // Plant and Cell Physiol. 2002. Vol. 43, N 2. P. 239–244.
26. Sasse J. M. Physiological actions of brassinosteroids: an update // J. Plant Growth Regul. 2003. Vol. 22, N 4. P. 276–288.

27. Oh M. H., Clouse S. D. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida* // Plant Cell Rep. 1998. Vol. 17, N 12. P. 921–924.
28. Nakajima N. Effect of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts // Jap. J. Crop Science. 1996. Vol. 65, N 1. P. 114–118.
29. Hu Y., Bao F., Li J. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis* // Plant J. 2000. Vol. 24, N 5. P. 693–701.
30. Leubner-Merzger G. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways // Planta. 2001. Vol. 213, N 5. P. 758–763.
31. Vuosku J., Suokas M., Kestilä J. From seed to tree: the functioning and evolution of DNA repair in plants // DNA Repair / ed. by I. Kruman. W.p.: InTech, 2011. P. 383–398.
32. Seki M., Katsumi M. Protective actions of brassinolide against chilling induced injuries // Plant Physiol. suppl. 1994. Vol. 105, N 1. P. 141.
33. Sharma P., Bhardwaj R. Effect of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth and heavy metal uptake in *Brassica juncea* L. // Gen. Appl. Plant Physiology. 2007. Vol. 33, N 1–2. P. 59–74.
34. Loss-of-function mutation in DET2 gene lead to an enhanced resistance to oxidative stress in *Arabidopsis* / Cao S., Xu Q., Cao Y., Qian K., An K., Zhu Y., Binzeng H., Zhao H., Kuai B. // Physiol. Plantarum. 2005. Vol. 123. P. 57–66.
35. Physiological and molecular effects of brassinosteroids on *Arabidopsis thaliana* / Clouse S. D., Hall A. F., Langford M., McMorris T. C., Baker M. E. // J. Plant Growth Regul. 1993. Vol. 12, N 1. P. 61–66.
36. Deeva V. P., Pavlova I. P., Khripach V. A. The effect of 24-epibrassinolide on ATPase activity of plasmalemma and cytoplasmatic components in different buckwheat genotypes // Proc. Plant Growth Regul. Soc. Am. 1996. Vol. 23, N 1. P. 32–35.
37. Sasse J. M. Recent progress in brassinosteroids research // Physiol. Plantarum. 1997. Vol. 100, N 3. P. 696–701.
38. Brassinosteroids regulate plasma membrane anion channels in addition to proton pumps during expansion of *Arabidopsis thaliana* cells / Zhang Z., Ramirez J., Rebutier D., Braul M., Trouverie J., Pennarun A.-M., Amiar Z., Biligui B., Galagovsky L., Rona J.-P. // Plant Cell Physiol. 2005. Vol. 46, N 9. P. 1494–1504.
39. Кулаева О. Н., Бурханова Э. А., Федина А. Б. Брассиностероиды в регуляции синтеза белка в листьях пшеницы // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305, № 5. С. 1277–1279.
40. Dhaubhadel S., Chaudhary S., Dobinson K. F., Krishna P. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings // Plant Mol. Biol. 1999. Vol. 40, N 2. P. 333–342.

Статья поступила в редакцию 13 июня 2013 г.