

На правах рукописи



ЖУКОВСКАЯ
Наталья Валерьевна

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРА
АДРЕНАЛИНА НА ВОДОНАГНЕТАЮЩУЮ
ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ КОРНЯ

03.00.12 – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва - 2009

Работа выполнена в лаборатории регуляции водного обмена и засухоустойчивости и группе регуляции водного обмена Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
кандидат биологических наук

Жолкевич Владимир Николаевич
Дустмаматов Азиз Гуломович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
доктор биологических наук

Балнокин Юрий Владимирович
Рощина Виктория Владимировна

Ведущая организация: Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.Тимирязева (РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева)

Защита диссертации состоится 21 апреля 2009 года в 11 часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 977 8018, электронная почта: ifr@ippras.ru; m-azarkovich@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

Автореферат разослан « 18 » марта 2009 г.

Учёный секретарь
совета по защите докторских и
кандидатских диссертаций
кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

У растений передвижение воды осуществляется благодаря функционированию верхнего (транспирация) и нижнего (корневое давление) концевых двигателей водного тока. В отсутствие транспирации корневое давление является единственной движущей силой, под действием которой вода перемещается из почвенного раствора в сосуды ксилемы корня. Корневое давление имеет сложную природу и складывается из двух составляющих, условно называемых осмотической и неосмотической (гидростатической). Механизм формирования корневого давления и пути его эндогенной регуляции всё ещё не ясны. Наряду с классическими представлениями о ведущей роли градиента осмотического давления, как движущей силы воды в корне (Слейчер, 1970; Kramer, 1983; Kramer, Boyer, 1995; Steudle, 2002) в отношении природы корневого давления существует ряд нетрадиционных точек зрения. Среди них наиболее обоснованной является гипотеза о транспорте воды в радиальном направлении корня против градиента осмотического потенциала за счёт сокращения элементов цитоскелета в паренхимных клетках коры (Жолкевич и др., 1989; Жолкевич, 2001). Предполагается, что в эндогенной регуляции создаваемого таким образом корневого давления могут принимать участие фитогормоны и нейротрансмиттеры (химические передатчики (медиаторы) нервного возбуждения у животных) (Skoog, 1938; Wallace, Meyer, 1941; Tal, Imber, 1970, 1971; Glinka, 1973; Collins, Kerrigan, 1974; Ionenko, Zyalalov, 1999; Жолкевич, 2001; Жолкевич и др., 2003). Интерес к нейротрансмиттерам возник в связи с обнаружением в растениях ацетилхолина (Emmelin, Feldberg, 1947), дофамина, норадреналина (Waakes et al., 1958), адреналина (Askar et al., 1972) и серотонина (Collier et al., 1956). Было обнаружено, что нейротрансмиттеры у растений обладают высокой биологической активностью (Рощина, 1991; Roshchina, 2001; Murch, 2005; Brenner et al. 2006). Они могут выполнять роль хемосигнализаторов, регуляторов роста и развития. На клеточном уровне они выполняют функцию регуляторов проницаемости мембран. В ряде работ было показано действие нейротрансмиттеров на водонагнетающую деятельность корня (Жолкевич и др., 1995,

1997, 2001, 2003). Нейротрансмиттеры норадреналин, адреналин и серотонин стимулировали экссудацию у отделённых корней *Zea mays* L. Таким образом, изучение механизма регулирующего действия нейротрансмиттеров на корневое давление и на водообмен растения в целом представляет большой интерес.

Цель и задачи работы. Цель работы заключалась в исследовании влияния нейротрансмиттера адреналина на водонагнетающую деятельность корня и выявлении возможных путей трансдукции сигнала от адреналина.

В соответствии с этой целью были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить влияние адреналина на интенсивность экссудации, определить корневое давление, температурную чувствительность экссудации, осмотическое давление экссудата, а также рН экссудата;
- 2) исследовать влияние блокаторов адренорецепторов на интенсивность экссудации;
- 3) изучить роль G-белков в водонагнетающей деятельности корня и при передаче сигнала от адреналина;
- 4) выявить участие протеинкиназ и протеинфосфатаз в создании корневого давления и при передаче сигнала от адреналина;
- 5) изучить совместное действие фитогормонов (индолилуксусной или абсцизовой кислот) и адреналина на интенсивность экссудации.

Научная новизна работы.

Показан стимулирующий эффект нейротрансмиттера адреналина на экссудацию. Определён ряд параметров экссудации на двух модельных системах – «целых» корнях и «рукавичках». Впервые показано, что в трансдукции сигнала при стимулирующем действии адреналина могут быть задействованы гетеротримерные G-белки и кальций-зависимые серин-треониновые протеинкиназы. Впервые испытано действие ряда блокаторов адренорецепторов на водонагнетающую деятельность корня.

Практическая значимость исследований.

Полученные данные имеют определённое значение в понимании механиз-

мов транспорта воды в корне, создании корневого давления, сигнальной системы регуляции деятельности корня. Вместе с тем, фундаментальные исследования механизмов реакций растений с участием нейротрансмиттеров могут найти применение в прикладных целях. Во-первых, данные о содержании и метаболизме нейротрансмиттеров в растениях имеют практическое значение для медицины и фармакологии как основа получения новых лекарственных препаратов растительного происхождения. Во-вторых, чувствительность растений к нейротрансмиттерам необходимо учитывать при разработке и использовании средств защиты растений. В-третьих, накопление в растениях некоторых нейротрансмиттеров приводит к окислительно-восстановительным реакциям с образованием ядовитых продуктов. Такие растения можно использовать как тесты на антинейромедиаторные яды. Материалы диссертации могут быть также использованы при чтении лекций по физиологии растений для студентов биологических факультетов.

Апробация работы.

Материалы диссертации были представлены на II международном симпозиуме «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 27-30 июня 2006 г.); на годовом собрании общества физиологов растений России – конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии» (Ростов-на-Дону, 2-6 октября 2006 г.); на годовом собрании общества физиологов растений России – конференции «Современная физиология растений: от молекулы до экосистемы» (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.); на годовом собрании общества физиологов растений России – конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений» (Екатеринбург, 6-11 октября, 2008 г.).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемом журнале.

Структура диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка

литературы и приложений. Работа изложена на 120 страницах машинописного текста, включая 7 таблиц, 43 рисунка. Список литературы включает 212 источников, из которых 132 на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом исследования были корни 5-7-дневных этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.) гибрида СТК-175. Семена проращивали в кювете при температуре $22\pm 3^{\circ}\text{C}$. Для опыта отбирали проростки с прямым главным зародышевым корнем длиной 10 - 15 см. Лезвием бритвы в капле воды отсекали апикальную часть корня длиной 5 см, с которой в дальнейшем проводили эксперимент. В опытах использовали «целые» корни и полученные из них «рукавички». «Рукавички» – корни проростков, лишённые центрального цилиндра, при удалении которого разрыв происходит по клеткам эндодермы (Ginsburg, Ginzburg, 1971). Для приготовления «рукавичек» корень изгибали, что приводило к разрыву коры, после этого осторожно вытягивали центральный цилиндр. Таким образом, использовавшиеся в экспериментах «рукавички» состояли из ризодермы, клеток коры, остатков клеток разорванной эндодермы. Внутри «рукавички» вместо удалённого центрального цилиндра находилась полость, диаметром приблизительно 0,2 мм.

Интенсивность экссудации (J_v) «целых» корней и «рукавичек» определяли по методике Андерсена и Хауса (Anderesen, House, 1967). Установка для опытов включала в себя сосуд с испытуемым раствором и приемники для сбора экссудата – отрезки пипеток длиной 10 см, с ценой деления 1 мкл. Отделённые корни проростков кукурузы вставляли в пипетки таким образом, чтобы корни входили в них на 2 мм. Предварительно в пипетки набирали небольшое количество воды для облегчения наблюдений за перемещением менисков. Места соединения корней с пипетками заклеивали расплавленной смесью канифоли и парафина, чтобы предотвратить вытекание экссудата из пипеток. Присоединённые к пипеткам корни предварительно выдерживали в течение 10 мин во влажной марле, чтобы предотвратить их высыхание и снизить раневой эффект. После этого корни с пипетками

расставляли в сосуде с испытуемым раствором в вертикальном положении. Сосуд помещали в термостат U10 при температуре 30°C (при определении температурного коэффициента также ещё и при 20°C) и определяли интенсивность экссудации. Интенсивность экссудации (J_v) рассчитывали как объём жидкости, протекающей за единицу времени через единицу площади поверхности «целого» корня или «рукавички» по формуле (1):

$$J_v = V_{\text{экс}} / (S \cdot t), \text{ где} \quad (1)$$

$V_{\text{экс}}$ – объём выделившегося экссудата, мкл;

S – площадь поверхности корня, см²;

t – время наблюдений, ч

Площадь поверхности корня (S) рассчитывали по формуле (2):

$$S = 2\pi \cdot R \cdot l, \text{ где} \quad (2)$$

$\pi = 3,14$; R – радиус корня, см;

l – длина поверхности «целого» корня или «рукавички», см

Температурный коэффициент (Q_{10} , 20° – 30°C) интенсивности экссудации рассчитывали как отношение J_v при 30° к J_v при 20°C.

Осмотическое давление экссудата (ОД) определяли микрокриоскопическим методом, используя осмометр «Osmomat 030» (фирма «Gonotec», Германия). Экссудат для определения осмотического давления (ОД) собирали при 30°C в течение 30 мин. Одновременно использовали 30 - 50 корней, экссудат которых объединяли в одну - две пробы по 50 мкл.

Корневое давление (КД) определяли компенсационным методом. Из нескольких растворов полиэтиленгликоля (ПЭГ-6000), осмотическое давление которых было заранее измерено, выбирали такой раствор, в котором у отрезанных корней в течение пяти-десяти минут не наблюдалось экссудации. Осмотическое давление такого раствора принимали равным корневому давлению (КД).

Гидростатическую составляющую корневого давления (ГД) рассчитывали как разницу между корневым давлением и осмотическим давлением экссудата (3):

$$\text{ГД} = \text{КД} - \text{ОД}, \text{ где} \quad (3)$$

ГД – гидростатическая составляющая корневого давления;

КД – корневое давление;

ОД – осмотическое давление экссудата

Гидравлическую проводимость (L_p) корней определяли с помощью камеры давления Шоландера (Scholander et al., 1964, 1965). Принцип метода заключался в измерении скорости экссудации при наложении внешнего давления на раствор, в котором находились корни. Прилагаемое давление составляло 0,02 МПа. Гидравлическую проводимость (L_p) рассчитывали по формуле (4):

$$L_p = V_{\text{экс}} / (S \cdot t \cdot P), \text{ где} \quad (4)$$

$V_{\text{экс}}$ – объём выделившегося экссудата, мкл;

S – площадь поверхности корня, см²;

t – время наблюдений, ч;

P – давление в камере, МПа

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета приложений для статистической обработки данных – Microsoft Excel. На рисунках и в таблицах приведены средние арифметические и их стандартные отклонения. Различия между вариантами опытов оценивали по критерию Стьюдента для вероятности 0.95. Каждый опыт проводился в 5-10 биологических повторностях, при этом в каждом варианте опыта было по 6-8 образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние адреналина на параметры водного обмена

«целых» корней и «рукавичек»

Более 20 лет назад было обнаружено стимулирующее действие ацетилхолина и других химических передатчиков нервного возбуждения (нейротрансмиттеров адреналина, норадреналина, серотонина) на экссудацию у растений (Жолкевич, 1979; Жолкевич и др., 1995, 1997, 1998). Мы выбрали концентрацию адреналина (10^{-6} М), в которой он стабильно стимулировал экссудацию приблизительно на 25 – 40 % по сравнению с контролем. Адреналин, стимулировавший эксу-

дацию «целых» корней (до 131% от контроля) и «рукавичек» (до 142% от контроля), несколько увеличивал корневое давление и снижал осмотическое давление экссудата (табл. 1.). В результате этого возрастала гидростатическая составляющая корневого давления (определяемая как разница между корневым давлением и осмотическим давлением экссудата). Объяснить усиление интенсивности экссудации при действии адреналина можно было бы увеличением проницаемости клеток корня для воды, однако, гидравлическая проводимость корней при действии адреналина у «целых» корней не изменялась, а у «рукавичек» даже уменьшалась (табл. 1.).

Для понимания природы происходящих явлений может помочь такой показатель, как температурный коэффициент. У простых физических процессов Q_{10} близок к единице (например, при диффузии и осмосе), у химических реакций Q_{10} равен 2-3, у сложных процессов цепного характера превышает 3 (Zimmermann, Milburn, 1975). Увеличение Q_{10} интенсивности экссудации при действии адреналина у «целых» корней (до 3,3) и «рукавичек» (до 5,0) указывает на возрастание роли сложных ферментативных процессов, вероятно, связанных с изменением движущей силы экссудации (табл. 1.).

Таким образом, при действии адреналина происходит увеличение гидростатической составляющей корневого давления. Ранее было сделано предположение о том, что это увеличение связано с сокращением элементов цитоскелета в паренхимных клетках коры (Жолкевич, 2001).

Следует отметить, что интенсивность экссудации, как в контроле, так и при действии адреналина у «рукавичек» была существенно выше, чем у «целых» корней (табл. 1.). Можно видеть, что усиление интенсивности экссудации у «рукавичек» происходило как при увеличении гидравлической проводимости корней, так и возрастании корневого давления. При этом корневое давление увеличивалось в основном за счёт его гидростатической составляющей (ГД). Увеличение движущей силы экссудации могло происходить и вследствие локального возрастания осмотического давления отдельных клеток коры, поскольку у «рукавичек» осмотическое давление экссудата также повышалось.

Таблица 1.

Влияние адреналина на параметры водного обмена «целых» корней и «рукавичек»

J_v – интенсивность экссудации; ОД – осмотическое давление экссудата; КД – корневое давление;
ГД – гидростатическая составляющая; Q_{10} – температурный коэффициент интенсивности экссудации;
 L_p – гидравлическая проводимость корня

Вариант	J_v , мкл·см ⁻² ·ч ⁻¹	ОД, кПа	КД, кПа	ГС,		Q_{10}	$*L_p$, мкл·см ⁻² ·ч ⁻¹ 0,02МПа ⁻¹	рН эк- су- дата
				кПа	% от КД			
«Целые» корни	Контроль, вода	200±20	420±20	220±20	52	3,0±0,2	210±30	5,0
		100	100	100			100	
	Адреналин, 10 ⁻⁶ М	160±10 НСР ₀₅ =15	450±10 НСР ₀₅ =15	290±10 НСР ₀₅ =15	64	3,3±0,2 НСР ₀₅ =0,2	195±12 НСР ₀₅ =21	5,0
«Рукавички»	Контроль, вода	250±30	700±30	450±30	65	4,0±0,2	510±60	5,2
		100	100	100			100	
	Адреналин, 10 ⁻⁶ М	210±30 НСР ₀₅ =1,3	820±10 НСР ₀₅ =21	610±30 НСР ₀₅ =28	74	5,0±0,3 НСР ₀₅ =0,3	420±42 НСР ₀₅ =48	5,2
	142	84	117	135			82	

* Прим. L_p определяли в камере Шоландера при внешнем давлении 0,02 МПа

Влияние блокаторов адренорецепторов на экссудацию

Действие блокаторов адренорецепторов на экссудацию могло бы свидетельствовать о вовлечении последних в регуляцию водонагнетающей деятельности корня. В связи с этим было испытано влияние различных блокаторов α - и β -адренорецепторов животных на экссудацию «целых» корней. Известно, что α -адреноблокаторы у животных снижают кровяное давление, применяются в качестве лекарственных средств при обезвоживании организма, β -адреноблокаторы вызывают сужение периферических сосудов, усиливают сердечные сокращения. Приведённые сведения указывают на то, что все адреноблокаторы прямо или косвенно воздействуют на гидростатическую составляющую и сопротивляемость тканей кровяному току у животных.

Нами были испытаны β -адреноблокаторы (надолол, тимолол), селективные β_1 -адреноблокаторы (атенолол, ацебутолол, метапролол), α -адреноблокаторы (индорамин, кетансерин, ницерголин, дигидроэргокристин, дигидроэрготамин), α_1 -адреноблокаторы (празозин), α_1 - и β -адреноблокатор (лабеталол). Каждый препарат применялся в диапазоне концентраций от 10^{-9} М до 10^{-2} М.

Большинство адреноблокаторов не оказывали существенного влияния на экссудацию (табл. 2.). Через два часа наблюдений отмечалось ингибирование экссудации под влиянием дигидроэргокристина в концентрациях $5 \cdot 10^{-4}$ М и 10^{-4} М, дигидроэрготамин в концентрациях 10^{-5} , 10^{-4} и $5 \cdot 10^{-4}$ М, тимолола в концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} М, атенолола в концентрациях 10^{-3} М и 10^{-2} М, лабетолола в концентрациях 10^{-3} М и 10^{-2} М.

Вместе с тем обнаружено мощное стимулирующее действие на экссудацию α -адреноблокатора ницерголина (табл. 2.). Ницерголин в концентрациях $5 \cdot 10^{-3}$ (кривая 5), 10^{-3} (кривая 4) и $5 \cdot 10^{-4}$ М (кривая 3) увеличивал интенсивность экссудации в 5 - 8 раз по сравнению с той, которая наблюдалась в контроле (рис. 1.). При более низких концентрациях эффект ницерголина практически отсутствовал. Следует отметить, что осмотическое давление экссудата при действии ницерголина в момент наибольшего стимулирования экссудации не изменялось по сравнению с контролем (вода).

Таблица 2.

Влияние блокаторов адренорецепторов на экссудацию
корней кукурузы *Zea mays* L.

Адренорецепторы	Вещество	Концентрация, М	Влияние на экссудацию, экспозиция 2 ч (% от контроля)
неселективные α -адренорецепторы	индорамин	$10^{-4} \dots 10^{-6}$	Отсутствие статистически достоверного эффекта
	кетансерин	$5 \cdot 10^{-4} \dots 10^{-6}$	Отсутствие статистически достоверного эффекта
	ницерголин	10^{-4}	143
		$5 \cdot 10^{-4}$	514
		10^{-3}	392
		$5 \cdot 10^{-3}$	350
дигидроэргокристин	$5 \cdot 10^{-4}$	61	
	10^{-3}	15	
дигидроэрготамин	10^{-5}	41	
	$5 \cdot 10^{-5}$	47	
	10^{-4}	53	
	$5 \cdot 10^{-4}$	47	
селективные α_1 -адренорецепторы	празозин	$10^{-3} \dots 10^{-6}$	Отсутствие статистически достоверного эффекта
неселективные β -адренорецепторы	тимолол	10^{-6}	33
		10^{-5}	33
	надолол	$10^{-3} \dots 10^{-9}$	Отсутствие статистически достоверного эффекта
селективные β_1 -адренорецепторы	атенолол	10^{-3}	33
		10^{-2}	11
	ацебутолол	$10^{-3} \dots 10^{-9}$	Отсутствие статистически достоверного эффекта
	метапролол	$10^{-2} \dots 10^{-8}$	Отсутствие статистически достоверного эффекта
$\alpha_1 + \beta$ -адренорецепторы	лабеталол	10^{-3}	33
		10^{-2}	11

Ингибирование экссудации при действии некоторых адреноблокаторов (дигидроэргокристина, дигидроэрготамина, тимолола, атенолола, лабетолола) в некоторой степени может указывать на вероятность присутствия α - и β -подобных адренорецепторов в клетках растений и о специфичности процесса. Мощный стимулирующий эффект ницерголина на экссудацию, вероятно, связан с иным механизмом действия. Скорее всего, при действии ницерголина либо сильно возросла гидравлическая проницаемость корней для воды, либо ницерголин оказывал разрушающее действие на мембраны, поскольку экссудация через некоторое время прекращалась.

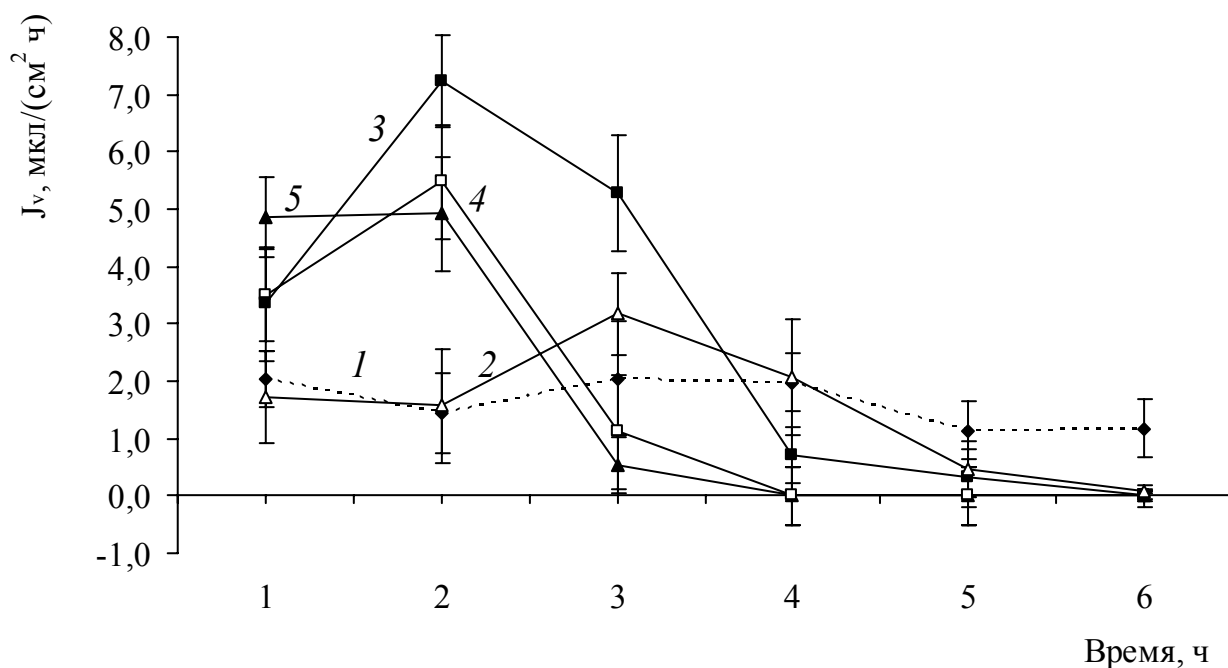


Рис. 1. Влияние ницерголина в разных концентрациях на интенсивность экссудации отделинной корневой системы *Zea mays* L. при 30°C.
 1 – контроль, вода; Ницерголин: 2 – 10^{-4} М; 3 – $5 \cdot 10^{-4}$ М; 4 – 10^{-3} М; 5 – $5 \cdot 10^{-3}$ М

Влияние гуанозинтиодифосфата и гуанозинтрифосфата на экссудацию корней по отдельности и совместно с адреналином

С целью выяснения участия G-белков в регуляции транспорта воды в корне и в трансдукции сигнала при стимулирующем действии адреналина на экссудацию были испытаны ингибитор ГТФ-связывающей активности G-белков – гуанозинтиодифосфат (ГДФ) и стимулятор этой активности гуанозинтрифосфат (ГТФ). G-белки рассматриваются как первое звено в сигналинге (Тарчевский, 2002). Опытным путём были подобраны концентрации, при которых экссудация подавлялась и стимулировалась этими веществами приблизительно на 30 – 50%. Для обоих веществ она составила $2 \cdot 10^{-5}$ М.

Гуанозинтиодифосфат у «целых» корней ингибировал экссудацию (до 69% от контроля) (рис. 2.), а гуанозинтрифосфат в той же концентрации стимулировал (до 131% от контроля) (рис. 3.). У «рукавичек» ингибирование экссудации гуанозинтиодифосфатом и стимуляция экссудации гуанозинтрифосфатом были выражены более отчётливо, чем у «целых» корней (рис. 4, 5.). Прямо противоположный эффект при действии гуанозинтиодифосфата и гуанозинтрифосфата

на экссудацию указывает на то, что G-белки принимают участие в регуляции транспорта воды в корне и создании корневого давления.

При совместном присутствии в инкубационной среде адреналина и гуанозинтиодифосфата происходило ингибирование экссудации, однако это ингибирование было выражено в меньшей степени, чем при действии одного гуанозинтиодифосфата (до 92% от контроля у «целых» корней (рис. 2.), до 86% у «рукавичек» (рис. 4.). При совместном же использовании гуанозинтрифосфата и адреналина наблюдалась тенденция к усилению стимуляции экссудации (до 146% у «целых» корней (рис. 3.), до 171% у «рукавичек» (рис. 5.), т.е. была неполная аддитивность стимулирующих эффектов. Полученные данные свидетельствуют об участии G-белков в передаче сигнала от адреналина, и в то же время, сигнал, индуцируемый адреналином и приводящий к стимуляции им водонагнетающей деятельности корня, может, по-видимому, передаваться и без участия G-белков, т.е. какими-то другими путями (иначе бы стимулирование экссудации адреналином полностью снималось при совместном использовании гуанозинтиодифосфата и адреналина).

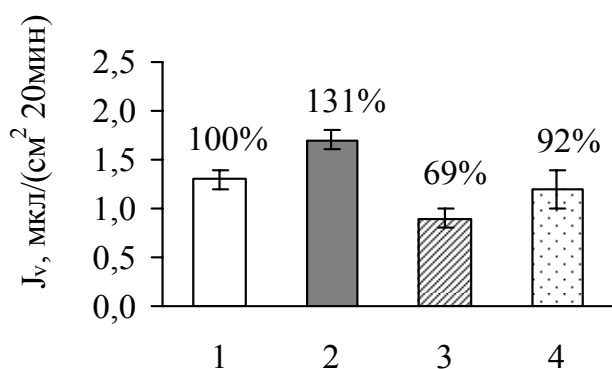


Рис. 2. Влияние адреналина и гуанозинтиодифосфата по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «целых» корней. 1 – контроль (вода); 2 – адреналин ($10^{-6} M$); 3 – гуанозинтиодифосфат ($2 \cdot 10^{-5} M$); 4 – адреналин ($10^{-6} M$) + гуанозинтиодифосфат ($2 \cdot 10^{-5} M$)

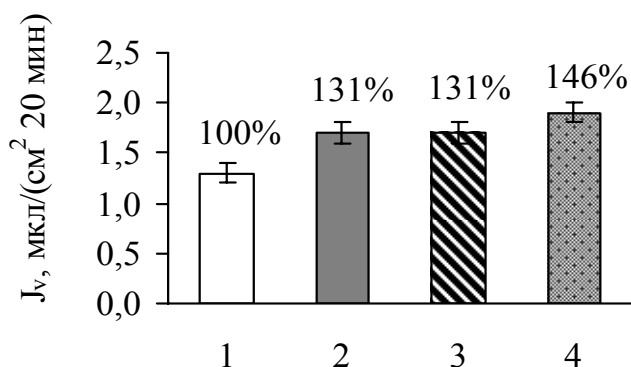


Рис. 3. Влияние адреналина и гуанозинтрифосфата по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «целых» корней. 1 – контроль (вода); 2 – адреналин ($10^{-6} M$); 3 – гуанозинтрифосфат ($2 \cdot 10^{-5} M$); 4 – адреналин ($10^{-6} M$) + гуанозинтрифосфат ($2 \cdot 10^{-5} M$)

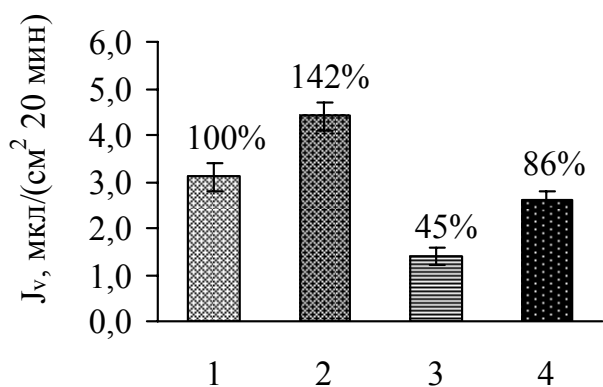


Рис. 4. Влияние адреналина и гуанозинтиодифосфата по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «рукавичек». 1 – контроль (вода); 2 – адреналин (10^{-6} М); 3 – гуанозинтиодифосфат ($2 \cdot 10^{-5}$ М); 4 – адреналин (10^{-6} М) + гуанозинтиодифосфат ($2 \cdot 10^{-5}$ М)

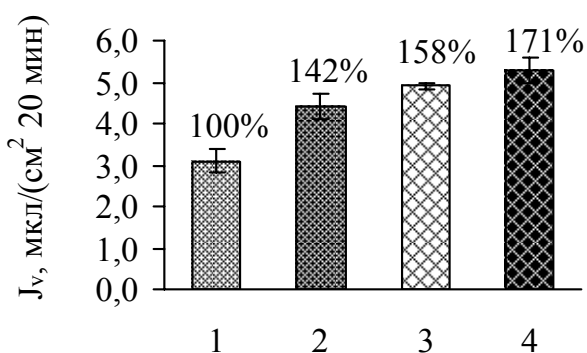


Рис. 5. Влияние адреналина и гуанозинтрифосфата по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «рукавичек». 1 – контроль (вода); 2 – адреналин (10^{-6} М); 3 – гуанозинтрифосфат ($2 \cdot 10^{-5}$ М); 4 – адреналин (10^{-6} М) + гуанозинтрифосфат ($2 \cdot 10^{-5}$ М)

Влияние стауроспорина и оокадаевой кислоты на экссудацию корней по отдельности и совместно с адреналином

Протеинкиназы и протеинфосфатазы являются звеньями сигнальных систем. Протеинкиназы катализируют реакции фосфорилирования белков, а протеинфосфатазы – обратные им реакции дефосфорилирования, возвращающие активность белков-субстратов в исходное состояние (Тарчевский, 2002; Hunter, 1995). Для выяснения роли протеинкиназ и протеинфосфатаз в регуляции водонепроницающей деятельности корня и в трансдукции сигнала при стимулирующем действии адреналина на экссудацию были испытаны ингибитор протеинкиназ – стауроспорин ($5 \cdot 10^{-7}$ М) и ингибитор протеинфосфатаз – оокадаевая кислота ($2 \cdot 10^{-9}$ М).

Стауроспорин подавлял экссудацию («целых» корней до 77% (рис. 6), «рукавичек» до 55% от контроля (рис. 8.), а оокадаевая кислота, напротив, стимулировала («целых» корней до 131% (рис. 7.), «рукавичек» до 145% (рис. 9.). Это обстоятельство может свидетельствовать в пользу участия серин-треонино-

вых протеинкиназ и протеинфосфатаз в регуляции водонагнетающей деятельности корня.

При совместном присутствии в среде стауроспорина и адреналина интенсивность экссудации тормозилась, однако, в меньшей степени, чем в одном растворе стауроспорина (до 85% у «целых» корней (рис. 6.), до 68% от контроля у «рукавичек» (рис. 8.). При совместном применении оокадаевой кислоты и адреналина происходило усиление стимуляции экссудации по сравнению с той, которая наблюдалась при действии адреналина и оокадаевой кислоты по отдельности (до 146% от контроля у «целых» корней (рис. 7.), до 161% у «рукавичек» (рис. 9.). Таким образом, полученные данные показывают, что протеинкиназы и протеинфосфатазы принимают участие в трансдукции сигнала при стимулирующем действии адреналина на экссудацию.

G-белки, протеинкиназы и протеинфосфатазы принимают участие в регуляции водонагнетающей деятельности корня в норме. При этом сигнал, индуцируемый адреналином и приводящий к стимуляции им водонагнетающей деятельности корня, вероятно, передается через G-белки и протеинкиназы, что, однако, не исключает привлечения других интермедиатов, например, вызывающих открывание и закрывание ионных каналов.

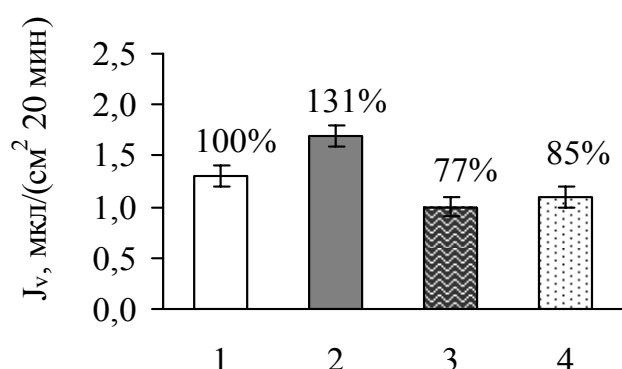


Рис. 6. Влияние адреналина и стауроспорина по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «целых» корней. 1 – контроль (вода); 2 – адреналин (10^{-6} М); 3 – стауроспорин ($5 \cdot 10^{-7}$ М); 4 – адреналин (10^{-6} М) + стауроспорин ($5 \cdot 10^{-7}$ М)

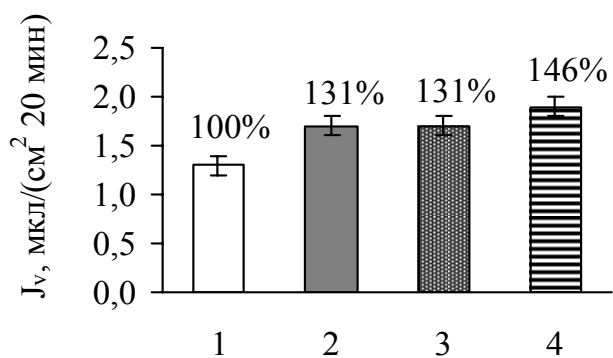


Рис. 7. Влияние адреналина и оксалаевой кислоты по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «целых» корней.

1 – контроль (вода); 2 – адреналин (10^{-6} М); 3 – оксалаевая кислота ($2 \cdot 10^{-9}$ М); 4 – адреналин (10^{-6} М) + оксалаевая кислота ($2 \cdot 10^{-9}$ М)

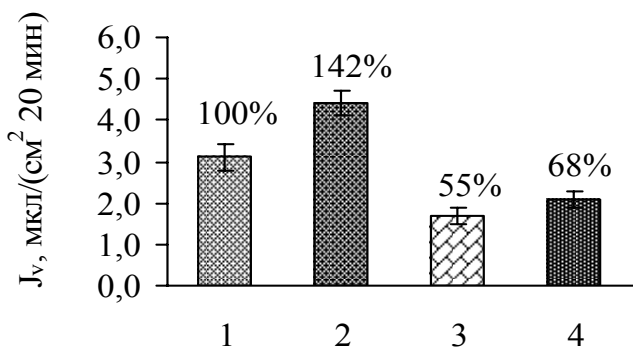


Рис. 8. Влияние адреналина и стауроспорина по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «рукавичек».

1 – контроль, (вода); 2 – адреналин (10^{-6} М); 3 – стауроспорин ($5 \cdot 10^{-7}$ М); 4 – адреналин, (10^{-6} М) + стауроспорин ($5 \cdot 10^{-7}$ М)

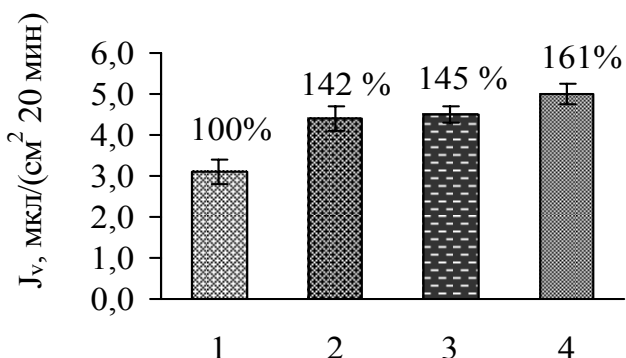


Рис. 9. Влияние адреналина и оксалаевой кислоты по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «рукавичек».

1 – контроль (вода); 2 – адреналин (10^{-6} М); 3 – оксалаевая кислота ($2 \cdot 10^{-9}$ М); 4 – адреналин (10^{-6} М) + оксалаевая кислота ($2 \cdot 10^{-9}$ М)

Все испытываемые химические агенты (гуанозинтиодифосфат, гуанозинтрифосфат, стауроспорин и оксалаевая кислота) существенно меняли величину температурного коэффициента интенсивности экссудации как у «целых» корней, так и у «рукавичек» (табл. 3.). Более значительные изменения величины Q_{10} , отмеченные у «рукавичек», свидетельствуют об особенно существенной роли сложных ферментативных процессов, вероятно, связанных с формированием движущей силы водонагнетающей деятельности корня.

Таблица 3.

Температурный коэффициент интенсивности экссудации
(Q_{10} , (20 – 30°C), экспозиция 20 мин)

Вариант	контроль, вода	адреналин, 10^{-6} М	ГДФ, $2 \cdot 10^{-5}$ М	ГТФ, $2 \cdot 10^{-5}$ М	стаурос- порин, $5 \cdot 10^{-7}$ М	окадаевая кислота $2 \cdot 10^{-9}$ М
«целые» корни	3,0±0,3	3,3±0,2	1,7±0,2	3,6±0,2	2,0±0,3	3,3±0,2
«рукавич- ки»	4,0±0,3	5,0±0,3	1,3±0,2	5,8±0,3	2,1±0,3	5,5±0,3

**Совместное действие адреналина и фитогормонов (ИУК и АБК*)
на экссудацию**

В связи с тем, что механизм регуляции водонагнетающей деятельности корня фитогормонами и нейротрансмиттерами всё ещё остаётся неизвестным, мы исследовали действие этих веществ на экссудацию. Влияние фитогормонов было изучено по отдельности и совместно с адреналином. Из рисунков 10 и 11 видно, что адреналин, ИУК и АБК стимулировали экссудацию. Вместе с тем видно, что при совместном присутствии в среде адреналина с ИУК или АБК аддитивности в действии двух веществ не было и даже происходило некоторое снижение стимуляции экссудации, по сравнению с той, которая наблюдалась при действии этих веществ по отдельности. Стимулирование экссудации адреналином, как в присутствии ИУК, так и в присутствии АБК составило до 118% от контроля. Полученные результаты дают основание полагать, что действие адреналина, ИУК и АБК нацелено на одну и ту же мишень, иначе можно было бы ожидать проявления в той или иной степени аддитивности их действия. Снижение интенсивности экссудации (хотя оно статистически недостоверно) при совместном присутствии в среде адреналина с ИУК или адреналина с АБК может свидетельствовать о возможных конкурентных взаимоотношениях между адреналином и фитогормонами (Рощина, 1991; Кулаева, 1995; Roshchina, 2001).

* АБК – абсцизовая кислота;
ИУК – индолилуксусная кислота

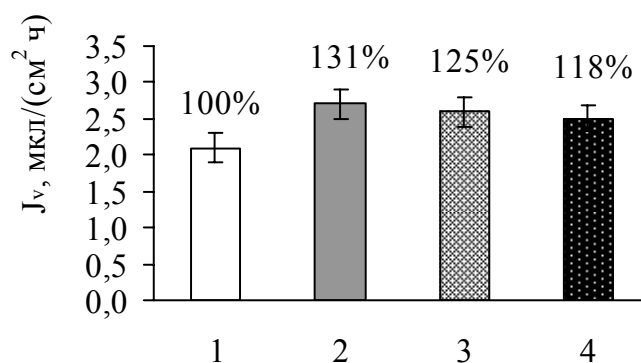


Рис. 10. Влияние адреналина и ИУК по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «целых» корней. 1 – контроль, (вода); 2 – адреналин (10^{-6} М); 3 – ИУК (10^{-6} М); 4 – адреналин (10^{-6} М) + ИУК (10^{-6} М)

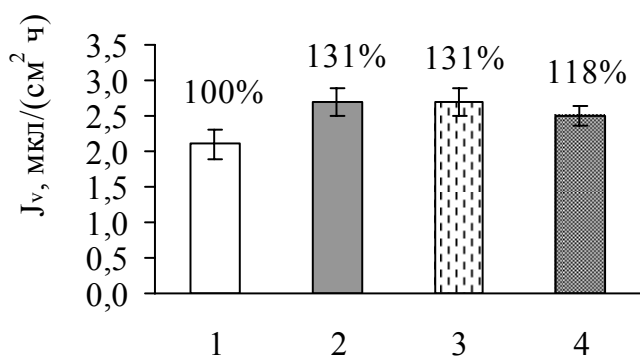


Рис. 11. Влияние адреналина и АБК по отдельности и совместно на интенсивность экссудации «целых» корней. 1 – контроль, (вода); 2 – адреналин (10^{-6} М); 3 – АБК ($4 \cdot 10^{-7}$ М); 4 – адреналин (10^{-6} М) + АБК ($4 \cdot 10^{-7}$ М)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Адреналин и другие нейротрансмиттеры (ацетилхолин, норадреналин, серотонин), обнаруженные не только у животных, но и у растений, позволяют говорить об их универсальности в живом мире. Учитывая то, что адреналин оказывает внесинаптическое действие на органы у животных, можно предположить, что он и в организме растения выступает как регулятор внутриклеточных процессов, в том числе водонагнетающей деятельности корня (что подтверждается достаточно низкой концентрацией, в которой действует адреналин (10^{-6} М)). Помимо сигнальной функции накопление адреналина в высоких концентрациях ($>10^{-4}$ М) может быть связано со стрессовой ситуацией, где адреналин выступает в роли оксиданта (Рощина, 2000; Roshchina, 2001).

Адреналин, оказывая стимулирующее действие на экссудацию «целых» корней и «рукавичек», влияет не на гидравлическую проводимость корней, а, главным образом, на движущую силу экссудации (корневое давление). Возрастающее движущее действие при действии адреналина является результатом увеличения

гидростатической составляющей корневого давления, формируемой паренхимными клетками коры. В качестве движущей силы водонагнетающей деятельности корня при действии адреналина нельзя исключить и локальное возрастание осмотического давления в тканях коры.

Нами исследовано возможное участие G-белков, протеинкиназ и протеинфосфатаз на передачу сигнала внутри клетки при стимулирующем действии адреналина на экссудацию. Впервые было испытано воздействие на экссудацию гуанозинтрифосфата – стимулятора ГТФ-связывающей активности G-белков и гуанозиндифосфата – ингибитора этой активности; ооадевой кислоты – ингибитора активности серин-треониновых протеинфосфатаз и стауроспорина – ингибитора серин-треониновых протеинкиназ. Действие этих веществ испытано, как на «целых» корнях так и на «рукавичках». Полученные результаты укладываются в гипотетическую схему действия адреналина у *Zea mays*:

адреналин → рецептор → G-белок → протеинкиназы (протеинфосфатазы)
→ физиологический ответ

Более детально схема представлена на рисунке 12 (модифицированная схема передачи сигнала от адреналина у животных). В тканях коры адреналин (лиганд) может связываться с рецепторами на внешней поверхности плазматической мембраны. На возможное присутствие в клетках растений α - и β -подобных рецепторов указывают данные, полученные в опытах с адреноблокаторами. Связывание гормона с рецептором может приводить к передаче сигнала на внутреннюю поверхность мембраны (G-белки) и тем самым запускать синтез вторичных мессенджеров. К таким вторичным мессенджерам, возможно, относится цАМФ, который в свою очередь активируют протеинкиназы, фосфорилирующие соответствующие белки. Открытие в растительной клетке и её органеллах вторичных мессенджеров (цАМФ, цГМФ, ионов Ca^{2+}), а также фермента аденилатциклазы подтверждают возможность локальной медиации адреналином. Кроме передачи сигнала через вторичные мессенджеры, адреналин, возможно, влияет на ионные каналы, изменяя проницаемость мембран для ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} , что приводит к

изменению мембранного потенциала и возникновению распространяющегося потенциала действия. В итоге активация тех или иных ферментов вызывает изменение параметров водонагнетающей деятельности корня в целом.

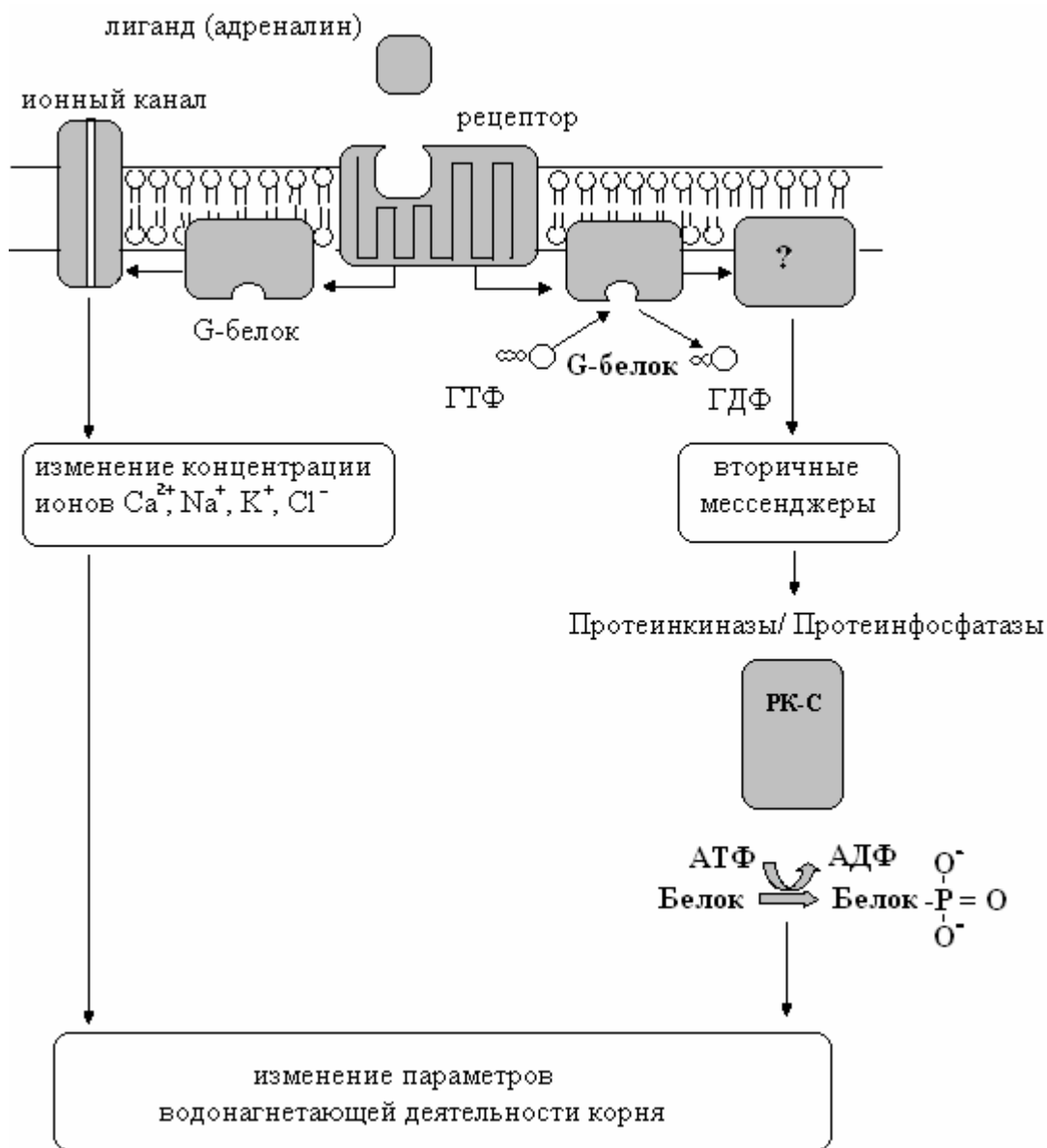


Рис. 12. Модифицированная схема передачи сигнала от адреналина у *Zea mays*

В экспериментах при совместном присутствии в среде адреналина и фитогормонов (ИУК и АБК) интенсивность экссудации не усиливалась. Это позволило сделать предположение о том, что действие адреналина, ИУК и АБК нацелено на

одну и ту же мишень, иначе можно было бы ожидать проявления в той или иной степени аддитивности их действия.

Таким образом, водонагнетающая деятельность корня подвергается много-ступенчатой эндогенной регуляции. Все приведённые факты свидетельствуют о сложной природе движущей силы экссудации – корневого давления, создаваемого осмотическими и гидростатическими системами, вероятно, при участии сократительных элементов цитоскелета паренхимных клеток коры (Жолкевич, 2001).

ВЫВОДЫ

- 1) Адреналин, оказывая стимулирующее действие на экссудацию, влияет не на гидравлическую проводимость корней, а, главным образом, на движущую силу экссудации (корневое давление). Увеличение движущей силы экссудации «целых» корней и «рукавичек» является результатом возрастания гидростатической составляющей корневого давления.
- 2) Усиление интенсивности экссудации у «рукавичек» как в контроле, так и при действии адреналина связано с увеличением гидравлической проводимости корней и возрастанием корневого давления (либо за счёт увеличения его гидростатической составляющей, формируемой паренхимными клетками коры, либо за счёт локального возрастания осмотического давления отдельных клеток коры).
- 3) Стимулирующий эффект адреналина на экссудацию и ингибирование экссудации некоторыми адrenoблокаторами свидетельствует в пользу существования α - и β -подобных адренорецепторов в растениях.
- 4) Результаты опытов по совместному влиянию на экссудацию адреналина с ингибитором активности G-белков – гуанозинтиодифосфатом и стимулятором активности G-белков – гуанозинтрифосфатом могут свидетельствовать об участии G-белков в регуляции транспорта воды в корне и в трансдукции сигнала при стимулирующем действии адреналина на экссудацию.
- 5) Данные, полученные в опытах по совместному воздействию на экссудацию адреналина с ингибитором протеинкиназ – стауроспорином и ингибитором протеинфосфатаз – ооадаевой кислотой, свидетельствуют в пользу участия протеинки-

наз и протеинфосфатаз в регуляции водонагнетающей деятельности корня и в трансдукции сигнала от адреналина.

б) Результаты опытов по совместному влиянию на экссудацию адреналина и фитогормонов (ИУК или АБК) позволяют заключить о том, что действие адреналина, ИУК и АБК нацелено на одну и ту же мишень.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССРЕТАЦИИ

1. *Жолкевич В.Н., Дустмаматов А.Г., Эрлих Н.Т., Жуковская Н.В., Попова М.С., Кузнецова Н.А.* Сигнальные пути фитогормональной и нейромедиаторной стимуляции нагнетающей активности корня. Тезисы докладов II международного симпозиума «Сигнальные системы клеток растений: роль в адаптации и иммунитете» (Казань, 27-30 июня 2006 г.). Казань. 2006. С. 39.

2. *Жуковская Н. В.* Влияние нейротрансмиттера адреналина на водонагнетающую деятельность корня // Тезисы докладов годовичного собрания общества физиологов растений России – конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии» (Ростов-на-Дону, 2-6 октября 2006 г.). Ростов-на-Дону. 2006. С. 89.

3. *Жуковская Н.В.* Участие G-белков при стимулирующем воздействии адреналина на водонагнетающую деятельность корня. Тезисы докладов годовичного собрания общества физиологов растений России – конференции «Современная физиология растений: от молекулы до экосистемы. Часть I. (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.). Сыктывкар. 2007. С. 79.

4. *Жуковская Н.В.* Участие протеинкиназ и протеинфосфатаз в трансдукции сигнала, связанного с водонагнетающим действием адреналина на корни. Тезисы докладов годовичного собрания общества физиологов растений России – конференции «Современная физиология растений: от молекулы до экосистемы. Часть I. (Сыктывкар, 18-24 июня 2007 г.). Сыктывкар. 2007. С. 81.

5. *Жолкевич В.Н., Жуковская Н.В., Попова М.С.* Участие протеинкиназ и протеинфосфатаз в трансдукции сигналов при стимулирующем действии нейротранс-

миттеров на водонагнетающую деятельность корня. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 4. С. 550 – 554.

6. *Жолкевич В.Н., Жуковская Н.В., Попова М.С.* Стимулирующее воздействие адреналина и норадrenalина на водонагнетающую деятельность корня и участие G-белков. // Физиология растений. 2007. Т. 54. № 6. С. 885 – 892.

7. *Жуковская Н.В., Попова М.С., Дустмаматов А.Г.* Влияние адреноблокаторов на водонагнетающую деятельность корня. Тезисы докладов годового собрания общества физиологов растений России – конференции «Физико-химические основы структурно-функциональной организации растений». (Екатеринбург, 6-11 октября, 2008 г.). Екатеринбург. 2008. С. 175 – 176.