



УДК 577.17.05

М. В. Деревянчук, О. И. Грабельных, Р. П. Литвиновская,
В. К. Войников, А. Л. Савчук,
академик НАН Беларуси В. А. Хрипач, В. С. Кравец

Роль brassinosteroidов в адаптации функционирования митохондрий растений *in vivo* при действии абиотических стрессов

(Представлено академиком НАН Украины А. И. Вовком)

*Изучено *in vivo* влияние brassinosteroidов (БС) на активность транспорта электронов митохондрий при действии солевого стресса. Показано, что снижение эндогенного уровня БС ингибитором биосинтеза гормона, brassinазолом, уменьшает интенсивность дыхания клеток. Установлено, что БС активируют клеточное дыхание и основные энзиматические системы антиоксидантной защиты — каталазу, гваякольную пероксидазу, супероксиддисмутазу, а также способствуют повышению уровня осмопротекторов и скавенджеров АФК — глутатиона и пролина. Полученные результаты свидетельствуют о вовлечении БС в регуляцию метаболизма АФК и гомеостаза митохондрий при действии абиотического стресса.*

Браassinosterоиды (БС) — новый класс фитогормонов, которые регулируют ключевые этапы роста и развития растений и процессы адаптации к действию стрессовых факторов. БС распознаются на поверхности клетки с помощью комплекса рецепторных киназ BRI1 и WAK1 и инициируют трансдукцию сигналов, механизм которой включает каскад процессов аутофосфорилирования и трансфосфорилирования субстратов, играющих важную роль в реализации регуляторной функции БС в росте и развитии растений [1]. Менее детально описаны механизмы сигнализации БС в процессах адаптации метаболизма клеток растений к действию стрессов. Показано, что обработка экзогенными БС повышает устойчивость растений к ряду биотических и абиотических стрессов, которые связаны с нарушениями процессов метаболизма АФК [2, 3]. АФК, в том числе H₂O₂, участвуют в регуляции ответа растений на действие ряда стрессов [4] и часто выступают в роли вторичного

© М. В. Деревянчук, О. И. Грабельных, Р. П. Литвиновская, В. К. Войников, А. Л. Савчук, В. А. Хрипач, В. С. Кравец, 2015

мессенджера [5]. БС тесно связаны с метаболизмом и сигнализацией АФК. В частности, известно, что при действии БС в условиях холодового стресса у растений *Cucumis sativus* активируются процессы образования супероксид-аниона и пероксида водорода [6]. Добавление ингибиторов НАДФН-оксидазы или ингибитора биосинтеза БС, брассиназола, приводит к снижению уровня АФК. Вместе с этим БС индуцируют экспрессию ряда генов, которые вовлекаются в регуляцию метаболизма АФК — *cat*, *pod*, *gpx*, *sAPX* [7], препятствуя развитию оксидативного стресса. Учитывая тесное взаимодействие АФК и БС при регуляции клеточных процессов, мы исследовали влияние БС на клеточное дыхание и генерацию АФК в митохондриях. Регуляция этого процесса позволяет снизить риск развития оксидативного стресса и повысить энергетический гомеостаз клетки в условиях действия стрессов.

Материалы и методы исследования. *Объект исследования.* Объектом исследования были растения *Arabidopsis thaliana col1* дикого типа, трансгенные растения *bak1-1* и *bri1-6* с мутациями в генах ВАК1 и ВR11 киназ рецепторного комплекса БС, что обуславливает их низкую чувствительность к действию БС, *det2* со сниженным эндогенным уровнем БС. Для исследования дыхательных процессов растения выращивались на твердой питательной среде Мурашига–Скуга с 1% сахарозы с добавлением в среду соли NaCl и гормонов. Измерения проводили на 18-е сутки выращивания на питательной среде. Для исследования активности антиоксидантных систем растения выращивались в грунте 21 сутки. На 22-е сутки растения были обработаны раствором ЭБЛ (10^{-8} М, 50 мл на каждые 100 г субстрата с 3–4 растениями) и раствором маннитола (50 мл 300 мМ на 100 г субстрата). Использованные реактивы: брассиназол (ТСI-Еугоре, Германия), 24-эпибрассинолид (ЭБЛ), химически синтезированный в лаборатории химии стероидов в Институте биоорганической химии НАН Беларуси, остальные реактивы были производства России и Украины квалификации “х. ч.”.

Определение активности ферментов антиоксидантной системы. Экстракция растительного материала (500 мг) проводилась в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7,0) с 0,1 мМ ЭДТА и 1% поливинилполипирролидона (ПВП). Гомогенат центрифугировали при 5000 г в течение 10 мин. Активность супероксиддисмутазы (SOD; ЕС 1.15.1.1) определяли по способности подавлять фотохимическое восстановление нитросиним тетразолиевым [8]. Активность каталазы (САТ; ЕС 1.11.1.6) и гваякольной пероксидазы (GPX; ЕС 1.11.1.7) определяли методами [9] и [4] с модификациями.

Концентрацию эндогенного пероксида водорода определяли согласно методу [10].

Содержание белка определяли по методу Бредфорда [11].

Содержание пролина определяли по методу Бейтса [12].

Определение активности дыхательной цепи митохондрий. Измерения проводили на полярографе Охуграф (Hansatech Instruments, Великобритания) с кислородным электродом Кларка. Данные снимали с ячейки объемом 1 мл с буфером 5 мМ Tris/HCl, рН 6,0, насыщенным воздухом при 25 °С. Навеска составляла 40 мг ткани листьев растений *Arabidopsis thaliana*. Интенсивность поглощения кислорода тканями оценивали с помощью растворов KCN (ингибитор цитохромной оксидазы) и салицилат гидроксамовой кислоты (ингибитор альтернативной оксидазы) в конечных концентрациях 1 и 3 мМ соответственно. Интенсивность дыхания рассчитывали по формуле: $V_t = V_{alt} + V_{cyt} + V_{res}$, где V_t — общая интенсивность дыхания, V_{cyt} — максимальная активность цитохромной оксидазы, V_{alt} — максимальная активность альтернативного пути, V_{res} — интенсивность остаточного дыхания. Уровень остаточного дыхания был в интервале 3–5%.

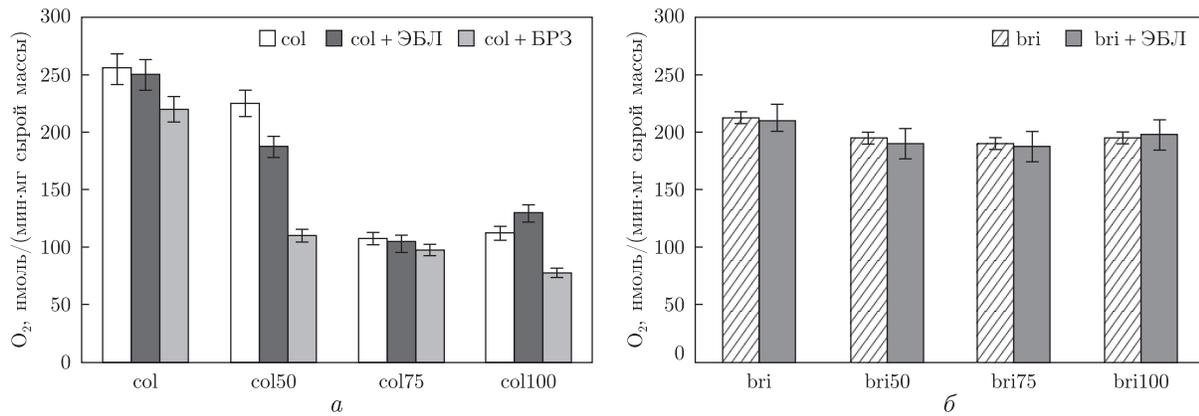


Рис. 1. Влияние ЭБЛ на интенсивность поглощения кислорода в растениях дикого типа (а) и в трансгенных растениях *bri1-6* (б). col — растения дикого типа; bri — трансгенные *bri1-6* растения; col50, bri50 — растения арабидопсиса в условиях стресса 50 mM NaCl; col75, bri75 — растения арабидопсиса в условиях стресса 75 mM NaCl; col100, bri100 — растения арабидопсиса в условиях стресса 100 mM NaCl; ЭБЛ — 24-эпибрасинолид (10 нМ); БРЗ — брасиназол (1 мкМ)

Результаты исследований и обсуждение. Для достижения поставленной задачи мы применили трансгенные формы арабидопсиса в сочетании с ингибитором синтеза БС в клетках, что позволило выявить роль БС в регуляции активности митохондрий растений *in vivo* при действии абиотического стресса. Митохондрии являются одним из основных источников АФК клеток растений, которые формируются в процессе транспорта электронов по дыхательной цепи. Абиотические стрессы, в том числе солевой и осмотический, способны влиять на функционирование митохондрий, нарушая гомеостаз дыхательной цепи и индуцируя генерацию АФК.

В процессе увеличения концентрации соли в растворе происходило угнетение потребления кислорода тканями арабидопсиса, наиболее выраженное при продолжительном сильном солевом стрессе (100 mM NaCl). Мы установили, что снижение активности биосинтеза БС в опытах с применением ингибитора их биосинтеза, брасиназолом, увеличивало чувствительность дыхания растений к солевому стрессу, с другой стороны, экзогенно введенные в среду БС предотвращали снижение активности дыхания тканей растений (рис. 1). В трансгенных растениях *bri1-6* со сниженной чувствительностью к исследованным гормонам не было обнаружено статистически достоверного влияния БС на дыхание тканей, что свидетельствует о специфичности реализации БС посредством рецепторной киназы BRI1 (см. рис. 1). Интересно, что эти трансгенные растения характеризовались более высокой интенсивностью поглощения кислорода при действии умеренного стресса по сравнению с *col1* растениями (см. рис. 1). Известно, что изменение интенсивности дыхания *in vivo* при действии стресса может в равной мере как увеличиваться, так и уменьшаться [13]. При более сильном и продолжительном стрессе клетка может снижать интенсивность дыхания тканей, а при кратковременных стрессах — наоборот, активировать дыхание для обеспечения энергией метаболизма клеток [13]. При этом увеличение активности дыхательной цепи повышает риск генерации АФК, что, в свою очередь, может нарушить функции электрон-транспортной цепи. В связи с этим нами была изучена активность антиоксидантных систем клетки при действии БС в условиях абиотического стресса. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что ЭБЛ активизировал системы антиоксидантной защиты —

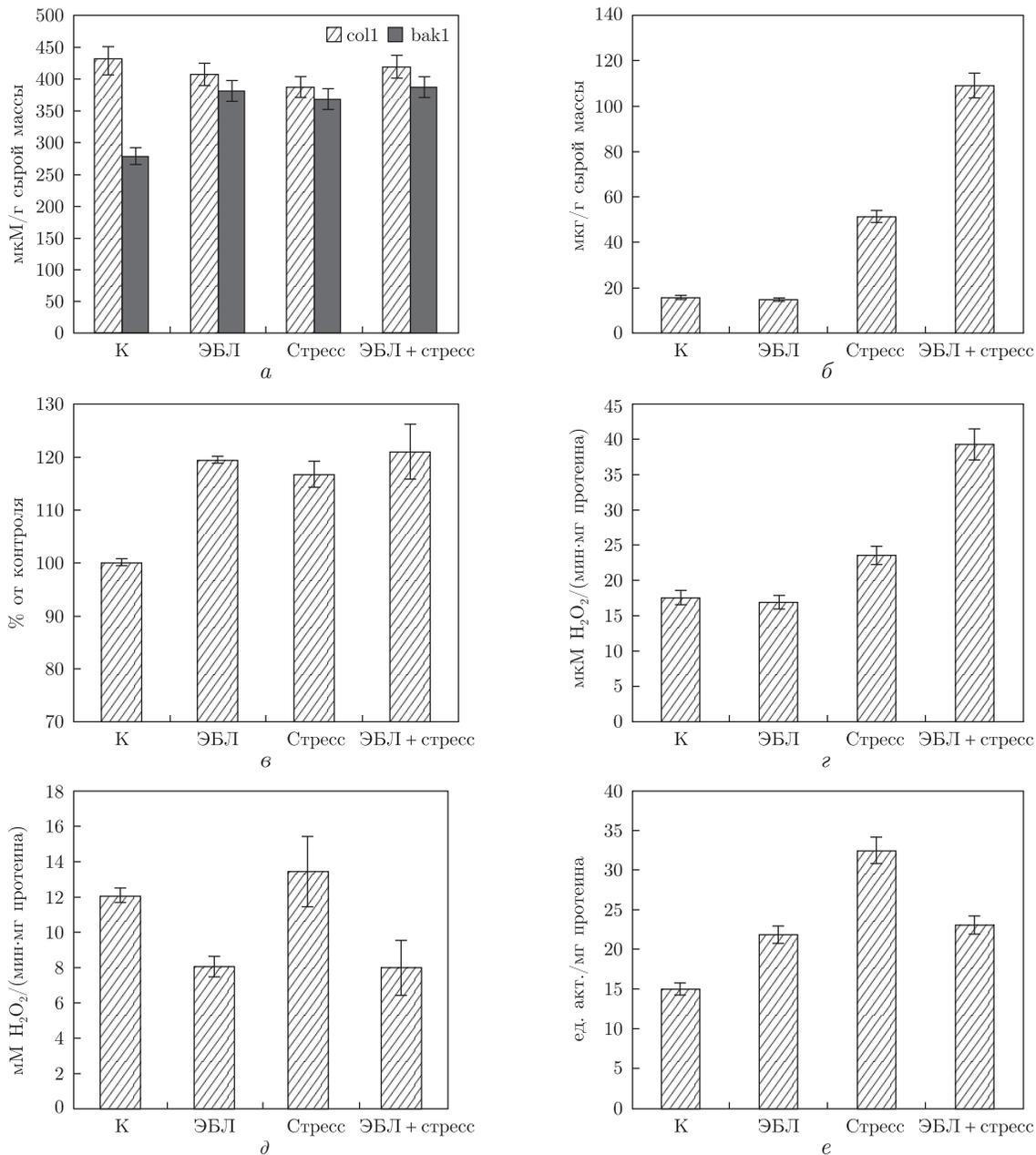


Рис. 2. Активность антиоксидантных систем, содержание пролина, глутатиона, пероксида водорода после 2 сут действия стресса (маннитол 300 мМ). а – H₂O₂ (мкМ/г сырой массы); б – пролин (мкг/ г сырой массы); в – глутатион (% от контроля); г – каталаза (мкМ H₂O₂/(мин · мг протеина)); д – гваякольная пероксидаза (мМ H₂O₂/(мин · мг протеина)); е – супероксиддисмутаза (СОД, ед. акт. / мг протеина). К – контроль; ЭБЛ – 24-эпибрассинолид (10⁻⁸ М); Стресс – 300 мМ маннитол; ЭБЛ + стресс – 24-эпибрассинолид (10⁻⁸ М) + 300 мМ маннитол

каталазу и супероксиддисмутазу и несколько снижал активность гваякольной пероксидазы (рис. 2), что, возможно, связано с реакцией разложения пероксида водорода и образования высокотоксичных гидроксильных радикалов. БС увеличивали уровень естественного осмопротектора пролина и антиоксиданта глутатиона, который в растениях арабидопсиса

находится преимущественно в митохондриях (см. рис. 2). Метаболизм АФК тесно связан также с глутатионом и пролином, так как известно, что АФК, в частности пероксид водорода, стимулируют аккумуляцию глутатиона в вакуолях растений [14], а пролин, как и глицинбетаин, также может выступать в роли скавенджеров АФК [15]. Оксидативный стресс способен приводить к быстрому окислению глутатиона в митохондриях и повреждению органелл.

Таким образом, наши исследования показали, что модулирование уровня БС в растениях способно влиять на интенсивность дыхания клеток растений при действии абиотических стрессов, и этот процесс опосредован рецептором к БС. Увеличение уровня глутатиона и пролина, а также активация энзиматических антиоксидантов свидетельствует о перепрограммировании клетки для снижения риска оксидативного стресса в связи с увеличением активности клеточного дыхания и возможной генерацией АФК при нарушениях в работе комплексов электрон-транспортной цепи. Эти результаты могут указывать на вовлечение БС в регуляцию активности дыхательной цепи и антиоксидантных систем, что приводит к реорганизации метаболизма растений для роста и развития при действии стрессовых факторов.

Работа выполнена при поддержке Государственного фонда фундаментальных исследований Украины (проект № 54.4/026-2013), НАН Украины (проект № 2.1.10.32-10) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект №X13K-094).

1. Kim M. H., Kim Y., Kim J. W. et al. Identification of arabidopsis BAK1-associating Receptor-like kinase 1 (BARK1) and characterization of its gene expression and brassinosteroid-regulated root phenotypes // Plant Cell Physiol. – 2013. – **54**. – P. 1620–1634.
2. Nakashita H., Yasuda M., Nitta T. et al. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice // Plant J. – 2003. – **33**. – P. 887–898.
3. Kagale S., Divi U., Krochko J. et al. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses // Planta. – 2007. – **225**. – P. 353–364.
4. de Azevedo Neto A. D., Prisco J. T., Enéas-Filho J. et al. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes // Environ. Exp. Bot. – 2006. – **56**. – P. 87–94.
5. Miller G. A. D., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. et al. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses // Plant Cell Environ. – 2010. – **33**. – P. 453–467.
6. Xia X.-J., Wang Y.-J., Zhou Y.-H. et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber // Plant Physiol. – 2009. – **150**. – P. 801–814.
7. Goda H., Sawa S., Asami T. et al. Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in arabidopsis // Ibid. – 2004. – **134**. – P. 1555–1573.
8. Rathore R., Zheng Y. M., Niu C. F. et al. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-ПКCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells // Free Radic. Biol. Med. – 2008. – **45**. – P. 1223–1231.
9. Monnet F., Bordas F., Deluchat V. et al. Toxicity of copper excess on the lichen *Dermatocarpon luridum*: Antioxidant enzyme activities // Chemosphere. – 2006. – **65**. – P. 1806–1813.
10. Rhee S., Chang T.-S., Jeong W. et al. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells // Mol. Cells. – 2010. – **29**. – P. 539–549.
11. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248–254.
12. Bates L. S., Waldren R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies // Plant Soil. – 1973. – **39**. – P. 205–207.
13. Jacoby R. P., Taylor N. L., Millar A. H. The role of mitochondrial respiration in salinity tolerance // Trends Plant Sci. – 2011. – **16**. – P. 614–623.
14. Queval G., Jaillard D., Zechmann B. et al. Increased intracellular H₂O₂ availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts // Plant, Cell & Environment. – 2011. – **34**. – P. 21–32.

15. Smirnova N., Cumbes Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes // *Phytochemistry*. – 1989. – 28. – P. 1057–1060.

*Институт биоорганической химии
и нефтехимии НАН Украины, Киев
Институт биоорганической химии
НАН Беларуси, Минск
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений РАН, Иркутск*

Поступило в редакцию 11.09.2014

**М. В. Дерев'янчук, О. І. Грабельних, Р. П. Литвіновська, В. К. Войніков,
А. Л. Савчук, академік НАН Білорусі В. О. Хрипач, В. С. Кравець**

Роль брасиностероїдів у процесі адаптації функціонування мітохондрій рослин *in vivo* при дії абіотичних стресів

*Вивчено вплив брасиностероїдів (БС) на активацію транспорту електронів мітохондрій *in vivo* при дії сольового стресу. Показано, що зниження ендогенного рівня БС інгібітором біосинтезу гормону, брасиназолом, пригнічує дихання клітин. Встановлено, що БС активують клітинне дихання і основні ензиматичні системи антиоксидантного захисту — каталазу, гваякольну пероксидазу, супероксиддисмутазу, а також сприяють підвищенню рівня осмолпротекторів і скавенджерів АФК — глутатіону і проліну. Отримані результати свідчать про залучення БС до регуляції метаболізму АФК і гомеостазу мітохондрій при дії абіотичного стресу.*

**M. V. Derevyanchuk, O. I. Grabelnyh, R. P. Litvinovskaya, V. K. Voinikov,
A. L. Sauchuk, Academician of the NAS of Belarus V. A. Khripach, V. S. Kravets**

Role of brassinosteroids in the adaptation of plant mitochondria functioning *in vivo* under abiotic stress conditions

The role of brassinosteroids (BRs) in the activation of the mitochondrial electron transport chain under salt stress conditions is investigated. Lowering the endogenous BRs level with the inhibitor of hormone biosynthesis, brassinazole, decreases the cell respiration. We have demonstrated that BRs activate cell respiration and key cellular enzymatic antioxidant systems (catalase, guaiacol peroxidase, superoxide dismutase) and promote the accumulation of osmoprotectors and scavengers of reactive oxygen species (ROS) — glutathione and proline. Our results indicate that BRs may be involved in the regulation of ROS metabolism and mitochondria homeostasis under the abiotic stress condition.