

О вероятности антистрессового действия брассиностероидов посредством изменения состояний плазматических мембран клеток растений

Кем К. Р.^А, Ламан Н. А.^А

^А *Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, ул. Академическая 27, Беларусь. E-mail: kem-666@mail.ru*

Брассиностероиды (БС) – класс растительных стероидных гормонов, характеризующихся полигидроксированными структурами стерола со значительными показателями ростостимулирующей активности, поддерживающие функционирование иммунной системы растений, особенно, в условиях действия стрессовых факторов: при пониженных температурах, заморозках, засолении и затоплении почвы, засухе, болезнях, действии пестицидов и др. [1]. Общепринято представление, что брассиностероиды являются одним из компонентов фитогормональной системы растений. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что они вступают во взаимодействие с другими гормонами растений, увеличивают содержание абсцизовой кислоты [2], но при этом, оказывают неоднозначное воздействие на уровень ауксинов [3], гиббереллинов и цитокининов [4].

Выраженный ростостимулирующий эффект БС был выявлен с момента их открытия. В дальнейшем были проведены серии биотестов для определения их специфической биологической активности. Во всех исследованных биотестах БС были активны в чрезвычайно низких концентрациях (10^{-6} - 10^{-12} М), что отличает их от других групп фитогормонов. Однако в ряде тест-систем, применяемых при исследовании других групп фитогормонов, БС проявляли типичный эффект для того или иного гормона, в других же случаях обнаруживали противоположную направленность действия или вовсе не проявляли какого-либо эффекта. Такие противоречивые данные заставили научное сообщество обратить более пристальное внимание на механизм действия брассиностероидов и сделать предположение о возможном эпигенетическом уровне воздействия БС на физиолого-биохимические процессы клеток растений [5].

Одно из таких предположений связано с тем, что БС, как высокоокисленная форма стероидов, могут быть компонентами структуры клеточных мембран. Известно, что стероиды, глицеролипиды и сфинголипиды являются основными липидами растительных мембран. При этом стероидный состав сложен и многообразен и характеризуется обширным спектром функций в жизни растений, включающим воздействие на саму структуру мембраны и ее лабильность в стрессовых условиях. В проведенных ранее опытах по изучению мембранных стероидов живых клеток с помощью био-

физических методов было показано, что холестерин экранирует отрицательные заряды и таким образом снижает поверхностный заряд мембраны [6]. Это способствует более плотной компоновке углеводородных цепей в фазе геля, а значит, и к дополнительному повышению вязкости мембраны и снижению ее проницаемости. Важным является и то, что стеринны – это химические предшественники БС. Известно, что они принимают активное участие в элонгации клеток растений и процессах морфогенеза, клеточном делении, в модуляции гормональных ответов, а также в реакции клеток на стрессовые воздействия, в том числе, при угрозе патогенных микроорганизмов [7].

Также существуют многочисленные данные о том, что brassinosterоиды изменяют активность ферментов, мембранный потенциал, активируют синтез белков и нуклеиновых кислот, изменяют состав аминокислот и жирных кислот, вызывают сдвиги в балансе других эндогенных гормонов, тем самым стимулируя удлинение и деление клеток [8]. Такие изменения на уровне целого растения выражаются в усилении роста и повышении устойчивости и продуктивности.

Другое предположение о негеномном действии brassinosterоидов связано со специализированными доменами мембран, такими как липидные рафты (плоты) и белково-гликопротеиновые комплексы. Известно, что биологические мембраны являются латерально неоднородными и включают субкомпарменты, отличающиеся по биофизическим свойствам и составу. Поэтому для унификации описания физико-химического принципа, подтверждающего латеральную мембранную гетерогенность, и была предложена гипотеза мембранных (липидных) рафтов [9].

В настоящее время понятие «мембранные рафты» определяют как динамическую наноразмерную, обогащенную стеринами и сфинголипидами, упорядоченную ассоциацию специфических белков, в которой метастабильное состояние покоя может быть активировано специфическими липид-липидными, белок-липидными и белок-белковыми взаимодействиями. В настоящее время появляется множество литературных данных, подтверждающих, что эти такие структуры придают боковое разделение мембранным белкам, способствуя пространственной организации и регулированию мембранных протеинов, влияющих на многие жизненно важные клеточные процессы. Также рафты могут взаимодействовать друг с другом, регулируя проведение сигнала снаружи внутрь клетки, вызывая при этом разнообразные ответные реакции от активации клеточного деления до апоптоза [10].

Анализ полученных нами и имеющихся в литературе экспериментальных данных позволяет высказать предположение, что brassinosterоиды, как высокоокисленная форма стерина – компонентов клеточных

мембран, определяющих их свойства, могут также осуществлять регулирование биохимических процессов несколькими путями одновременно. Такое действие может осуществляться за счет регулирования биосинтеза стерина через связывание с гипотетическим рецептором, аналогом LXR-рецептора животных [11]. В результате изменения стеринового состава мембраны повышается ее функциональная стабильность в условиях стресса. Возможно также, что брассиностероиды способны действовать на клеточные мембраны путем, не связанным с экспрессией генов, необходимых для адаптации организма, а за счет встраивания в структуру и прямого влияния на физиологическое состояние мембран, изменяя при этом их текучесть (вязкость) и проницаемость.

По итогам анализа и обобщения литературных данных, а также накопленного собственного экспериментального материала, было выдвинуто предположение, что серия экспериментов, касающихся изучения особенностей ответных реакций проростков растений на обработку экзогенными брассиностероидами на фоне стресса может дать дополнительные сведения в пользу гипотезы об их эпигенетическом действии.

Материалы и методы. Объектами исследования были семена и проростки льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) сорта Ласка, и Грант и ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Радзимич. Насыщенные спиртовые растворы брассиностероидов (10^{-5} М) были любезно предоставлены лабораторией химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси. Методом разбавления с шагом 1,25 раза был получен диапазон концентраций от 10^{-5} М до 10^{-9} М в 1%-ном водном растворе пленкообразователя Гисинар.

На основе результатов предыдущих исследований был сделан вывод о том, что концентрацией стрессоров, наиболее удобной для экспериментов является та, при которой ингибирование роста корневой системы проростков относительно оптимального контроля составляет около 40- 60% [12]. С учетом этого, концентрация N-фосфонометилглицина в опытах составляла $5,1 \cdot 10^{-4}$ М, метсульфурон-метила $6,0 \cdot 10^{-5}$ М и хлорида натрия 0,5% соответственно. Опыт включал 42 варианта в двукратной повторности, 40 вариантов БС и два контроля в четырехкратной повторности – контроль-1 (1%-ный р-р Гисинара) и контроль-2 (ингибирующая доза химического стрессора, без добавления брассиностероидов). Инкрустацию семян проводили вручную в стеклянной посуде. Расход рабочего раствора – 20 мкл/г семян. Проращивали семена в бумажных рулонах по методике проращивания плоских и мелких семян, описанной в [13]. Рулоны выдерживали 2 суток в термостате ТПС-2 при постоянной температуре 22°C, на 3-е сутки выставляли в условия искусственного освещения интенсивностью 7,5 тыс. люкс (16 ч – свет, 8 ч – темнота). Измерения длины

корня и надземной части проводили на 7 и 9-ые сутки. Для определения биометрических показателей при каждом измерении брали по 15 проростков из каждого варианта и по 30 проростков из контролей. Статистическая обработка проводилась с помощью стандартного пакета Excel.

Согласно полученным нами данным, во всех сериях экспериментов обнаруживается однотипность ростовых реакций на стрессоры различных химических групп, а также относительно низкие предельные значения превышения над контролем в вариантах, где различные по химической структуре БС используются на фоне стрессового фактора. Так, в каждом конкретном случае обнаруживалось, что протекторное действие БС было на уровне не более 25% (по сравнению с контролем без БС), что может свидетельствовать о лимитированной возможности для реализации адаптогенного потенциала (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность действия brassinosterоидов внутри диапазонов «активных концентраций» на фоне химического стресса

№ п.п.	Браcсиностероид	Показатели максимального усиления (+) или ослабления (-) ингибирующего эффекта N-фосфонометилглицина brassinosterоидами в сравнении с контролем (без БС) внутри диапазона «активных концентраций», %	
		Яровой ячмень (сорт Радзимич)	Лен-долгунец (сорта Ласка и Грант)
1	Браcсинолид	-17,8	+13,8
2	Гомобраcсинолид	-20,0	+16,8
3	Эпибраcсинолид	-12,1	+20,9
4	Кастастерон	-16,7	+24,3
5	Гомокастастерон	-24,7	+19,2
6	Эпикастастерон	-18,1	+18,3

Этот факт согласуется с предположением о том, что протекторное действие БС осуществляется посредством эпигенетического изменения свойств и/или биохимического состава клеточных мембран, так как именно в этом случае антистрессовое действие БС будет ограничено пределами, в которых «от» и «до» может проявляться лабильность физиологического состояния мембран.

О негеномном действии brassinosterоидов может свидетельствовать также факт, что протекторная активность данных соединений на фоне химического стресса проявляется в узком диапазоне концентраций. Так, при изучении действия БС (в данном случае ЭБЛ) на рост проростков льна-долгунца на фоне стресса, вызванного N-фосфонометилглицином, метсульфурон-метилом и солью NaCl, в каждом из экспериментов был обнаружен диапазон концентраций БС, где присутствовал выраженный ан-

тистрессовый эффект. Отмечено, что наиболее чувствительными к действию стрессора и brassinостероидного компонента оказались ростовые процессы корневой системы. Соответственно, были построены кривые зависимости доза-эффект в действии БС на линейный рост корней проростков на фоне каждого стрессора, используемого в эксперименте (рис. 1).

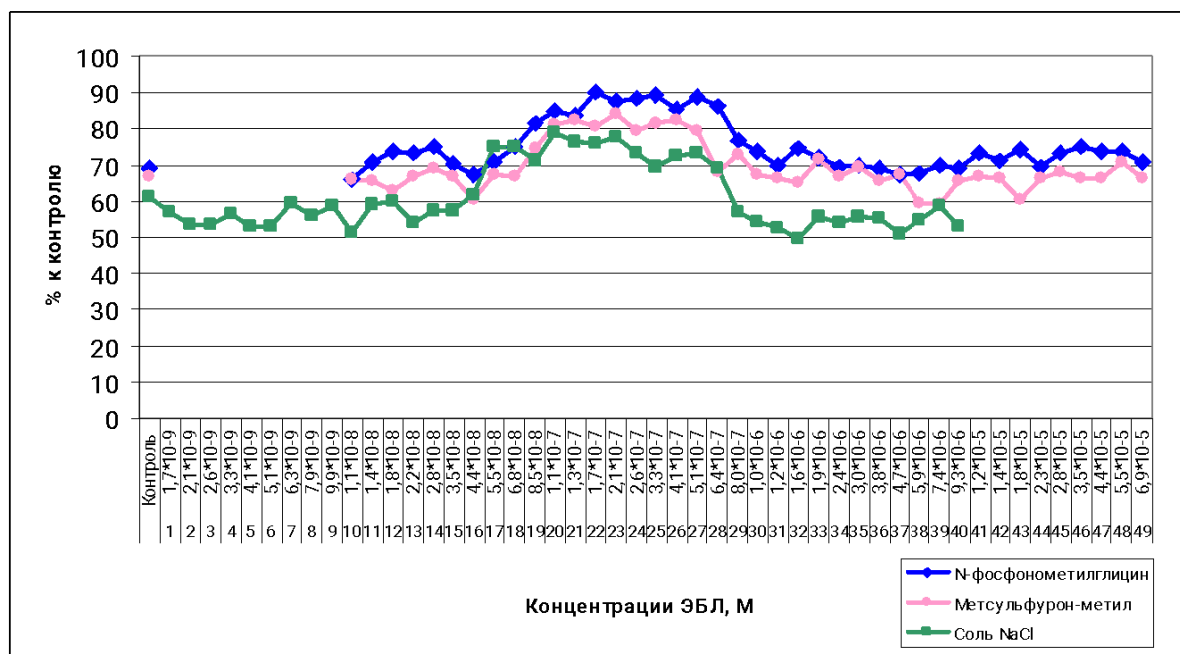


Рис. 1. Зависимость длины корня от концентрации ЭБЛ у проростков льна-долгунца сорта Грант на фоне химического стресса

На графике отчетливо видны диапазоны концентраций эпибрасинолида, в которых он ослабляет ингибирующее действие стрессоров на рост корневой системы проростков. Данные диапазоны практически совпадают – активность БС проявляется в дозе 10^{-8} – 10^{-7} М, а изменение концентраций внутри диапазонов составляет от 6 до 11,7 раза. Предположительно, это обусловлено действием brassinостероидов на клеточную мембрану – либо непосредственно на ее структурные компоненты, либо через функциональную регуляцию ионных каналов. В таком случае, к примеру, может повышаться вязкость цитоплазмы клеток, что способствует лучшей адаптации к неблагоприятным факторам или усиливаться аккумуляция сахаров внутри клетки, что также положительно влияет на толерантность растения к стрессу.

Стоит отметить, что объекты исследования генетически разнородны и, соответственно, имеют различные защитные механизмы, направленные на противостояние неблагоприятным факторам. Однако в наших исследованиях выявлена идентичная реакция растений на стрессоры химической

природы в присутствии brassinosterоидов. Таким образом, можно сделать вывод о том, что в данном случае генетические различия не имеют значения, а действие БС осуществляется на эпигенетическом уровне – посредством изменения свойств и состояний клеточных мембран. Такие изменения всегда имеют определенные пределы, обусловленные физиологическими возможностями растительной клетки. Поэтому негеномное действие БС в таких случаях будет строго детерминировано, что и подтверждается результатами проведенных экспериментов.

Библиографические ссылки

1. Khripach, V. A. Brassinosteroids – A New Class of Plant Hormones / V. A. Khripach, V. N. Zhabinskii, Ae. De Groot. – Academic Press, 1999. – 456 p.
2. Divi, U.K. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis show interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathway / U. K. Divi, T. Rahman., P. Krishna // BNC Plant Biology. – 2010. – Vol. 10. – P. 151.
3. Манжелесова, Н. Е. Фитогормоны и фенольные соединения в борьбе с болезнями растений / Н. Е. Манжелесова, А. П. Волюнец // Наука и инновации. – 2015. – № 3 (145). – С. 62-65.
4. Гималов, Ф. Р. Участие brassinosterоидов в механизмах повышения устойчивости растений к низким температурам / Ф. Р. Гималов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2020. – № 3. – С. 34-40.
5. Стрельцова, Д. Е. Негеномные эффекты стероидных гормонов: роль ионных каналов / Д. Е. Стрельцова, М. А. Черныш, П. В. Гриусевич, В. В. Демидчик // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. – 2019. – № 3. – С. 3-12.
6. Антонов, В.Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран / В. Ф. Антонов // Москва : Наука, 1982. – с.150.
7. Nakashita, H. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice / H. Nakashita [et al.] // Plant Journal. – 2003. – № 33. – P. 887-889.
8. Fridman, Y. Brassinosteroids in growth control: How, when and where / Y. Fridman [et al.] // Plant Science. – 2013. – № 209. – P. 24-31.
9. Жуков, А. В. О качественном составе липидов мембран растительных клеток / А. В. Жуков // Физиология растений. – 2021. – №2. – С. 206-224.
10. Веснина, Л. Э. Липидные рафты: роль в регуляции функционального состояния клеточных мембран / Л. Э. Веснина // Актуальні проблеми сучасної медицини. – 2013. – Т. 13, № 2 (42). – С. 5-10.
11. Giguere, V. Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function / V. Giguere // Endocrine Reviews. – 1999. – V.20, №5. – P. 689-725.
12. Ламан, Н. А. Ростовые реакции проростков отдельных видов и сортов сельскохозяйственных растений на обработку семян глифосатом (N-фосфометилглицином) / Н. А. Ламан, К.Р. Кем, А.Ф. Судник // Вес. Нац. акад. навук Беларусі Сер. біял. навук. – 2016. - № 4. – С. 7-13.
13. Ламан, Н. А. Проращивание мелких, плоских и долго прорастающих семян рулонным методом с использованием синтетической вентиляционной сетки / Н. А. Ламан, С. И. Будай, О. Э. Барнатович // Известия Акад. аграр. наук Респ. Беларусь. – 2000. – № 4. – С. 57-61.