

На правах рукописи



Жалал Абду Каид Хасан Альмиклафи

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ
БРАССИНОСТЕРОИДОВ НА РАСТЕНИЯ РАПСА
В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2014

Работа выполнена на кафедре ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов», Москва.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Ефимова Марина Васильевна

Научный консультант

доктор биологических наук, профессор,
чл.-корр. РАН

Кузнецов Владимир Васильевич

Официальные оппоненты:

Кошкин Евгений Иванович, доктор биологических наук, профессор, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, кафедра физиологии растений, профессор.

Живухина Елена Александровна, кандидат биологических наук, доцент, Московский педагогический государственный университет, биолого – химический факультет, доцент кафедры ботаники.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, биологический факультет.

Защита диссертации состоится «11» ноября 2014 года в 11 ч на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений» (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (499) 977-80-18, www.ippras.ru, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru, ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Автореферат разослан «___» сентября 2014г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. По данным ФАО общая площадь засоленных территорий в мире превышает 800 млн гектаров, что составляет около 25% почв земного шара. В Республике Йемен пригодные для возделывания земли занимают лишь 1,8% территории. Одной из причин столь низкого использования земель в интересах аграрного производства является их избыточное засоление. Засоление территорий приводит к снижению продуктивности агро- и биоценозов, падению биоразнообразия и экономическим потерям.

Использование засоленных территорий для аграрного производства – крайне актуальная сельскохозяйственная и биологическая проблема. Ее решение предполагает изучение механизмов адаптации растений к солевому стрессу и разработку на этой основе технологии повышения солеустойчивости основных пищевых и технических культур.

Ключевую роль в повышении солеустойчивости растений играют факторы гормональной природы и, прежде всего, брассиностероиды. Брассиностероиды структурно близки стероидным гормонам животных и насекомых. Они играют важную роль в регуляции многих физиологических процессов у растений. Механизмы стресс-протекторного действия брассиностероидов в настоящее время слабо изучены. Вместе с тем брассиностероиды весьма перспективны для создания эффективных экологически безопасных регуляторов, повышающих урожайность растений в экстремальных условиях.

Большой интерес для возделывания на засоленных территориях представляет рапс – важная пищевая и техническая культура, которая выращивается на обширных территориях во многих странах мира. Однако недостаточная солеустойчивость растений рапса не позволяет их выращивать на избыточно засоленных почвах. Это делает крайне актуальным изучение солеустойчивости растений рапса и выяснение физиологических основ возможной протекторной роли брассиностероидов, что создает научную основу для разработки технологии повышения солеустойчивости рапса с помощью гормональных факторов.

Цель и задачи исследования. Цель работы заключалась в исследовании стрессорного ответа растений рапса на интенсивное засоление и в выяснении физиологических механизмов защитного действия брассиностероидов.

Задачи исследования: (1) Исследовать прорастание семян и рост проростков рапса в условиях различной интенсивности засоления, действия широкого спектра концентраций брассиностероидов и совместного действия двух факторов; (2) Выяснить, на каком этапе стрессорного ответа реализуется защитное действие брассиностероидов; (3) Исследовать изменение баланса эндогенных брассиностероидов в условиях солевого стресса; (4) Исследовать реакцию ювенильных растений рапса на интенсивное засоление и физиологические механизмы протекторного действия брассиностероидов.

Научная новизна. Получены убедительные экспериментальные доказательства способности брассиностероидов повышать солеустойчивость растений рапса на разных этапах онтогенеза. Впервые продемонстрировано, что засоление стимулирует накопление в растениях эндогенных 24-эпибрассинолида, 28-гомобрассинолида и брассинолида, что делает вероятным их вовлечение в регуляцию формирования защитных систем. Получены приоритетные данные о физиологических механизмах защитного действия брассиностероидов при солевом стрессе. В частности, показано, что 24-эпибрассинолид снижает интенсивность

окислительного стресса, регулирует внутриклеточный ионный гомеостаз, значительно снижая накопление ионов натрия и несколько стабилизируя содержания ионов калия, что сопровождается снижением интенсивности генерации АФК, ингибирующего действия соли на ростовые процессы и защитой фотосинтетических пигментов от деградации.

Практическая значимость. Полученные в работе данные по физиологическим механизмам солеустойчивости растений рапса могут быть использованы селекционерами при подборе сортов рапса с целью их выращивания на засоленных почвах. Несомненную практическую значимость имеют результаты по стресс-протекторному действию брассиностероидов, что может стать теоретической основой для разработки технологии выращивания растений рапса в условиях избыточного засоления. Впервые продемонстрировано, что засоление стимулирует накопление в растениях эндогенных 24-эпибрассиностероидов (24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона), 24S-метилбрассиностероидов (брассинолида и кастастерона) и 28-гомобрассиностероидов. Теоретические обобщения и совокупность полученных экспериментальных данных могут использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов ВУЗов страны.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на Международной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Томск, 5-9 сентября 2011); IV Международной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 22-25 сентября 2011); XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, 2012); VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 25-27 сентября 2012); XVIIIth Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (Germany, Freiburg, 29 July – 3 August 2012); Годичном собрании Общества физиологов растений России и Всероссийской конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений» (Москва, 2-6 июня 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 статьи - в рецензируемых журналах.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 108 страницах машинописного текста и иллюстрированы 4 таблицами и 34 рисунками. Список цитируемой литературы содержит 171 наименование, в т.ч. 143 на иностранных языках.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Использовали растения рапса (*Brassica napus* L.) с. Вестар канадской селекции. Рапс – естественный амфидиплоид, произошедший от сурепицы и капусты, геном содержат шесть хромосом ($n=6$).

Условия выращивания растений и постановки экспериментов. Семена рапса стерилизовали 96% этанолом, переносили в чашки Петри на дистиллированную воду (контроль), раствор NaCl (от 50 до 250 мМ) или раствор брассиностероидов (10^{-12} - 10^{-6} М). Оценивали прорастание семян, длину зародышевого стебля (гипокотыля) и корня.

Для получения ювенильных растений семена проращивали 7 суток, затем выращивали в 1-литровых сосудах на питательной среде Хогланда-Снайдерса в камере фитотрона при дневной температуре 23-25°C и ночной 18-20°C; продолжительности фотопериода - 12 часов; интенсивности освещения 350 мкмоль/м²с (лампы ДНаЗ Reflux мощностью 250 Вт, Россия). Через 3 недели выращивания растения переносили на две недели в условия интенсивного засоления (NaCl) на раствор ЭБЛ или на раствор соли и ЭБЛ. Снимали ростовые показатели и фиксировали материал каждые 7 дней экспозиции растений.

Морфологические характеристики проростков и ювенильных растений. Ростовые показатели проростков (длина гипокотилия и корня) измеряли под лупой БМ-51-2 (КОМЗ, Казань). Площадь листовой поверхности рапса оценивали по бумажным трафаретам листьев, используя для взвешивания аналитические весы Sartorius CP 622 (Германия).

Сырую и сухую биомассу растительного материала оценивали гравиметрически с помощью аналитических весов Sartorius CP 622 (Германия). Сухую массу определяли после фиксации материала при 90°C и его высушивания при 70°C до постоянного веса.

Оводненность тканей растений оценивали по содержанию воды (% от сырой массы), исходя из отношения разности сырой и сухой биомасс, отнесенной к сырой массе.

Уровни фотосинтетических пигментов оценивали спектрофотометрически, используя для экстракции 96% раствор C₂H₅OH. Оптическую плотность раствора при разных длинах волн измеряли спектрофотометром Genesys 10S UV-Vis Thermo Electron (США). Концентрацию пигментов рассчитывали согласно Н.К. Lichtenthaler (1987).

Определение содержания ионов натрия и калия в тканях растений проводили по методу Голубкиной (1995).

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли спектрофотометрически по основному продукту реакции – МДА (малоновый диальдегид) по методу Heath и Parker (1968), который основан на образовании окрашенного комплекса МДА с тиобарбитуровой кислотой при нагревании.

Определение содержания пролина проводили по методу Bates et al. (1973).

Осмотический потенциал клеточного экссудата определяли на криоскопическом осмометре Osmomat 030 («Gonotec», Германия) по точке замерзания клеточного сока.

Определение содержания общих растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина-Дениса (Загоскина с соавт., 2003).

Оценку содержания флавоноидов проводили по методу Gage and Wendel (1950).

Определение уровня эндогенных brassinosteroidов проводили с помощью иммуноферментных тест-систем для 24-эпибрассиностероидов (суммарное содержание 24-эпибрассинолида и 24-эпикастастерона), 24S-метилбрассиностероидов (суммарное содержание брассинолида и кастастерона) и 28-гомобрассиностероидов (суммарное содержание 28-гомобрассинолида и 28-гомокастастерона) (Khrpach et al. 2011).

Статистическая обработка данных проводилась средствами электронных таблиц EXCEL и программы STATISTICA на персональном компьютере Intel

Pentium IV. Для сравнения независимых выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали параметрический критерий Стьюдента. Значения t -критерия находили для 95% уровня значимости ($p < 0.05$). На гистограммах и в таблицах приведены средние арифметические и их стандартные ошибки из 3-5 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования протекторного действия brassinостероидов на рост растений рапса при солевом стрессе изучали ответную реакцию растений на засоление, действие brassinостероидов и, наконец, на совместное действие двух факторов. Принимая во внимание тот факт, что уровень стресс-устойчивости растений изменяется в ходе онтогенеза, исследовали влияние солевого стресса и brassinостероидов на прорастание семян, развитие проростков и на рост ювенильных растений.

1. Влияние NaCl, brassinостероидов и совместного действия двух факторов на прорастание семян и рост проростков рапса в темноте

1.1. Влияние NaCl на прорастание семян и рост проростков в темноте

Прежде всего, изучали влияние растворов NaCl в широком диапазоне концентраций от 25 до 250 мМ на прорастание семян; процент проросших семян оценивали через 3,5 и 7 суток. Полученные результаты показали, что минимальные из используемых нами концентраций NaCl (25, 50 и 75 мМ) практически не ингибировали прорастание семян. Концентрации NaCl 100 и 125 мМ задерживали прорастание семян на 40 % через 3,5 суток воздействия. Значительная потеря всхожести семян отмечена в диапазоне концентраций 150-200 мМ. В 7,5, 15 и 20 раз относительно контроля снижалось прорастание семян при действии 150, 175 и 200 мМ NaCl на 3,5 суток и в 2,3, 7,5 и 10 раз на 7 суток воздействия соответственно. 250 мМ раствор NaCl вызывал полную потерю всхожести семян.

При оценке роста осевых органов (гипокотилия и корня) обнаружили подавление роста гипокотилия (на 30 %) и корня (на 22 %) при 75 и 100 мМ NaCl соответственно, в условиях непродолжительного (3,5 суток) засоления. Ингибирование роста гипокотилия на 47 % достигалось при 125 мМ, корня – при 150 мМ NaCl. Максимальное подавление роста осевых органов (в 6,2 раза) было отмечено при действии 200 мМ NaCl (Рис. 1).

Длительное засоление значительно подавляло рост корня (Рис. 1), в то же самое время, гипокотиль проявлял высокую устойчивость к действию 7-суточного хлоридного засоления, обнаруживая значительную стимуляцию роста при 50 мМ NaCl в среде. При этом процесс прорастания семян оказался достаточно резистентным к засолению.

1.2. Влияние 24-эпибрассинолида на развитие проростков рапса

В настоящее время в растительных объектах идентифицировано около 70 стероидных гормонов, из которых наибольшей биологической активностью обладают брассинолид (БЛ), 24-эпибрассинолид (ЭБЛ) и 28-гомобрассинолид (ГБЛ) (Khrpach et al., 2003).

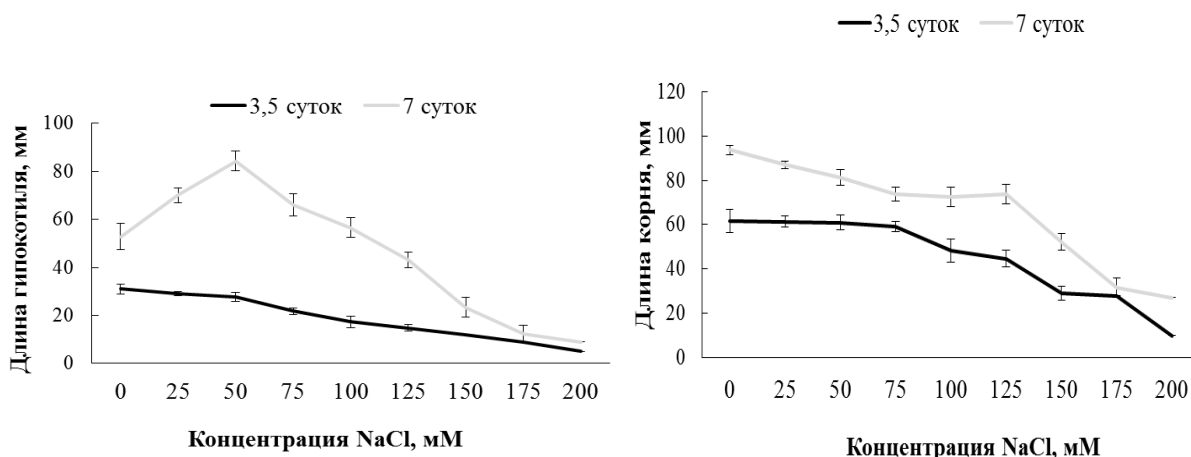


Рис. 1. Ростовые показатели проростков рапса в условиях засоления

На примере ЭБЛ было показано положительное влияние стероидных гормонов на ростовые показатели 7-суточных этиолированных проростков рапса (Рис. 2). ЭБЛ в диапазоне концентраций от 10^{-11} до 10^{-9} М стимулировал рост корней, тогда как более высокие его концентрации (10^{-7} и 10^{-6} М) тормозили этот процесс. В отличие от корня рост гипокотиля в ответ на ЭБЛ изменялся незначительно (Рис. 2). На этом основании для последующих опытов с проростками нами были выбраны для трех стероидных гормонов концентрации от 10^{-10} до 10^{-8} М.

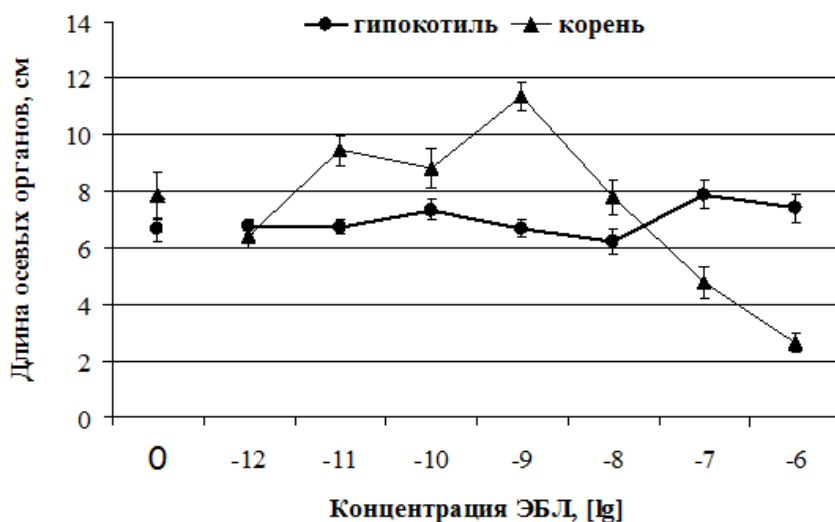


Рис. 2. Влияние экзогенного 24-эпибрасинолида на ростовые показатели проростков рапса

Сравнение действия 3-х брассиностероидов показало, что в нормальных условиях инкубации ни один из использованных нами гормонов ЭБЛ, ГБЛ и БЛ (в диапазоне концентраций от 0.0001 до 0.01 мкМ) не оказывал сколь-нибудь заметного влияния на прорастание семян рапса.

В отличие от прорастания семян развитие проростков зависело от концентрации и химической структуры гормона. Как следует из полученных результатов, довольно высокую чувствительность к действию стероидных гормонов проявляла корневая система проростков; незначительная стимуляция (23 %) роста корня была отмечена для ЭБЛ в концентрации 10^{-9} М. ГБЛ (10^{-8} М) усиливал рост корня на 37%. Аналогичная реакция корня обнаруживалась и в ответ на

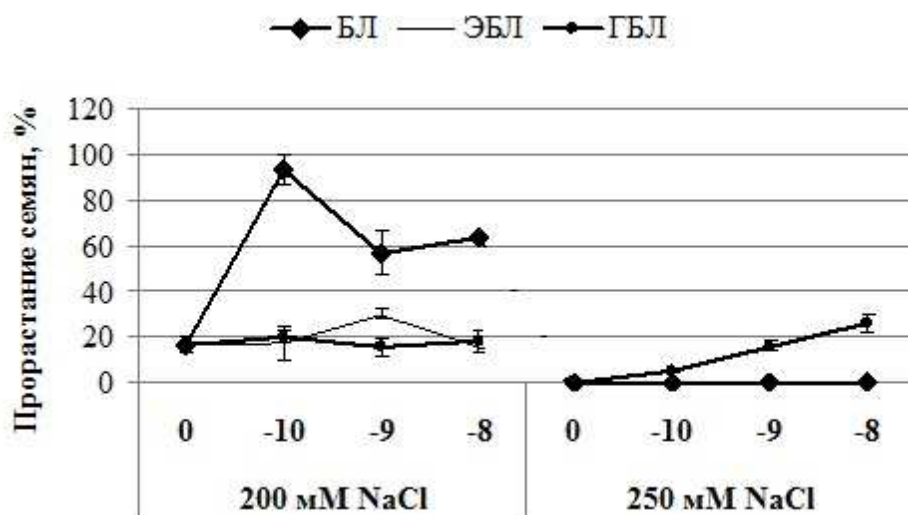
действие brassinоида; в этом случае корень удлинялся на 32 и 28 % при 10^{-9} и 10^{-8} М соответственно. Совокупность приведенных данных позволила заключить, что выраженный стимулирующий эффект brassиностероидов обнаружился при концентрации 10^{-8} М.

1.3. Влияние трех brassиностероидов на прорастание семян и развитие проростков рапса при солевом стрессе

Основываясь на результатах проведенных выше экспериментов по изучению влияния NaCl на прорастание семян и развитие проростков нами был определен диапазон концентраций NaCl (150-250 мМ) для изучения стресс-протекторного действия brassиностероидов.

Изучение прорастания семян при хлоридном засолении в присутствии БЛ, ЭБЛ, ГБЛ показало, что при 200 мМ NaCl лишь brassинолид в концентрации 10^{-10} М полностью снимал ингибирующее действие соли (Ефимова и др., 2012). Интересно, что ГБЛ (10^{-9} и 10^{-8} М), не оказывавший защитного эффекта при 200 мМ NaCl, несколько активировал прорастание семян при 250 мМ NaCl (Рис. 3).

Относительно развития проростков рапса при засолении наибольший протекторный эффект был отмечен при использовании экзогенного ЭБЛ при кон-



центрациях гормона 10^{-10} М и 10^{-8} М (Рис. 4).

Рис. 3. Влияние экзогенных brassиностероидов на интенсивность прорастания семян рапса при высоких концентрациях NaCl (На оси абсцисс представлены логарифмы концентраций гормонов в молях).

На фоне действия 150 мМ NaCl ЭБЛ восстанавливал размеры корня до контрольных значений; рост гипокотилия усиливался примерно в два раза относительно варианта с засолением. Эффект гормона при других концентрациях хлоридного засоления (175 и 200 мМ) был менее выражен.

На основании проведенных экспериментов нами была показана высокая солезашитная активность brassинолида на уровне прорастания семян и 24-эпибрассинолида - на уровне роста гипокотилия и корня в условиях хлоридного засоления.

Выявлены эффективные концентрации 24-эпибрассинолида – 10^{-10} (и 10^{-8}) М, проявляющие высокую протекторную активность при засолении.

2. Влияние 24-эпибрассинолида на ростовые и физиологические показатели проростков рапса при хлоридном засолении на свету

Прежде чем изучать защитное действие brassinosterоидов на ювенильных растениях рапса представлялось целесообразным исследовать протекторное действие гормона в условиях солевого стресса на белом свету. Это позволяло не только сравнить реакцию этиолированных и зеленых проростков на хлоридное засоление и воздействие на них ЭБЛ, но и уточнить условия проведения экспериментов со взрослыми растениями. Для характеристики ответной реакции проростков на стресс были использованы общепринятые показатели: содержание фотосинтетических пигментов, аккумуляция пролина и величина осмотического потенциала клеточного содержимого.

Как и следовало ожидать, негативный эффект интенсивного засоления на белом свету был выражен в меньшей степени, чем в темноте. Если число проросших семян в присутствии 175 мМ NaCl в условиях темноты составило лишь 13%, то на белом свету достигало 30% от контрольного варианта. Наибольшая чувствительность к действию NaCl на белом свету, в отличие от темноты (Хасан и др., 2011; Ефимова и др., 2012), была отмечена для корня, рост которого был подавлен в 5 раз по сравнению с контролем.

Экзогенный ЭБЛ (10^{-10} или 10^{-8} М) снижал негативный эффект NaCl на прорастание семян и рост гипокотилей. Длина гипокотилей проростков, обработанных ЭБЛ в присутствии соли, была в два раза больше длины гипокотилей проростков, выращенных на растворе с NaCl, но в 2 раза меньше длины гипокотилей контрольных проростков (Рис. 4). Протекторный эффект гормона для корня носил выраженную концентрационную зависимость. Наибольшее защитное действие при засолении проявлял ЭБЛ в концентрации 10^{-8} М, при которой длина корня в 4 раза превосходила длину корня проростков, подвергнутых действию только 175 мМ NaCl (Рис. 4).

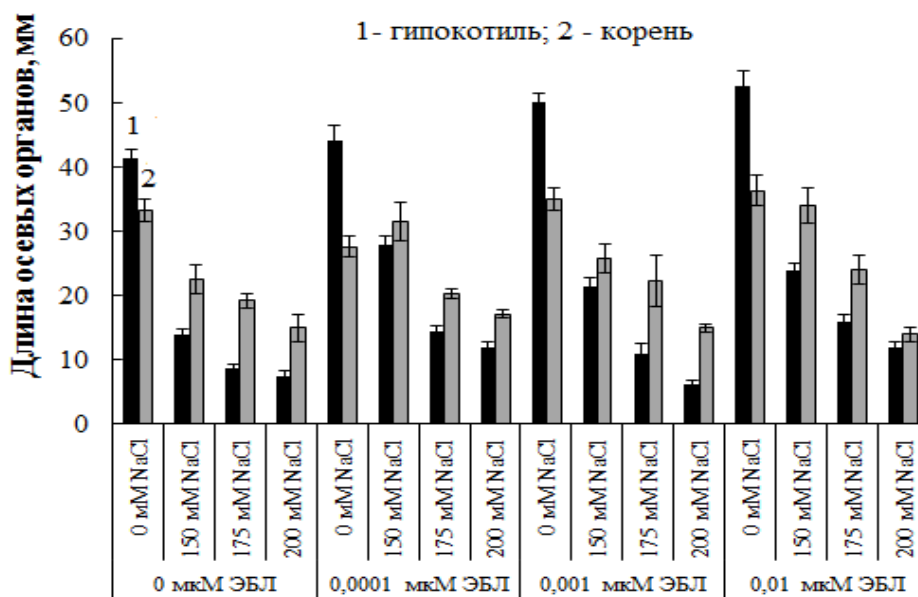


Рис. 4. Влияние экзогенного эпибрассинолида на ростовые показатели проростков рапса при засолении.

Содержание фотосинтетических пигментов в семядолях при хлоридном засолении снижалось примерно в два раза по сравнению с контрольными проростками, а соотношение хлорофиллов (a+b) к каротиноидам – в 1,5 раза. ЭБЛ (10^{-8} М) повышал содержание хлорофилла a в 2 раза и других пигментов (хлорофилла b и каротиноидов) – в 1,5 раза, тогда как более низкая концентрация ЭБЛ (10^{-10} М) оказалась менее эффективной. В этой связи следует отметить, что в зависимости от действующей концентрации brassinosteroids избирательно изменяют интенсивность транскрипции пластидного генома *Arabidopsis*, ячменя и рапса (Ефимова и др., 2012a; Ефимова и др., 2012б; Efimova et al., 2012).

Известно, что одним из негативных проявлений солевого стресса является развитие водного дефицита у растений. ЭБЛ независимо от использованной нами концентрации не оказывал отрицательного воздействия на поступление воды в растения. При обработке растений ЭБЛ на фоне NaCl наблюдалось увеличение осмотического потенциала тканей проростков. При этом проростки отвечали на засоление 70-кратным увеличением содержания пролина. Экзогенный ЭБЛ, не влияя на содержание пролина в оптимальных условиях, в 7–10 раз снижал его NaCl-индуцированную аккумуляцию.

Таким образом, экспериментальные результаты однозначно свидетельствуют о том, что процесс прорастания семян рапса более солеустойчив по сравнению с ростом корневой системы и гипокотилия. Реакция проростков рапса на засоление характеризовалась органоспецифичностью. Продемонстрировано, что brassino-steroids обладают стресс-защитным эффектом, повышая солеустойчивость процесса прорастания семян и роста проростков при засолении. Показана высокая солезастная активность ГБЛ на уровне прорастания семян, а ЭБЛ – на уровне роста гипокотилия и накопления фотосинтетических пигментов. Для проведения экспериментов на ювенильных растениях рапса мы, основываясь на полученных данных, выбрали ЭБЛ в концентрации 10^{-10} М. В качестве действующей концентрации NaCl использовали 175 мМ, оказывающей выраженный негативный эффект на стадии проростков, но не приводящей их к гибели.

3. Реализация протекторного эффекта 24-эпибрассинолида на разных этапах адаптации растений к хлоридному засолению

Прежде чем исследовать физиологические механизмы защитного действия brassinosteroids предстояло выяснить, на каком этапе адаптации наиболее эффективно реализуется протекторное действие гормона (1) до действия стрессора (на этапе преадаптации); (2) во время действия стрессора или (3) после действия стрессора (на этапе восстановления).

Для ответа на поставленный вопрос исследовали защитное действие ЭБЛ при засолении на ювенильных (3-х недельных) растениях рапса, в среду культивирования которых добавляли (1) 175 мМ NaCl, (2) 10^{-10} М ЭБЛ или (3) 175 мМ NaCl совместно с 10^{-10} М ЭБЛ. Используемые в данных экспериментах концентрации NaCl и ЭБЛ были подобраны в предварительных опытах.

В качестве критериев ответа растений на солевое и гормональное воздействия использовали такие интегральные показатели, как рост побегов в высоту, площадь листовой поверхности, сырая и сухая биомассы. Как видно на

следующем рисунке (Рис. 5), 175 мМ NaCl примерно на 50 % от контроля ингибировал рост стебля, а ЭБЛ в оптимальных условиях не оказывал никакого воздействия. Предобработка растений в течение 7 дней ЭБЛ значительно снижала ингибирующее действие соли. При этом высота стебля составляла около 70 % от соответствующих показателей контрольных растений. Добавление ЭБЛ в питательную среду при засолении обнаруживало еще более выраженный защитный эффект, поскольку высота стебля в этом случае достигала 83-85% от контроля. Наконец, обработка растений гормоном после окончания солевого стресса сопровождалась интенсивным восстановлением ростовых процессов.

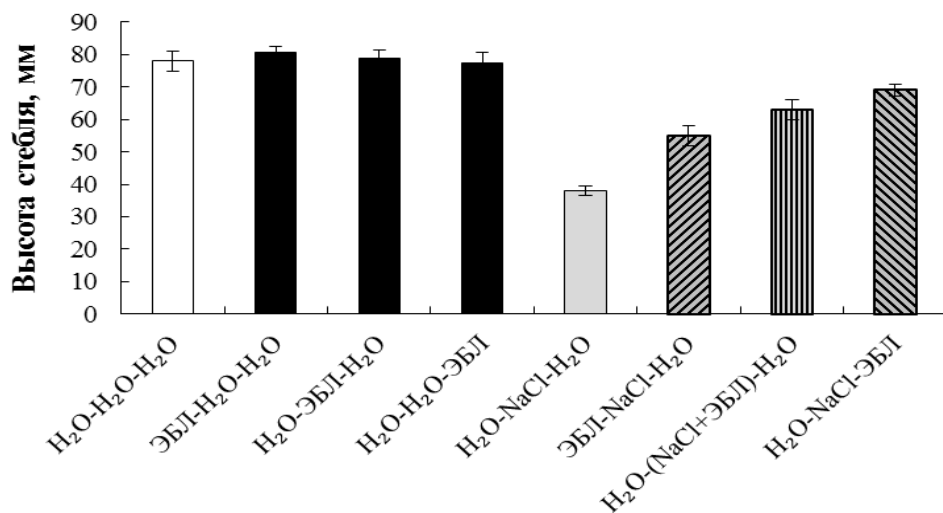


Рис. 5. Влияние 24-эпибрасинолида на рост побегов рапса на разных этапах солевого стресса.

Аналогичные результаты были получены и при оценке действия ЭБЛ на площадь листовой поверхности в условиях засоления и на аккумуляцию сухой (рис. 6) и сырой биомассы. Во всех этих случаях ЭБЛ оказывал наиболее сильный защитный эффект, когда действовал во время солевого стресса или на этапе восстановления, причем различия между этими вариантами были не достоверны.

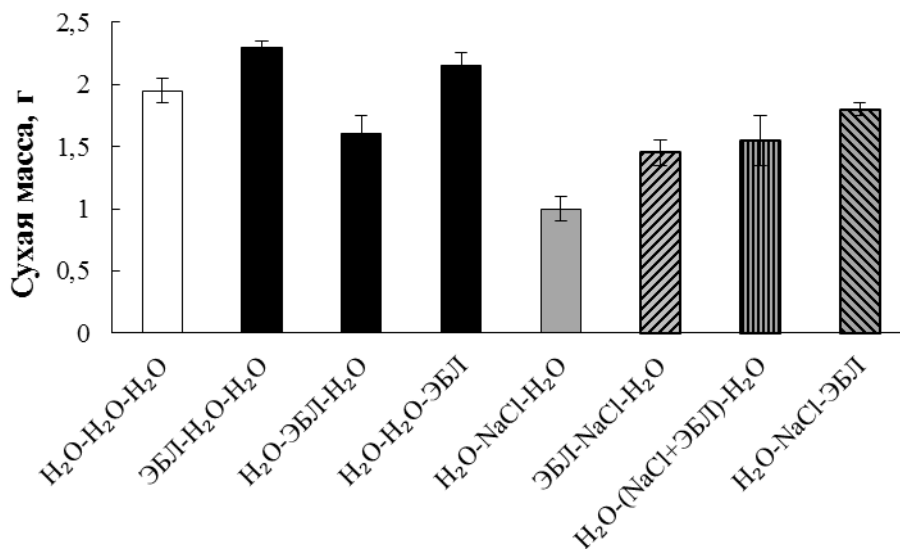


Рис. 6. Влияние 24-эпибрасинолида на накопление сухой биомассы растений рапса на разных этапах солевого стресса.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что экзогенный ЭБЛ снижал повреждающее действие NaCl на ростовые процессы не зависимо от того, на каком этапе стрессорного ответа проводили гормональную обработку растений: до, во время или после солевого воздействия. Наиболее сильный защитный эффект ЭБЛ проявлялся в том случае, когда гормон действовал во время или после солевого стресса. Это означает, что ЭБЛ активировал формирование или функционирование защитных систем во время засоления (и)или стимулировал репарационные процессы на этапе восстановления.

4. Исследование физиологических защитных механизмов 24-эпибрассинолида при ответе растений рапса на хлоридное засоление

4.1. Влияние ЭБЛ и NaCl на ростовые процессы

Ранее нами было показано, что 175 мМ NaCl негативно влиял на ростовые процессы рапса, а ЭБЛ снижал отрицательное действие солевого стресса, тем не менее, в данной серии экспериментов мы вынуждены были еще раз повторить ответ растений рапса на уровне ростовых процессов, чтобы была возможность изучать различные стрессорные реакции на одних и тех же растениях в одинаковых условиях эксперимента.

В соответствии с полученными нами данными 175 мМ NaCl подавлял рост растений в высоту на 33–35% по сравнению с контролем (Рис. 7) и вызывал значительное сокращение листовой поверхности (в 2.0–2.5 раза) (Рис.8).

Одним из основных показателей, характеризующих рост растений, является накопление биомассы. Сырую и сухую биомассу надземной части растений рапса оценивали на 7-е и 14-е сутки воздействия. Как следует из представленных данных, сырая и сухая масса растений по сравнению с контролем уменьшалась примерно в 2.5 и 2.0 раза соответственно (Рис. 9). ЭБЛ (10^{-10} М)

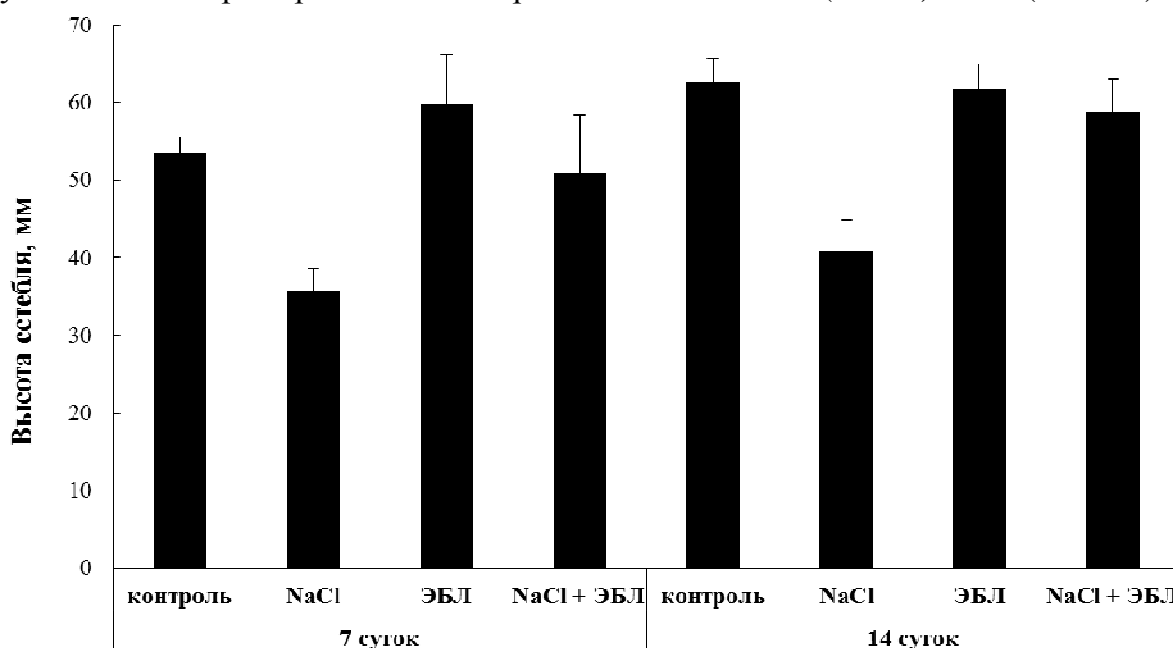


Рис. 7. Влияние 24-эпибрассинолида (10^{-10} М) и NaCl (175 мМ) на рост стебля растений рапса через 7 и 14 суток воздействия.

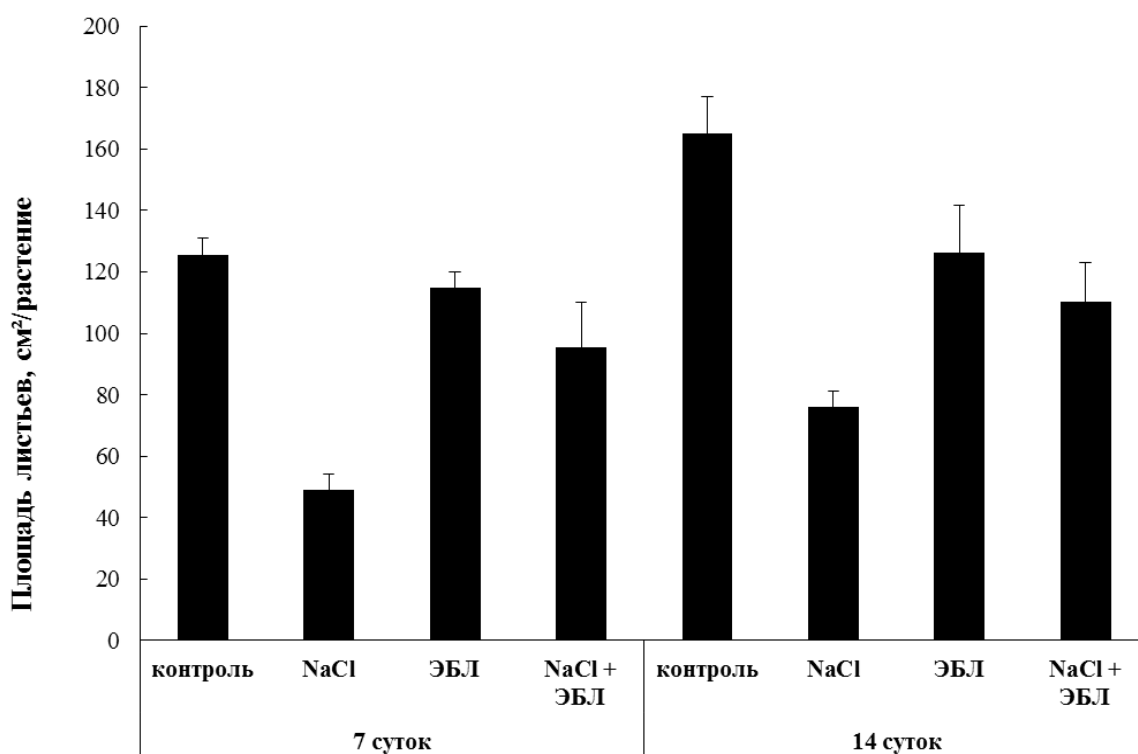


Рис. 8. Влияние 24-эпибрассинолида (10^{-10} М) и NaCl (175 мМ) на листовую поверхность одного растения через 7 и 14 суток воздействия.

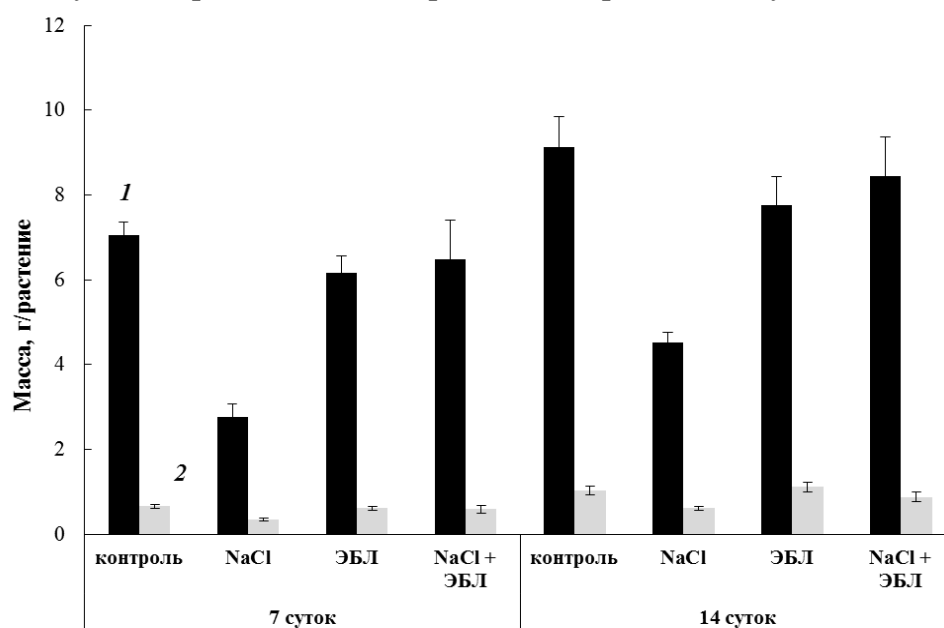


Рис. 9. Влияние ЭБЛ (10^{-10} М) и NaCl (175 мМ) на накопление сырой и сухой биомассы растениями рапса. 1 – сырая масса, 2 – сухая масса.

заметно снижал степень ингибирования роста растений. Так, рост стебля полностью восстанавливался (Рис. 7), ассимилирующая поверхность растений рапса увеличивалась до 67–76% от площади листьев контрольного варианта (Рис. 8), сырая и сухая масса достигала 85–92% от контрольных значений (Рис. 9). Тенденция к усилению протекторного эффекта ЭБЛ при засолении отмечена при увеличении продолжительности солевого воздействия (Рис. 7-9).

Полученные данные, таким образом, показывают, что NaCl тормозит ростовые процессы растений рапса, наиболее сильно ингибируя площадь листовой поверхности, накопление сырой и сухой биомассы и, в меньшей мере, - рост стебля в высоту. ЭБЛ оказывает выраженный защитный эффект.

4.2. Влияние 24-эпибрассинолида и хлоридного засоления на содержание фотосинтетических пигментов

Засоление оказывает негативное воздействие не только на рост, но и на процесс фотосинтеза и фотосинтетический аппарат растений, и, прежде всего, на биосинтез фотосинтетических пигментов (Chutipaijit et al., 2011). Нами показано (Рис. 10), что 175 мМ NaCl ингибировал содержание хлорофилла *a* и *b* на 26–31% и в 2 раза соответственно по отношению к контролю.

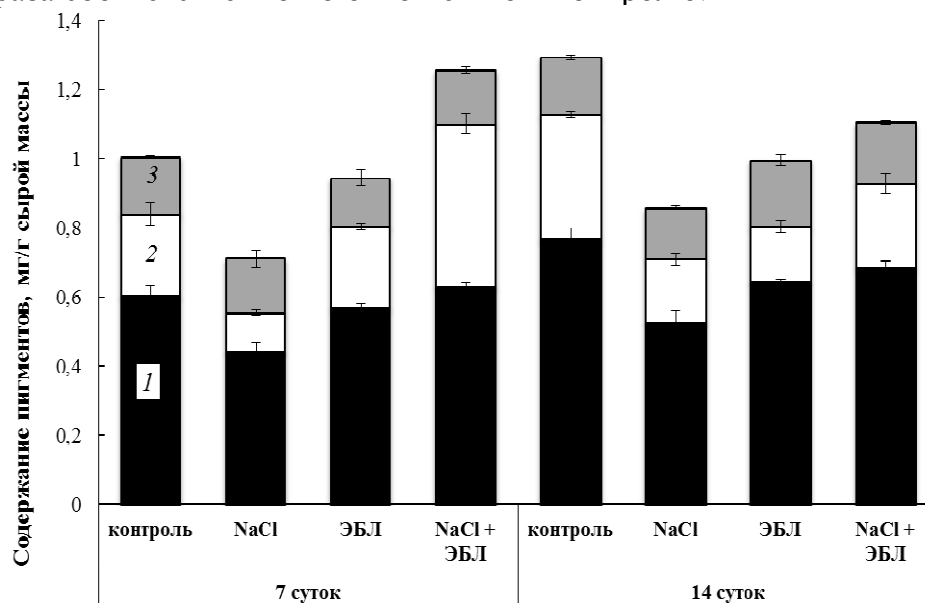


Рис 10. Влияние 24-эпибрассинолида (10^{-10} М) и NaCl (175 мМ) на содержание фотосинтетических пигментов в растениях рапса. Обозначения: 1 – хлорофилл *a*, 2 – хлорофилл *b*, 3 – каротиноиды.

Экзогенный ЭБЛ снимал ингибирующее действие засоления в отношении хлорофилла *a* и в 2 раза по сравнению с контролем повышал уровень хлорофилла *b* (Рис. 10). Содержание каротиноидов в листьях растений в присутствии 175 мМ NaCl, 10^{-10} М ЭБЛ или обоих этих факторов одновременно практически не отличалось от контрольных значений. Этим рапс как гликофит отличается от растений галофитов, которые при засолении накапливают каротиноиды, оказывающие выраженное антиоксидантное действие (Ozgun et al., 2013).

4.3. Влияние 24-эпибрассинолида и NaCl на водный статус растений

Помимо воздействия на рост и фотосинтетические пигменты засоление вызывает у растений развитие водного дефицита (Строгонов, 1962; Deinlein et al., 2014). При росте рапса в условиях засоления наблюдалось подвядание растений, что делало важным проведение оценки оводненности тканей и влияния ЭБЛ на водный статус.

Как следует из полученных данных (Рис. 11) в норме содержание воды в листьях контрольных растений рапса составляло 88,7-90,7%. При действии на

растения 175 мМ NaCl содержание воды в расчете на единицу сырой массы листа достоверно снижалось на 7-й день засоления на 3.27%, тогда как на 14-й день различие с контролем уменьшилось до 2.41% (рис. 11). ЭБЛ при солевом стрессе несколько повышал содержание воды в тканях (на 7-й день превышение над контролем составляло 0.33%, на 14-й – 1.08%).

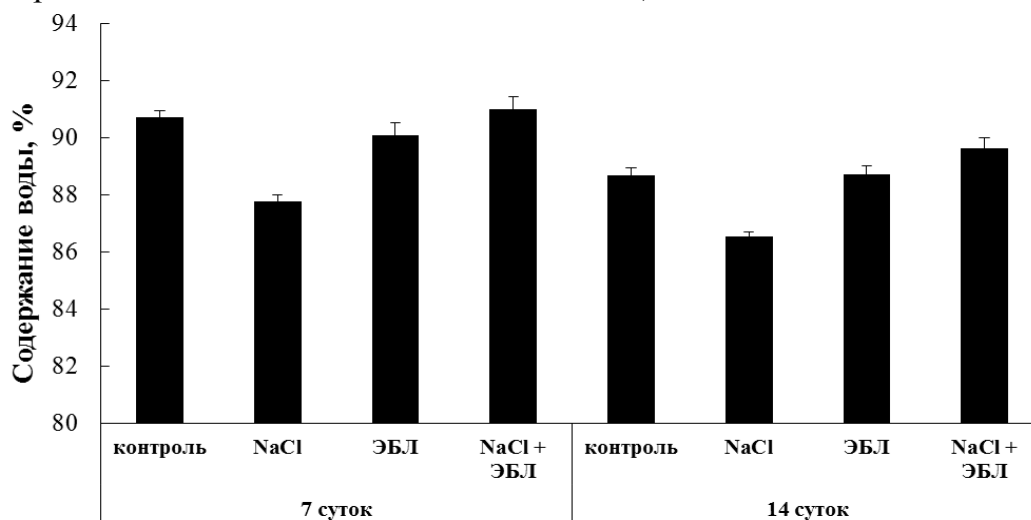


Рис. 11. Влияние 24-эпибрассинолида (10^{-10} М) и NaCl (175 мМ) на содержание воды в листьях в процентах от сырой биомассы через 7 и 14 суток воздействия.

4.5. Влияние NaCl и ЭБЛ на осмотический потенциал тканей листа

Нами показано (Рис. 12), что при засолении осмотический потенциал тканей листьев снижался почти до -2 МПа уже на 7 день воздействия 175 мМ NaCl и

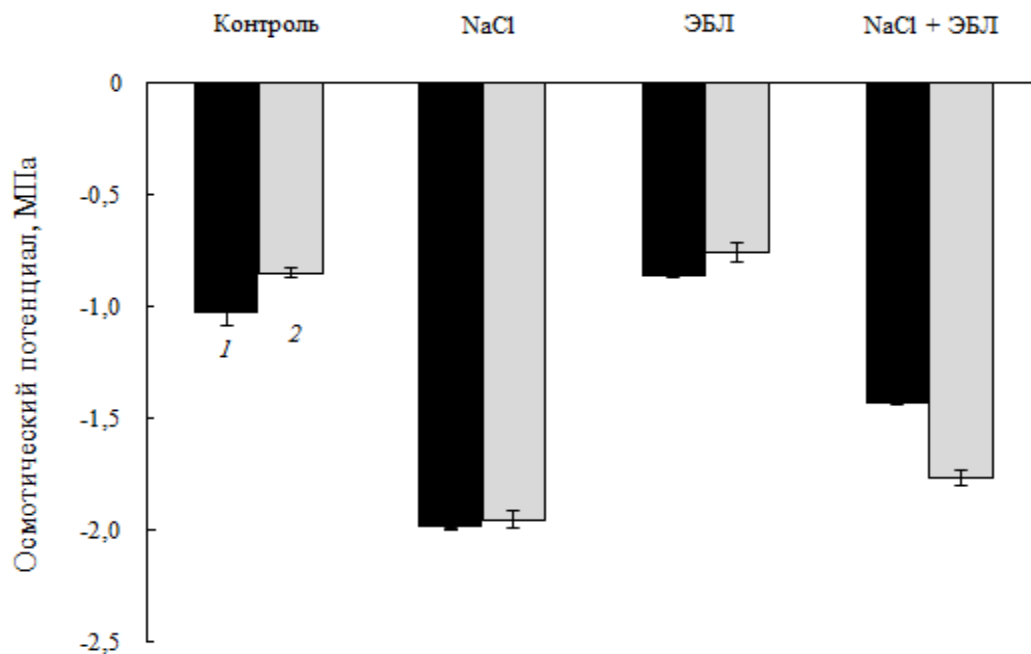


Рис. 12. Влияние 24-эпибрассинолида и NaCl (175 М) на осмотический потенциал клеточного содержимого растений рапса на 7 и 14 сутки воздействия.

сохранялся на этом уровне до конца опыта, что было на 0.96–1.11 МПа ниже по

сравнению с контрольными растениями. В нормальных условиях в присутствии ЭБЛ не наблюдалось достоверного изменения осмотического потенциал листьев, однако при совместном действии с NaCl ЭБЛ имело место снижение (на 0.19–0.55 МПа) NaCl-индуцированного падения осмотического потенциала.

4.6. Влияние NaCl и ЭБЛ на содержание Na^+ и K^+ в растениях рапса

Решающую роль в формировании осмотического потенциала у растений играют неорганические ионы, прежде всего Na^+ и K^+ . На рисунке 13 показано многократное увеличение содержания Na^+ (в 22,8 и 19,2 раза на 7-е и 14-е сутки воздействия NaCl соответственно) в листьях растений при засолении, что и объясняет наблюдаемое нами сильное падение осмотического потенциала содержимого клеток при стрессе (Рис. 12). Концентрация K^+ в ответ на засоление, напротив, снижалась в 17,9 и 15,5 раз на 7-е и 14-е сутки воздействия NaCl соответственно (Рис. 14).

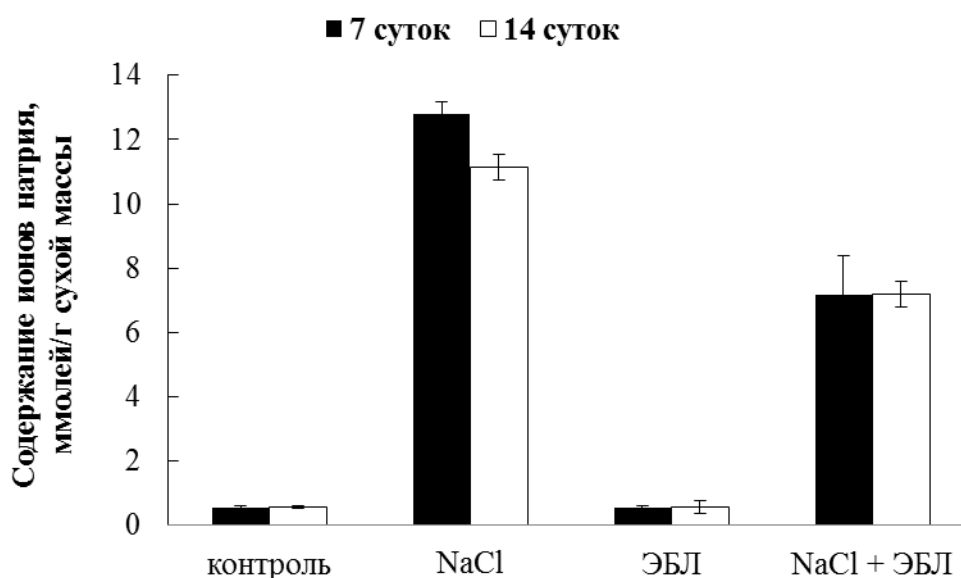


Рис. 13. Влияние совместного действия 24-эпибрасинолида и NaCl на содержание ионов натрия в тканях растений рапса.

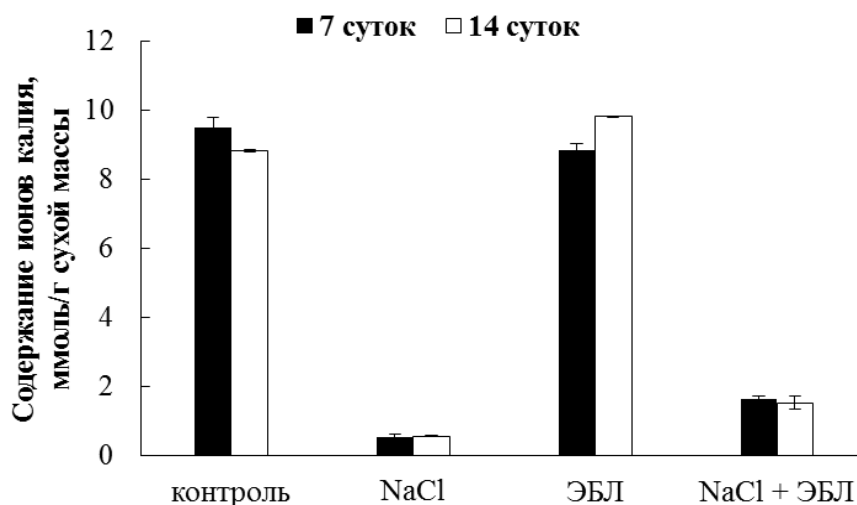


Рис. 14. Влияние совместного действия 24-эпибрасинолида и NaCl на содержание ионов калия в тканях растений рапса.

ЭБЛ не оказывал заметного влияния на концентрацию Na^+ и K^+ в тканях растений в нормальных условиях, тогда как при засолении снижал накопление Na^+ в тканях в 1,5-1,8 раз, и одновременно повышал содержание K^+ в 2,7-3,0 раза по сравнению с действием одного NaCl , что способствовало снижению токсического действия Na^+ на метаболизм, поддержанию гомеостаза и повышению устойчивости растений к солевому стрессу. Можно предполагать, что способность ЭБЛ повышать осмотический потенциал клеточного содержимого и регулировать содержание ионов в тканях опосредовано его регуляторным действием на транспортные системы клетки, обеспечивающие трансмембранный перенос ионов натрия и калия.

4.7. Влияние NaCl и ЭБЛ на аккумуляцию пролина

Для поддержания водного гомеостаза между основными внутриклеточными компартментами цитоплазмы и вакуолью в условиях засоления важная роль принадлежит совместимым осмолитам, одним из которых является пролин.

В листьях растений рапса контрольного варианта содержание пролина составляло лишь 0.4 мкмоль/г сырой массы; ЭБЛ практически не влиял на его содержание. Засоление в течение 7 суток увеличивало уровень пролина в 43 раза, а в течение 14 суток - в 52 раза (табл. 1). Добавление в среду ЭБЛ снижало NaCl -индуцированное накопление пролина.

Таблица 1. Влияние 10^{-10} М 24-эпибрасинолида и 175 мМ NaCl на содержание свободного пролина в растениях рапса через 7 и 14 суток воздействия.

Вариант	Содержание свободного пролина, мкмоль/г сырой массы	
	7 суток	14 суток
Контроль	0.39 ± 0.40	0.40 ± 0.02
NaCl	16.65 ± 1.10	21.01 ± 1.33
ЭБЛ	0.63 ± 0.01	0.68 ± 0.01
$\text{NaCl} + \text{ЭБЛ}$	11.34 ± 0.08	7.13 ± 0.11

Известно, что пролин реализует защитное действие, выступая в качестве «химического» шаперона (Yan et al., 2006), стабилизируя функциональные мембранные комплексы, поддерживая нативную конформацию макромолекул, а также вовлекаясь в тушение АФК (Heuer, 2003). Весьма вероятно, что растения рапса предотвращают массовое разрушение хлорофилла *a* и *b* при засолении за счет интенсивной аккумуляции пролина. Несмотря на то, что при совместном действии NaCl и ЭБЛ гормон снижал содержание пролина по сравнению с воздействием одной соли, его уровень, тем не менее, в 17–29 раз превышал контрольный, что, вероятно, являлось достаточным для стабилизации уровня фотосинтетических пигментов (табл. 1).

Помимо участия в осморегуляции и проявления ряда других биологических эффектов пролин является антиоксидантом. Засоление вызывает окислительный стресс. Это делает важной оценку уровня NaCl -индуцированного окислительного стресса в растениях и содержания антиоксидантов иной природы.

4.8. Влияние ЭБЛ на интенсивность перекисного окисления липидов у растений рапса при засолении

Засоление оказывает не только прямое токсическое действие на метаболизм, но и стимулирует образование АФК. Основная причина окислительного стресса в этом случае связана с закрыванием устьиц, снижением доступности CO_2 , что сопровождается интенсивной генерацией АФК (Schmitt et al., 2014; Ahmad et al., 2010).

Как видно из данных, представленных на рисунке 15, засоление повышало уровень МДА на 42%, что свидетельствовало о развитии в растениях окислительного стресса, тогда как внесение ЭБЛ совместно с 175 мМ NaCl снижало содержание МДА практически до контрольного уровня. На этом основании можно было предположить, что ЭБЛ стимулирует накопление органических антиоксидантных соединений, отличных от свободного пролина.

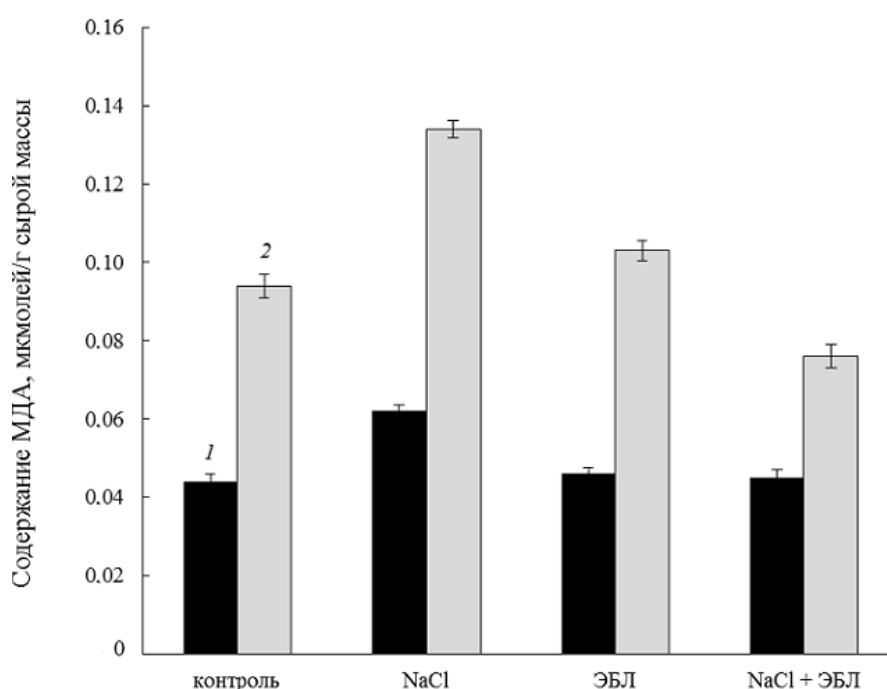


Рис. 15. Влияние 24-эпибрассинолида и NaCl на интенсивность перекисного окисления липидов в растениях рапса через 7 и 14 суток от начала воздействия. 1 – 7 суток, 2 – 14 суток.

4.9. Влияние 24-эпибрассинолида на аккумуляцию общих низкомолекулярных фенольных соединений, в том числе флавоноидов

При солевом стрессе растения рапса обнаруживают NaCl-зависимое накопление низкомолекулярных фенольных соединений (табл. 2). Известно, что низкомолекулярные фенольные соединения, являясь водорастворимыми антиоксидантами, эффективно нейтрализуют АФК. Наличие у фенольных соединений антиоксидантных свойств связано с их способностью выступать в качестве источников водорода, восстановителей и тушителей $^1\text{O}_2$ (Sakihama et al., 2002; Zrig et al., 2011).

Внесение ЭБЛ в среду в отсутствие NaCl достоверно не влияло ни на общее содержание низкомолекулярных фенольных соединений, ни на содержание флавоноидов в растениях. Напротив, при засолении содержание низкомо-

лекулярных фенольных соединений, в том числе флавоноидов, возросло в 1.9–2.7 раза над значениями контрольных растений (табл. 2).

Таблица 2. Влияние ЭБЛ и NaCl на содержание низкомолекулярных фенольных соединений в растениях рапса через 7 и 14 суток воздействия.

Вариант	Содержание фенольных соединений, мкг/г сырой массы	
	7 суток	14 суток
<i>Общие низкомолекулярные фенольные соединения</i>		
Контроль	9.87 ± 0.42	9.03 ± 0.21
NaCl	19.28 ± 1.30	16.94 ± 0.37
ЭБЛ	8.74 ± 0.08	7.80 ± 0.37
NaCl + ЭБЛ	14.54 ± 0.79	12.50 ± 0.13
<i>Флавоноиды</i>		
Контроль	2.79 ± 0.14	2.69 ± 0.26
NaCl	6.34 ± 0.14	5.50 ± 0.05
ЭБЛ	2.76 ± 0.06	2.41 ± 0.04
NaCl + ЭБЛ	5.21 ± 0.27	3.22 ± 0.10

При совместном действии 175 мМ NaCl и ЭБЛ общее содержание низкомолекулярных фенольных соединений также было повышенным в сравнении с контрольным уровнем, однако ЭБЛ заметно снижал (на 43–64 %) их NaCl-индуцированную аккумуляцию. Не смотря на это, экзогенный ЭБЛ проявлял выраженный антиоксидантный эффект в условиях засоления (Рис. 15). Отсюда следует предположение, что антиоксидантное действие ЭБЛ в условиях солевого стресса в растениях рапса реализуется не через регуляцию накопления низкомолекулярных фенольных соединений и(или) пролина, а через иные компоненты клеточной антиоксидантной системы.

4.10. Влияние NaCl и экзогенного ЭБЛ на содержание эндогенных brassinosteroidов в растениях рапса

Как следует из представленных выше экспериментальных данных, экзогенный ЭБЛ повышал солеустойчивость растений рапса, вовлекаясь в регуляцию окислительного стресса, ионного гомеостаза, водного статуса. Можно было ожидать, что на действие засоления растения отвечают изменением эндогенного содержания и баланса brassinosteroidов, обеспечивающих формирование стресс-защитных систем. Для проверки этого предположения нами было проанализировано содержание основных групп brassinosteroidов, отличающихся как по количеству атомов углерода в молекуле – C28 (brassinolid и 24-эпibrassinolid) и C29 (28-гомобрassinolid), так и по конфигурации заместителей в боковой цепи – 24S-метил (brassinolid), 24R-метил (24-эпibrassinolid) и 24S-этил (28-гомобрassinolid).

Исследования динамики эндогенных brassinosteroidов были выполнены совместно с лабораторией стероидных гормонов Института биоорганической химии академии наук Республики Беларусь.

Как видно из рисунка 16, уровень brassinosteroidов в листьях рапса в значительной степени зависел от возраста растений. Самое высокое содержание фитогормонов отмечено у 26-дневных растений (исходный контроль), тогда как че-

рез 7 и 14 суток после этого момента концентрация гормонов снижалась. Интересно, что эпибрассиностероиды были преобладающими в 4-недельных растениях, где их содержание было в 3 и 4 раза выше, чем брассиностероиды и гомобрассиностероиды (рис. 17). На воздействие 175 мМ NaCl растения отвечали увеличением уровня всех анализируемых групп гормонов; этот эффект значительно усиливался через 14 суток солевого воздействия. Внесение в питательную среду ЭБЛ снижало NaCl-обусловленную аккумуляцию эпибрассиностероидов, брассиностероидов и гомобрассиностероидов.

Одним из возможных объяснений данного явления может быть подавление экзогенным гормоном биосинтеза эндогенных брассиностероидов, в пользу чего свидетельствует тот факт, что у брассиностероидов существует регуляция их биосинтеза по типу обратной связи на уровне четырех ферментов (CPD, DWF4, ROT3 и BRbox). Кроме того, известно, что любой процесс в растительной клетке одновременно регулируется несколькими фитогормонами. Это делает крайне важным поддержание определенного гормонального баланса в организме, от которого зависит реализация специфики регуляторного действия каждого из фитогормонов (Kudryakova et al., 2013).

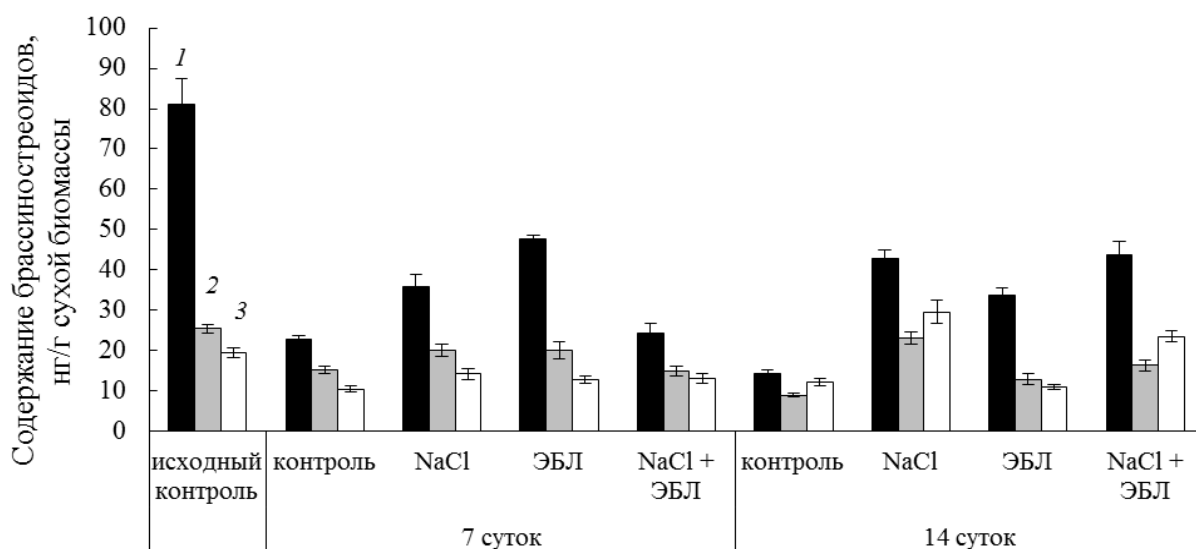


Рис. 16. Влияние 24-эпибрассинолида и NaCl на эндогенный уровень некоторых брассиностероидов в растениях рапса через 7 и 14 суток от начала воздействия. Обозначения: 1 – ЭБ (24-эпибрассиностероиды), 2 – БЛ (24S-метилбрассиностероиды), 3 – ГБ (28-гомобрассиностероиды).

Влияние экзогенного ЭБЛ в отсутствие засоления выражалось в увеличении его эндогенного уровня в два раза; содержание гормонов ряда брассиностероидов и 28-гомобрассиностероидов при этом практически не увеличивалось.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствуют о том, что засоление стимулировало накопление в растениях эндогенных 24-эпибрассиностероидов, 28-гомобрассиностероидов и 24S-метилбрассиностероидов. Это делает вероятным их вовлечение в регуляцию формирования солеустойчивости через снижение интенсивности окислительного стресса, опосредованное регуляцией ионного гомеостаза

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное исследование позволило показать, что засоление подавляло рост растений в высоту, сокращало листовую поверхность, уменьшало сырую и сухую массу, снижало оводненность тканей и содержание хлорофиллов *a* и *b*. На действие NaCl растения реагировали развитием окислительного стресса, падением осмотического потенциала клеточного содержимого (до -2 МПа), аккумуляцией пролина и низкомолекулярных фенольных соединений. Наблюдалась NaCl-зависимая аккумуляция эндогенного содержания 24-эпибрассиностероидов, 24S-метилбрассиностероидов и 28-гомобрассиностероидов, что косвенно говорит о вовлечении брассиностероидов в повышение солеустойчивости.

Экзогенный ЭБЛ, введенный в питательную среду до, во время или после солевого воздействия, снижал повреждающее действие NaCl на ростовые процессы. Наиболее сильный защитный эффект ЭБЛ проявлялся при действии гормона во время или после солевого стресса. Это означает, что ЭБЛ вызывал формирование или функционирование защитных систем во время засоления (и)или стимулировал репарационные системы на этапе восстановления. ЭБЛ при солевом стрессе проявлял выраженный защитный эффект (полностью восстанавливал рост стебля, увеличивал ассимилирующую поверхность, в значительной степени восстанавливал сырую и сухую массу, снимал ингибирующее действие NaCl на фотосинтетические пигменты). Стресс-защитный эффект брассиностероидов обнаруживался также и на начальных этапах развития.

Существенно, что ЭБЛ тормозил развитие NaCl-зависимого перекисного окисления липидов. Высказано предположение, что протекторный эффект ЭБЛ в условиях солевого стресса обусловлен его антиоксидантным действием, которое не связано с гормон-индуцируемой аккумуляцией пролина и низкомолекулярных фенольных соединений, а, возможно, вызвано активацией антиоксидантных ферментов или накоплением органических соединений иной природы. Антиоксидантный эффект ЭБЛ на растения рапса в условиях засоления может быть опосредован его регуляторным воздействием на ионный гомеостаз, в частности, на функционирование транспортеров Na^+ и K^+ . Об этом свидетельствует тот факт, что ЭБЛ снижал массовое поступление в растение Na^+ и несколько стабилизировал внутриклеточное содержание K^+ при солевом стрессе. Следствием подобного гормонального эффекта может быть снижение токсического действия Na^+ , стабилизация клеточного метаболизма и, как результат, снижение интенсивности регенерации АФК. Именно снижением ЭБЛ окислительного стресса в растениях при засолении можно объяснить наблюдаемое нами ингибирование ЭБЛ NaCl-индуцированного накопления свободного пролина и низкомолекулярных фенольных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами, а также защитный эффект ЭБЛ на фотосинтетические пигменты.

ВЫВОДЫ

1. Солевой стресс ингибировал прорастание семян и рост проростков рапса. Из трех наиболее биологически активных стероидных фитогормонов (брассинолид, 28-гомобрассинолид и 24-эпибрассинолид) максимальный защитный

эффект на прорастание семян в условиях засоления оказывал брассинолид, на ростовые процессы - 24-эпибрассинолид (10^{-10} – 10^{-9} М).

2. Ювенильные растения рапса отвечали на интенсивный солевой стресс (175 мМ NaCl) целым комплексом физиологических реакций: торможением (на 33–35%) роста в высоту, сокращением (в 2.0–2.5 раза) листовой поверхности, уменьшением сырой и сухой массы (в 2.5 и 2.0 раза соответственно), снижением оводненности тканей и содержания хлорофиллов *a* и *b* (на 26–31% и в 2.0 раза соответственно), развитием окислительного стресса, аккумуляцией Na^+ и снижением содержания K^+ , сильным падением (до –2 МПа) осмотического потенциала, интенсивной аккумуляцией (в 43–52 раза) пролина и низкомолекулярных фенольных соединений (в 1.9–2.7 раза).

3. Растения рапса в ответ на засоление увеличивали содержание эндогенных стероидных гормонов: 24-эпибрассиностероидов, 24S-метилбрассиностероидов и 28-гомобрассиностероидов, что косвенно свидетельствует в пользу вовлечения брассиностероидов в повышение их солеустойчивости растений.

4. Защитный эффект 24-эпибрассинолида (ЭБЛ) проявлялся на разных этапах ответа растений на засоление, однако наибольший протекторный эффект гормона на ростовые процессы (рост стебля, увеличение площади листьев, аккумуляция сырой и сухой биомассы) наблюдался на этапах солевого стресса и репарации. Это позволяет предполагать, что ЭБЛ, активирует защитные системы организма во время повреждающего действия фактора или вовлекается в репарацию клеточного метаболизма на этапе восстановления.

5. В условиях засоления экзогенный ЭБЛ (10^{-10} М) снижал интенсивность окислительного стресса, практически полностью восстанавливал рост стебля, увеличивал ассимилирующую поверхность растений (до 67–76%), сырую и сухую биомассы (до 85–92 % от контрольных значений), снижал ингибирующее действие соли на фотосинтетические пигменты, повышал осмотический потенциал, ингибировал NaCl-индуцированную аккумуляцию пролина и низкомолекулярных фенолов, заметно снижал массовое поступление в растение Na^+ и несколько стабилизировал внутриклеточное содержание ионов калия.

6. На основании полученных данных высказано предположение, что в основе защитного эффекта ЭБЛ при солевом стрессе лежит его антиоксидантное действие, которое опосредовано снижением токсического действия Na^+ и повышением содержания K^+ , следствием чего является падение скорости регенерации АФК. Другой причиной проявления антиоксидантного эффекта ЭБЛ может быть активация гормоном антиоксидантных ферментов и аккумуляция органических антиоксидантов, отличных от пролина и низкомолекулярных фенолов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации из списка, рекомендуемого ВАК:

1. **Хасан Д.**, Ковтун И.С., Ефимова М.В. Влияние хлоридного засоления на прорастание семян и рост проростков *Brassica napus* L. // «Вестник Томского государственного университета. Биология». № 4 (16). 2011. С. 108-113.

2. Ефимова М.В., **Хасан Ж.**, Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Влияние брассиностероидов на прорастание семян и рост рапса на начальных этапах онтогенеза при хлоридном засолении // *Вестник РУДН, серия «Агронимия и животноводство»*, 2012. С. 12-20.

3. Ефимова М.В., Савчук А.Л., **Хасан Дж.А.К.**, Литвиновская Р. П., Хрипач В.А., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Физиологические механизмы повышения солеустойчивости растений рапса брассиностероидами // *Физиология растений*. 2014. Т. 60. №6. С. 778-788.

4. Ефимова М.В., **Хасан Ж.** Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Способ повышения устойчивости растений рапса к интенсивному хлоридному засолению. Патент на изобретение №. 2522519. Заявка № 2013105036.т Приоритет изобретения 06.02.2013. Зарегистрировано в Госреестре изобретений РФ от 20.05.2014 г.

Публикации в иных изданиях:

5. **Хасан Д.**, Ковтун И.С., Керимов Ф., Кравец В.С., Ефимова М.В. Влияние хлоридного засоления на прорастание семян и рост проростков *Brassica napus* L. // Тезисы Международной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 5-9 сентября 2011г. Томск. С. 97-98.

6. **Хасан Д.**, Ефимова М.В., Ковтун И.С. Влияние хлоридного засоления на прорастание семян и рост проростков рапса // Материалы IV Международной конференции "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». 22-25 сентября 2011 г. Ростов-на-Дону. С. 202-203.

7. Efimova M.V., **Hasan J.**, Kholodova V.P., Kusnetsov V.V., Khripach V.A., Kuznetsov V.I.V. Effect of epibrassinolide on plastid genome transcription of rape plants under long-term salinity // Abstract of XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology. 29 July – 3 August, 2012. Germany, Freiburg. P. 318-319.

8. **Хасан Ж.А.К.** Действие эпибрассинолида на содержание фотосинтетических пигментов в растениях *Brassica napus* L. в условиях засоления. XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, 2012). С. 248-249.

9. Ефимова М.В., **Хасан Ж.** Влияние брассиностероидов на прорастание и рост рапса при хлоридном засолении // Тезисы VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой». 25-27 сентября. 2012. Саратов. С. 69.

10. Ефимова М.В., **Хасан Ж.**, Хрипач В.А., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Физиологические механизмы защитного действия эпибрассинолида у растений рапса при засолении // Тезисы Годичного собрания ОФР и Всероссийской конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений». 2-6 июня 2013 г. Москва. С. 268.