

УДК 577.352.333

## ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ КОРНЕЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ДЕЙСТВИИ МЕМБРАНОТРОПНЫХ АГЕНТОВ

© 2020 г. Ю. Н. Валитова<sup>а</sup>, \*, В. Р. Хабибрахманова<sup>б</sup>, А. В. Белкина<sup>б</sup>,  
А. Г. Ренкова<sup>а</sup>, Ф. В. Минибаева<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение  
Федерального исследовательского центра “Казанский научный центр Российской академии наук”,  
Казань, 420111 Россия

<sup>б</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования  
“Казанский национальный исследовательский технологический университет”,  
Казань, 420015 Россия

\*e-mail: yulavalitova@mail.ru

Поступила в редакцию 21.04.2020 г.

После доработки 28.07.2020 г.

Принята к публикации 01.08.2020 г.

Большинство сельскохозяйственных культур испытывают серьезные угрозы от воздействия различных абиотических стрессоров. Биологическая мембрана является первичным защитным барьером при действии стрессовых факторов и выступает в роли своеобразной мишени, принимающей удар на себя. Мембранные липиды являются важным компонентом, от которого зависит состояние растительной мембраны, степень ее проницаемости для ионов, микровязкость, а также работа мембраносвязанных ферментных комплексов. Целью настоящего исследования явилось изучение липидного профиля в корнях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. при направленном изменении состояния мембран специфическими агентами: CaCl<sub>2</sub> (1 мМ) и β-ситостерином (0.5 мМ), уплотняющими мембрану, а также каналоформером нистатином (0.1 мМ) и детергентом тритоном X-100 (16 мкМ), увеличивающими ее проницаемость. Установлено, что стабилизация мембран CaCl<sub>2</sub> не приводила к изменениям в липидном составе клеток корней пшеницы, при этом индекс стабильности и степень упорядоченности мембран увеличивались. Насыщение мембран β-ситостерином также вызывало увеличение мембранной стабильности и упорядоченности липидного бислоя, что сопровождалось увеличением содержания стерина и моногалактозилдиацилглицерида и снижением уровня фосфатидилхолина и гликоцерамидов. Действие нистатина на интактные проростки не влияло на стабильность и упорядоченность мембран, несмотря на снижение общего уровня стерина в клетках корней пшеницы. Повреждение мембран клеток корней тритоном X-100, проявлявшееся в значительном увеличении выхода электролитов и снижении упорядоченности бислоя, сопровождалось увеличением в липидном профиле доли терпеноидов.

**Ключевые слова:** пшеница, стерин, фосфолипиды, мембранотропные вещества, проницаемость, микровязкость

DOI: 10.31857/S0233475520060080

### ВВЕДЕНИЕ

Проблема стрессовой устойчивости сельскохозяйственных растений является предметом пристального внимания исследователей в течение многих лет. Актуальная задача – выявление эндогенных механизмов защиты растений, в том числе опосредованных изменением состояния клеточных мембран. При воздействии абиотических стрессовых факторов окружающей среды на растение клеточная мембрана выступает в роли своеобразной мишени, принимая удар на себя, что зачастую может привести к ее повреждению, нарушению деятельности растительной клетки и

гибели организма в целом [1]. В естественных условиях растения постоянно подвергаются различным стрессовым воздействиям: колебания температуры (перегрев и охлаждение), засуха, засоление, окислительный стресс. При действии стрессовых факторов биологические мембраны претерпевают изменения биофизических параметров – текучести и проницаемости. Несмотря на возможные различия в механизмах действия, естественные абиотические стрессоры могут приводить к последствиям, схожим с действием мембранотропных агентов тритона и нистатина (увеличение проницаемости мембран) или кальция и ситостерина (увеличение микровязкости и

уменьшение проницаемости). Так, в литературе имеется достаточно информации о стресс-индуцированных изменениях мембранных характеристик. В частности, показано увеличение проницаемости мембран клеток кукурузы в условиях засухи [2], при солевом стрессе в корнях гидропонной культуры *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii* [3, 4].

Колебания температуры приводят к изменению мембранной текучести [5, 6]. Тепловой стресс вызывает повреждение мембран, нарушение стабильности и увеличение проницаемости мембран для электролитов в пшенице [7]. В наших исследованиях было показано увеличение проницаемости для электролитов мембран клеток корней проростков пшеницы, подвергнутых действию низких положительных температур [8]. Адаптивные возможности растений в значительной степени зависят от того, насколько они способны сохранять текучесть мембран и предотвращать фазовый переход липидов при действии стрессоров [9, 10]. Нарушение целостности клеточной мембраны и последующая утечка внутриклеточного содержимого могут иметь драматические последствия для клетки и организма в целом. В связи с этим анализ стабильности клеточных мембран используется в качестве одного из маркеров устойчивости растений при различных абиотических стрессах [11]. Состояние мембран во многом определяется составом мембранных липидов – фосфолипидов, гликолипидов и стероидов [12]. Важным показателем физико-химического состояния биологических мембран является микровязкость мембран, которая определяется природой мембранных липидов [13]. Степень микровязкости мембран зависит от многих факторов, например содержания стероидов, состава жирных кислот, состояния и количества белков в мембране, pH, ионной силы и т.д. Все эти факторы влияют на характер упаковки бислоя и подвижность его компонентов. Физико-химическое состояние бислоя может влиять на эластичность мембран и их проницаемость, подвижность и активность мембранных белков и липидов [14]. Эти изменения определяют работу многочисленных мембраносвязанных ферментных комплексов, в том числе компонентов сигнальных систем, запускающих стрессовые реакции и адаптационные процессы. Выявление взаимосвязи биофизического состояния мембран и их липидного состава может способствовать пониманию фундаментальных механизмов стрессовой устойчивости растений. Целью настоящего исследования явилось изучение липидного профиля в корнях проростков пшеницы *Triticum aestivum* L. при направленном изменении состояния мембран агентами, стабилизирующими мембраны –  $\text{CaCl}_2$  и  $\beta$ -ситостерином, а также агентами, увеличивающими мембранную проницаемость, –

каналоформером нистатином и детергентом тритоном X-100.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы.** В работе использовали следующие реактивы:  $\text{CaCl}_2$  (Fluka Chemie AG, Швейцария), сахароза (ТатХимПродукт, Россия), Sigma-Aldrich, США: тритон X-100, нистатин,  $\beta$ -ситостерин, триолеин, олеиновая кислота, сквален, фосфатидилхолин, смесь гликоцерамидов, HEPES, EDTA, поливинилпирролидон, дитиотреитол, фенолметансульфонилфторид, лаурдан.

**Объект исследования.** В работе использовали яровую пшеницу (*T. aestivum* L.) сорта “Казанская юбилейная”. Семена пшеницы, предварительно замоченные в дистиллированной воде в течение суток, помещали на различные среды для проращивания: 0.25 мМ  $\text{CaCl}_2$  – контроль; 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ ; 0.5 мМ  $\beta$ -ситостерин; 0.1 мМ нистатин; 16 мкМ тритон X-100. Проростки пшеницы выращивали в течение 4 сут при температуре +22°C и освещенности 100 Вт/м<sup>2</sup> с 12-часовым фотопериодом.

Проростки пшеницы выращивали на средах с добавлением исследуемых мембранотропных веществ в течение 4 сут. При исследовании влияния на клеточные мембраны детергента, октилфенолполиэтиленгликольного эфира, тритона X-100, 4-дневные проростки пшеницы, выращенные на дистиллированной воде, помещали в раствор детергента на 3 ч, после чего их отмывали и анализировали.

**Определение выхода электролитов и индекса мембранной стабильности (ИМС).** Навеску корней проростков пшеницы (0.1 г) несколько раз промывали в бидистиллированной воде, затем погружали в бюксы с бидистиллированной водой (10 мл) и выдерживали в термостате при температуре 40°C в течение 30 мин. Электропроводность раствора после инкубации ( $C_1$ ) измеряли с помощью кондуктометра Cond 7310 (WTW, Германия). Полный выход электролитов ( $C_2$ ) определяли по электропроводности той же вытяжки после разрушения растительной ткани кипячением в течение 10 мин [15]. Выход электролитов ( $C$ ) рассчитывали в процентах от полного выхода по формуле:

$$C = (C_1/C_2) \times 100\%$$

ИМС рассчитывали по формуле:

$$\text{ИМС} = (1 - C_1/C_2) \times 100\%.$$

**Определение величины генерализационной поляризации возбуждения флуоресценции липофильного зонда лаурдана в микросомальных мембранах растительных клеток.** Навеску корней (10 г) гомогенизировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 50 мМ HEPES (pH 7.5), 1 мМ EDTA (pH 8.0), 0.6% поливинилпирролидон, 5 мМ ди-

**Таблица 1.** Калибровочные уравнения для количественного определения липидов

Вещества-стандарты	Количество вещества, мкг	Полученное калибровочное уравнение (по площади пиков)	r; sdv
Фосфатидилхолин	4; 6; 8	$y = 1629 + 864.6x$	0.97; 9.47
Гликоцерамид 1	2.4; 3.6; 4.8	$y = 4703 + 2020x$	0.99; 1.44
Гликоцерамид 2	1.6; 2.4; 3.2	$y = 2336 + 2365x$	0.99; 0.53
$\beta$ -Ситостерол	2; 4; 6; 8; 10	$y = 4812.461 + 668.782x$	0.96; 6.88
Циклоартенол	0.2; 0.3; 0.4	$y = 1344 + 5.852x$	0.99; 2.57
Сквален	4; 6; 8	$y = 4081 + 651x$	0.99; 3.07

тиотреитол, 1 мМ фенолметансульфонилфторида. Микросомальные мембраны осаждали центрифугированием гомогената в течение 30 мин при 100000 g. Осадок ресуспендировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 50 мМ HEPES (рН 7.0), и использовали для исследования. Степень микровязкости мембран микросомальной фракции клеток корней пшеницы анализировали с помощью флуоресцентного липофильного зонда лаурдана. Флуоресценция лаурдана в разных частях спектра позволяет выявить изменения в упорядоченности фосфолипидов в мембране, которая зависит от физического состояния липидного бислоя [16]. К микросомальным мембранам добавляли 1 мМ раствор лаурдана и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин в темноте. Измерение интенсивности флуоресценции лаурдана проводили на спектрофлуориметре Флюорат-02-Панорама (Россия). По изменению интенсивности излучения флуоресценции лаурдана проводили расчет значения ГП, по которому оценивали микровязкость мембран. Обобщенная поляризация возбуждения была получена из уравнения:

$$\text{ГП} = (I_{430} - I_{490}) / (I_{430} + I_{490}),$$

где  $I_{430}$  и  $I_{490}$  – интенсивность излучения при 430 и 490 нм.

По данным литературы, значение ГП колеблется в пределах от  $-1$  до  $+1$ .  $-1$  означает неупорядоченную фазу, тогда как значение ГП  $+1$  означает полностью упорядоченную фазу. Экспериментально эти значения зависят от липидного состава мембран, температуры окружающей среды и прочих факторов [17].

**Экстракция липидов из корней пшеницы и анализ их состава методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).** Экстракцию липидов из корней пшеницы осуществляли изопропанолом, затем смесью изопропанол/хлороформ (1:1) по методу Николса [18] с модификациями [19]. Выход липидов определяли гравиметрическим методом. Анализ состава липидов, экстрагированных из корней пшеницы, проводили с помощью высокоэффективной тонкослой-

ной хроматографии (ВЭТСХ) с использованием оборудования фирмы SAMAG (Швейцария). Для хроматографии использовали классические ТСХ-пластины на стекле, силикагель 60, размером  $10 \times 20$  см (Merck KGaA, Германия), которые перед анализом элюировали этанолом и активировали нагреванием  $+120^\circ\text{C}$  20 мин. Нанесение растворов объектов исследования и стандартов на ТСХ-пластину выполняли на автоматическом аппликаторе Linomat 5 в виде треков шириной 8 мм. Разделение липидов проводили в автоматической камере для элюирования ADC 2, линия фронта подвижной фазы – 80 мм. Для анализа нейтральных липидов в качестве подвижной фазы использовали смесь петролейный эфир : этиловый эфир : уксусная кислота (80 : 20 : 1), полярных липидов – хлороформ : метанол : вода (65 : 25 : 4). Для дериватизации использовали реагент – 5%-раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в этаноле. Пластину опрыскивали реагентом с помощью пульверизатора (Ленхром, Россия), высушивали, переносили в сушильный шкаф и нагревали 20 мин при температуре  $+150^\circ\text{C}$ . Денситометрическое сканирование ТСХ-пластин после дериватизации проводили на приборе TLS Scanner 4 с использованием компьютерной программы winCATS 1.4.9. Параметры сканирования: режим – отражательная абсорбция, длина волны – 490 нм, щель –  $8.00 \times 0.40$  мм, скорость сканирования 20 мм/с, разрешение – 100 мкм/шаг, математический фильтр Savitsky–Golay 7. Количество липидов в исследуемых экстрактах из корней проростков пшеницы осуществляли с помощью калибровочных уравнений зависимости площади пиков ( $y$ ) от количества чистых липидов – стандартов ( $x$ ) (табл. 1).

**Статистическая обработка данных.** Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась путем расчета стандартного отклонения с использованием  $t$ -критерия Стьюдента с помощью программы Microsoft Excel и  $U$ -критерия Манна–Уитни с использованием автоматической программы для онлайн расчета  $U$ -критерия Манна–Уитни (<https://statpsy.ru/mana-uitni/onlajn-raschet-kriteriya-u-manna-uitni/>). Результа-

**Таблица 2.** Выход электролитов, ИМС и ГП в корнях проростков пшеницы при действии мембранотропных веществ ( $n = 9$ )

Вариант	Выход электролитов, %	ИМС, %	ГП
Контроль	26.4 ± 0.3	73.6	0.16 ± 0.01
CaCl <sub>2</sub> (1 мМ)	19.5 ± 5.1	80.5	0.19 ± 0.01
β-Ситостерин (0.5 мМ)	22.3 ± 1.3	77.7	0.21 ± 0.03
Нистатин (0.1 мМ)	24.8 ± 2.1	75.2	0.14 ± 0.05
Тритон X-100 (16 мкМ)	54.5 ± 10.7	45.5	0.11 ± 0.01

ты денситометрии обрабатывались автоматически с помощью специализированной программы win-CATS, версия 1.4.9 с использованием фильтра Savitsky–Golay 7.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе с помощью мембранотропных агентов были смоделированы различные состояния растительных мембран: стабилизация, уплотнение и нарушение проницаемости, которые могут наблюдаться в клетках растений в естественных стрессовых условиях. При действии мембранотропных агентов нами обнаружены изменения таких важных мембранных характеристик, как проницаемость мембран, микровязкость и индекс мембранной стабильности.

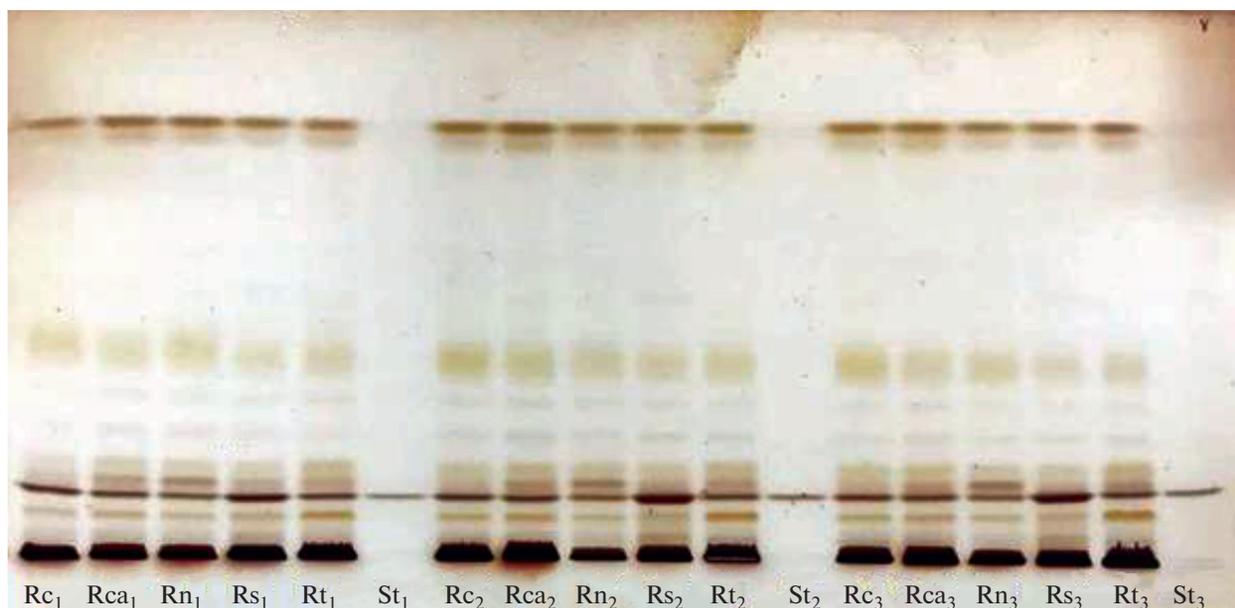
### Исследование влияния мембранотропных соединений на проницаемость и микровязкость мембран клеток корней пшеницы

В формировании ответной реакции растений на внешние воздействия значительную роль играет клеточная поверхность, от состояния которой зависят как ранние реакции, так и более длительные, связанные с адаптацией процессы. Одним из элементов защитной реакции клеток на воздействие является снижение проницаемости мембран для ионов [20]. Особое значение в интеграции клеточных функций у растений принадлежит Ca<sup>2+</sup>, который является универсальным триггером многих клеточных процессов [21]. Известно, что экзогенный кальций выполняет роль стабилизатора интегральной фосфолипидной и белковой фазы мембран [22]. Ионы кальция, связываясь с мембранами, образуют мостики между отрицательно заряженными группами двух соседних молекул белков (а также липидов) мембран. На тенях эритроцитов показано, что 80% Ca<sup>2+</sup> связывается с карбоксильными группами белков, а 15–20% – с фосфатными группами кислотных фосфолипидов [23]. Кроме того, связанный отрицательно заряженной группой ион Ca<sup>2+</sup> способен вызывать дегидратацию. Частичная дегидратация и снижение отрицательного заряда мембраны, по мнению Левина [24], являются факто-

рами, стабилизирующими структуру мембран. В наших экспериментах выращивание проростков пшеницы на 1 мМ CaCl<sub>2</sub> приводило к снижению выхода электролитов из корневых клеток, увеличению ИМС на 7% и возрастанию ГП на 4%, что свидетельствует об увеличении микровязкости мембран (табл. 2).

Стабилизирующий эффект на мембраны клеток корней пшеницы также наблюдался при добавлении в среду выращивания проростков β-ситостерина (0.5 мМ), в частности, наблюдалось уменьшение выхода электролитов из клеток, увеличение ИМС на 4.7% и возрастание ГП на 5% (табл. 2). Известно, что β-ситостерин является одним из основных стероидов, содержащихся в плазматической мембране растительных клеток, который увеличивает упорядоченность мембран [25].

Другим агентом, модифицирующим мембраны, является полиеновый антибиотик, каналоформер нистатин. Действие нистатина достаточно подробно изучено на модельных мембранах [26]. Было показано, что нистатин нарушает структурную организацию мембран путем связывания со стеринами, входящими в их состав, и образования пор. В результате этого взаимодействия увеличивается ионная проницаемость мембран, происходит потеря клеткой воды, аминокислот и других компонентов [27, 28]. Ранее на модельной системе, отсеченных корнях проростков пшеницы, нами было показано, что уже с первых минут действия нистатина на корни происходит значительное увеличение проницаемости мембран для электролитов и деполяризация плазматической мембраны [28], наблюдается нарушение важнейших физиологических процессов и значительное снижение жизнеспособности клеток [29]. Возможно, что токсические действия нистатина на клетки усугублялись раневым стрессом, сопровождающим отсечение корней от проростков [30]. В настоящем исследовании действию нистатина подвергались интактные проростки пшеницы, которые выращивались на растворе антибиотика в течение 4 сут. В отличие от предыдущих экспериментов, нистатин не оказывал дестабилизирующего действия на мембраны клеток корней пшеницы: выход электролитов, индекс мембран-



**Рис. 1.** Хроматограмма нейтральных липидов в экстрактах корней пшеницы, содержащих липофильные соединения, в видимом свете после дериватизации пластин 5% раствором  $H_2SO_4$  в этаноле: Rc1,2,3 – контроль; Rca1,2,3 –  $CaCl_2$ ; Rn1,2,3 – нистатин; Rs1,2,3 –  $\beta$ -ситостерин; Rt1,2,3 – тритон X-100; St1,2,3 – стандарт ( $\beta$ -ситостерин).

ной стабильности и микровязкость были близки к контрольным значениям (табл. 1). Можно предположить, что для интактных корней использование нистатина в данной концентрации не было токсичным и не вызвало изменений в проницаемости клеточных мембран и ИМС.

В нашей работе было изучено действие на корни пшеницы еще одного мембранотропного агента, резко меняющего физико-химические параметры мембран, тритона X-100. Тритон X-100 – это неионный детергент, механизм действия которого основан на извлечении мембранных фосфолипидов и разрушении их комплексов с белками [31]. Показано, что обработка проростков пшеницы тритоном X-100 приводила к двукратному увеличению выхода электролитов, снижению ИМС на 28% и заметному снижению микровязкости мембран (табл. 2).

Таким образом, изучение мембранных характеристик клеток корней пшеницы при действии мембранотропных веществ подтвердило специфичность их действия на мембраны клеток.

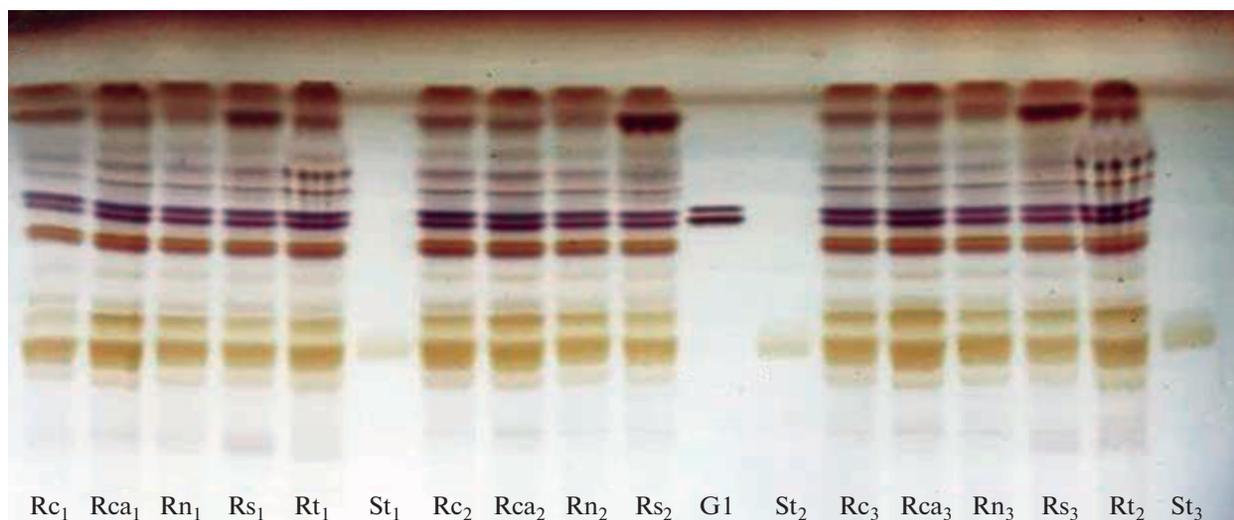
#### **Анализ липидного состава корней пшеницы при действии мембранотропных веществ**

На рис. 1 и рис. 2 приведены пластины ТСХ анализа нейтральных и полярных липидов в исследуемых экстрактах корней пшеницы. Результаты их денситометрии приведены в табл. 3.

В ходе проведенного ВЭТСХ анализа было показано, что экстракты из корней пшеницы в кон-

трольном и опытных вариантах имеют одинаковый качественный состав липидов, но отличаются по их количественному содержанию. Нейтральные липиды корней пшеницы представлены как омыляемыми (ацилглицериды, эфиры стерина), так и неомыляемыми липидами (стерины, терпеноиды, ЖК и др.). Во всех исследуемых экстрактах стерины и углеводороды, в том числе сквален, занимают наибольшую долю в сумме липидных веществ (табл. 3). Содержание ацилглицеридов (триацилглицеридов (ТАГ) и диацилглицеридов (ДАГ)), являющихся основными запасными липидами, составляет в сумме около 10–16%, тогда как на долю ЖК приходится не более 1%.

Качественный анализ фосфолипидного состава показал, что среди спектра разнообразных фосфолипидов, обнаруженных во всех исследуемых экстрактах, наибольшее количество (около 19 и 13% соответственно) приходится на фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭ) (табл. 3). Эти соединения являются главными липидными компонентами мембран в клетках высших растений и метаболически связаны друг с другом [33]. Предшественником их синтеза является фосфатидилсерин, содержание которого в исследуемых экстрактах почти в 13–16 раз ниже по сравнению с ФХ и ФЭ. Исследование липидного профиля корней *Arabidopsis* при недостатке  $Ca^{2+}$  показало повышение уровня ФХ, лизо-ФХ, ФЭ, лизо-ФЭ, фосфатидинозитола (ФИ) и ТАГ, биосинтеза фосфатидной кислоты и биосинтеза ДАГ [34]. Повышение содержания ТАГ и молярного соотношения ФХ/ФЭ в этих корнях



**Рис. 2.** Хроматограмма полярных липидов в экстрактах корней пшеницы, содержащих липофильные соединения, в видимом свете, после дериватизации пластин 5% раствором  $H_2SO_4$  в этаноле: Rc1,2,3 – контроль; Rca1,2,3 –  $CaCl_2$ ; Rn1,2,3 – нистатин; Rs1,2,3 –  $\beta$ -ситостерин; Rt1,2 – тритон X-100; St1,2,3 – стандарт (фосфатидилхолин); G1 – стандарт (гликоцерамиды).

может быть направлено на поддержание стабильности мембраны и баланса между мембранными и запасными липидами. Это исследование демонстрирует важную роль  $Ca^{2+}$  в поддержании стабильности плазматической мембраны [34]. В наших экспериментах выращивание проростков пшеницы на 1 мМ  $CaCl_2$  не вызвало изменений в содержании основных фосфолипидов – ФХ и ФЭ (табл. 3), стабильность и упорядоченность мембран при этом возрастали (табл. 2). Ранее было показано, что увеличение уровня экзогенного  $Ca^{2+}$  приводило к увеличению содержания стерина, ФЛ, СЖК в отсеченных корнях пшеницы, что, по мнению авторов, приводило к стабилизации мембран, характерной для клеток корня при переходе в состояние “относительного покоя” [21]. В наших экспериментах в присутствии  $CaCl_2$  наблюдалось увеличение содержания ФГ и ФИ. Учитывая то, что ФИ является основным компонентом митохондриальных мембран [35], можно предположить, что возрастание количества этого фосфолипида необходимо для поддержания  $Ca^{2+}$ -депонирующей функции митохондрий.

В составе гликолипидов, идентифицированных в исследуемых экстрактах, показано наличие гликоцерамидов двух типов: моногалактозилдиацилглицерида (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицерида (ДГДГ) (табл. 3). Известно, что эти соединения являются важными мембранными липидными компонентами в растениях. Несмотря на то, что гликолипиды не считаются основными компонентами непластидных мембран, изменения в их содержании часто наблюдаются в условиях стресса, что свидетельствует об их важной

роли в приобретении стрессовой устойчивости растений [36]. Было показано, что действие  $\beta$ -ситостерина на корни пшеницы приводило к существенным изменениям в содержании МГДГ и ДГДГ в липидном профиле. По сравнению с контролем содержание МГДГ увеличивается в 1.6 раза, а ДГДГ – наоборот снижается в 1.3 раза (табл. 3). В литературе имеются данные о том, что в условиях дефицита фосфора может наблюдаться увеличение содержания галактолипидов как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих тканях [36]. По мнению Киселевой с соавтором, недостаток фосфора может стимулировать синтез ФХ по так называемому альтернативному механизму, путем последовательного трехступенчатого метилирования ФЭ [37]. При этом на фоне редукции предшественников, в том числе ФК и ФЭ, происходит аккумуляция ФХ, которые в дальнейшем, при участии фосфолипазы С подвергаются гидролизу до диацилглицеридов. Образующиеся диацилглицериды расходуются на синтез гликолипидов, главным образом ДГДГ и/или МГДГ [37]. В настоящее время точно установлено, что дефицит фосфата вызывает замену мембранных фосфолипидов нефосфатсодержащими галактолипидами МГДГ и ДГДГ [38]. Замена фосфолипида на ДГДГ происходит в листьях и корнях *Arabidopsis* [39], побегах и корнях овса [40], культуры кленовых клеток сикамора [41], соевых бобах [42]. В нашем случае, вероятно, происходит вытеснение молекул ФХ  $\beta$ -ситостерином, которое вызывает увеличение содержания МГДГ.

В табл. 4 обобщены данные определения суммарного количества липидных веществ, извлекаемых из контрольного и опытных вариантов

**Таблица 3.** Состав и содержание липидов в экстрактах из корней проростков пшеницы, обработанных мембранотропными веществами ( $n = 3$ )

$R_f$	Содержание, %*					Отнесение
	контроль	CaCl <sub>2</sub> (1 мМ)	$\beta$ -Ситостерин (0.5 мМ)	Нистатин (0.1 мМ)	Тритон X-100 (16 мкМ)	
Нейтральные липиды						
0.04	42.2 ± 2.5	41.8 ± 1.1	40.9 ± 2.1	39.8 ± 2.4	39.2 ± 2.3	Не идентифицировано
0.14	3.7 ± 0.5	3.9 ± 0.2	4.7 ± 0.6	3.5 ± 0.6	7.5 ± 0.5	1,2-Диглицериды***
0.18	14.0 ± 1.0	12.5 ± 0.4	21.4 ± 1.9	11.5 ± 0.3	12.7 ± 0.4	Стерины**
0.21	2.4 ± 0.4	4.3 ± 0.2	3.1 ± 0.9	7.4 ± 1.1	4.2 ± 0.6	Высшие спирты***
0.25	3.3 ± 0.9	3.7 ± 0.6	3.0 ± 0.2	3.4 ± 0.8	5.0 ± 0.3	Терпеноиды**
0.33	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.2	Жирные кислоты**
0.41	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	Не идентифицировано
0.51	10.3 ± 0.5	7.5 ± 0.4	6.3 ± 0.5	9.7 ± 1.4	8.7 ± 0.4	Триглицериды**
0.65	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1	Не идентифицировано
0.92	3.3 ± 1.2	3.2 ± 0.4	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.5	3.5 ± 1.0	Не идентифицировано
0.98	4.7 ± 0.7	6.0 ± 0.4	3.9 ± 0.7	5.2 ± 0.7	4.7 ± 0.6	Эфиры стеринов***
1.00	13.6 ± 1.9	14.0 ± 0.7	11.6 ± 1.1	14.3 ± 1.1	12.1 ± 1.1	Углеводороды, сквален**
Полярные липиды						
0.15	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	1.4 ± 1.0	1.0 ± 0.7	1.5 ± 0.4	Фосфатидилсерин***
0.17	0.6 ± 0.5	1.8 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.8	1.5 ± 0.8	Фосфатидилинозитол***
0.31	3.2 ± 0.2	3.4 ± 0.4	2.7 ± 0.5	3.2 ± 0.4	4.0 ± 0.9	Не идентифицировано
0.38	19.3 ± 1.5	18.1 ± 2.5	15.1 ± 1.7	18.6 ± 1.3	15.9 ± 1.1	Фосфатидилхолин**
0.45	7.6 ± 1.0	10.6 ± 0.3	7.1 ± 0.3	8.4 ± 1.0	9.4 ± 1.5	Фосфатидилглицерин***
0.49	2.7 ± 0.2	2.6 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.1	2.0 ± 0.5	Дифосфатидилглицерин***
0.57	1.9 ± 0.4	2.0 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.7	Дигалактозилдиацилглицерид***
0.66	13.4 ± 1.0	12.7 ± 0.1	11.7 ± 0.4	13.6 ± 0.3	13.2 ± 0.1	Фосфатидилэтанолламин***
0.72	6.0 ± 0.5	6.2 ± 0.5	5.7 ± 0.2	6.5 ± 0.4	6.4 ± 0.1	Гликоцерамид 1**
0.74	6.6 ± 1.0	6.4 ± 0.9	4.7 ± 0.2	5.5 ± 0.7	5.4 ± 0.3	Гликоцерамид 2**
0.80	3.4 ± 0.5	3.2 ± 0.5	4.0 ± 0.4	3.2 ± 0.7	5.2 ± 0.5	Не идентифицировано
0.83	4.8 ± 0.8	4.7 ± 1.0	6.2 ± 1.0	4.1 ± 0.6	6.2 ± 0.3	Не идентифицировано
0.87	3.2 ± 0.6	3.8 ± 0.8	3.6 ± 0.8	3.5 ± 0.7	2.6 ± 0.1	Не идентифицировано
0.93	12.0 ± 1.1	9.8 ± 0.9	19.9 ± 2.8	11.8 ± 1.2	9.9 ± 1.1	Моногалактозилдиацилглицерид***
0.99	14.9 ± 2.2	13.6 ± 0.7	13.1 ± 1.2	14.3 ± 1.5	14.9 ± 2.9	Не идентифицировано

\* Рассчитано по площади пиков на денситограмме.

\*\* Отнесение путем сопоставления  $R_f$ -пятна с  $R_f$ -вещества-стандарта.

\*\*\* Отнесение в сопоставлении с литературными данными [32].

корней пшеницы, и количественного анализа отдельных липидов в полученных экстрактах.

Установлено, что количество липидных веществ в корнях пшеницы при действии CaCl<sub>2</sub>,  $\beta$ -ситостерина и нистатина практически не изменяется. Наибольшее количество липидов было получено при экстракции корней пшеницы, обработанных тритоном X-100 (табл. 4). Это почти в 3 раза выше, чем в контроле и других опытных образцах. Наблюдаемый эффект резкого увеличения количества липидов, полученных из корней

пшеницы на фоне тритона X-100, может быть обусловлен повышением доступности липидов к извлечению за счет их высвобождения из мембранных клеточных структур в присутствии детергента.

Анализ действия других мембранотропных веществ выявил существенные изменения липидного профиля в корнях пшеницы (табл. 4). Так, показано, что при выращивании проростков на среде с  $\beta$ -ситостерином в 3.4 раза увеличивается содержание стеринов в корнях по сравнению с

**Таблица 4.** Количество липидов в корнях пшеницы при действии мембранотропных веществ ( $n = 3$ )

Количество, мкг/г сырого веса корней	Вариант				
	контроль	CaCl <sub>2</sub> (1 мМ)	β-Ситостерин (0.5 мМ)	Нистатин (0.1 мМ)	Тритон X-100 (16 мкМ)
Сумма липидов	1350 ± 212	1600 ± 141	1600 ± 141	1550 ± 71	4400 ± 282
Стерины	36.8 ± 3.3	32.2 ± 2.8	125.4 ± 5.6	11.1 ± 0.7	35.6 ± 1.5
Терпеноиды	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.7	0.7 ± 0.2	1.5 ± 0.5	2.5 ± 0.5
Фосфатидилхолин	180.4 ± 15.5	191.4 ± 1.2	131.6 ± 8.5	156.4 ± 11.3	162.8 ± 12.8
Гликоцерамид 1	7.2 ± 0.7	8.1 ± 1.0	4.7 ± 2.0	9.8 ± 0.8	9.9 ± 2.5
Гликоцерамид 2	19.7 ± 0.3	21.1 ± 0.1	8.5 ± 0.4	11.1 ± 0.5	14.4 ± 2.3
Углеводы, в том числе сквален	61.2 ± 8.5	51.5 ± 1.7	37.5 ± 6.8	44 ± 8.0	42.6 ± 5.4

контролем (табл. 4). Это указывает на то, что растительные клетки способны использовать экзогенный β-ситостерин, что приводит к увеличению стабильности мембран (табл. 2). Из данных литературы известны структурные особенности стеринов, необходимые для их встраивания в мембраны и выполнения ими структурной функции: это наличие свободной β-гидроксильной группы при С-3, плоский тетрациклический скелет и алифатическая боковая цепь с 8–10 атомами углерода [43]. Основные растительные стеринны обладают этими характеристиками. Эксперименты на модельных мембранах из ФХ и стеринов сои показали, что все растительные стеринны могут регулировать жидкость и проницаемость фосфолипидных бислоев, но с разной эффективностью [44–46]. Функциональный анализ физических свойств моделей растительных мембран показал, что среди различных стеринов β-ситостерин является основным стеринном, увеличивающим упорядоченность жидкой фазы растительных мембран [46, 47].

Стерины и другие изопреноидные производные могут влиять на свойства мембран посредством изменения состояния мембран в результате взаимодействия с другими липидами бислоя [46]. В мембранах стеринны взаимодействуют с гликоцерамидами и фосфолипидами. Важной особенностью гликоцерамидов является их высокое сродство к стеринам, обусловленное Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями боковых цепей стериннов с насыщенными алкильными цепями сфинголипидов. Это способствует более плотной упаковке и облегчает образование липидных микродоменов (“рафтов”). В литературе эти два класса липидов часто называют рафтообразующими липидами [48]. Эти микродомены могут играть важную роль в передаче сигнала в клетку и служить платформами для ферментных сигнальных комплексов.

Ранее в наших исследованиях была обнаружена интересная закономерность: изменение уровня

стериннов при действии низких положительных температур [8] и стерин-связывающих агентов [29, 49] сопровождается обратноподобным изменением уровня гликоцерамидов. В настоящей работе также наблюдались подобные взаимосвязанные изменения: увеличение уровня стериннов под действием β-ситостерина сопровождалось снижением содержания гликоцерамидов (ГлЦер) (табл. 4), что свидетельствует о наличии функциональной взаимосвязи между этими двумя классами липидов. Кроме того, исследования на клетках дрожжей и животных показали, что пути биосинтеза стериннов и сфинголипидов взаимосвязаны [50], это также может иметь место и у растений. Например, нарушение пути биосинтеза стериннов у проростков лука-порей нарушает синтез сложных сфинголипидов, таких как глюкозилцерамиды [29, 51]. Можно полагать, что существует взаимосвязь между метаболизмом стериннов и сфинголипидов, что может иметь значение для поддержания соотношений и функционального взаимодействия этих классов липидов [29, 52].

Выращивание проростков на среде со стеринсвязывающим агентом нистатином ожидаемо приводило к резкому (в 3.3 раза) снижению количества детектируемых стериннов (табл. 4). Наряду с этим при действии нистатина наблюдалось снижение уровня ФХ.

Влияние на мембраны неионного детергента тритона X-100, как известно, обусловлено взаимодействием его липофильных цепей с гидрофобными поверхностями молекул белков и вытеснением их из мембран. Тритон X-100 действует на мембраны достаточно агрессивно, солибилизируя до 80% белков и 90% фосфолипидов [53]. В работе Гордона с соавторами [28] показано, что добавление тритона X-100 в среду инкубации отсеченных корней вызывает резкое усиление проницаемости плазмалеммы для ионов и значительную стимуляцию потребления кислорода корнями пшеницы. Исследования, проведенные на

пшенице и сахарной свекле, показали эффективность тритона X-100 как эпимутагена [54]. Воздействие тритона X-100 на растения сахарной свеклы приводило к изменению морфологии корня и листьев, признака “стерильность—фертильность” пыльцы, динамики прорастания семян [55]. Таким образом, можно заключить, что тритон X-100 оказывает мощное стрессовое воздействие на мембраны клеток. В настоящей работе мы наблюдали его значительное повреждающее действие на клеточные мембраны корней пшеницы, которое выражалось в двукратном увеличении выхода электролитов, снижении ИМС на 28% и заметном снижении микровязкости мембран (табл. 2). Эти изменения мембранных характеристик сопровождались увеличением количества терпеноидов в 1.6 раза относительно контроля, незначительным снижением количества ГлЦер 2, снижением содержания ФХ, уровень стерина оставался неизменным (табл. 4). Кроме того, при действии тритона X-100 наблюдалось многократное увеличение общей массы выделенных липидных веществ. Можно полагать, что увеличение количества терпеноидов может быть результатом большей доступности липидных компонентов для детергента.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе корни проростков пшеницы подвергались действию мембранотропных агентов ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\beta$ -ситостерин, нистатин, тритон X-100) с целью моделирования стресс-индуцированных состояний мембран растительных клеток. Обработка корней  $\text{CaCl}_2$  и  $\beta$ -ситостерином приводила к увеличению мембранной стабильности и упорядоченности липидного бислоя. Парадоксальным представляется факт, что, несмотря на значительное снижение количества детектируемых стерина при действии каналоформера нистатина на интактные корни, уменьшения стабильности и упорядоченности мембран не наблюдалось. Значительное повреждение клеточных мембран детергентом тритоном X-100 сопровождалось увеличением в липидном профиле корней доли терпеноидов, возможно, обусловленным большей доступностью липидных компонентов к извлечению. Наиболее выраженным среди всех обнаруженных эффектов оказалось действие экзогенного  $\beta$ -ситостерина. Увеличение стабильности и упорядоченности мембран в присутствии этого стерина сопровождалось увеличением общего содержания стерина и МГДГ, а также снижением количества ФХ и ГлЦер. На наш взгляд, эти изменения в липидном профиле могут быть взаимосвязаны. Так, встраивание  $\beta$ -ситостерина может приводить к вытеснению из мембран молекул ФХ, уменьшение доли которых, в свою очередь, вызывает увеличение содержания галакто-

липидов, в частности МГДГ. Обратнаправленные изменения в содержании стерина и ГлЦер, показанные в присутствии экзогенного  $\beta$ -ситостерина, наблюдались нами ранее и при других воздействиях. Это может свидетельствовать о наличии функциональной взаимосвязи между этими двумя классами липидов.

Таким образом, воздействие на клетки проростков пшеницы мембранотропных агентов индуцирует изменения не только физико-химического состояния мембран, но и их липидного состава. Комплекс этих изменений может быть одним из механизмов, которые запускаются в клетках растений в стрессовых условиях.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН, а также при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00988 (для Ю.Н. Валитовой) и гранта Президента РФ МК-264.2020.4 (для А.Г. Ренковой).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shi H., Jiang C., Ye T., Tan D.X., Reiter R.J., Zhang H., Liu R., Chen Z. 2015. Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. *J. Exp. Bot.* **66**, 681–694.
2. Li-Ping B., Fang-Gong S., Ti-Da G., Zhao-Hui S., Yin-Yan L., Guang-Sheng Z. 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize1. *Pe-dosphere*. **16**, 326–332.
3. Nedjimi B., Daoud Y. 2009. Ameliorative effect of  $\text{CaCl}_2$  on growth, membrane permeability and nutrient uptake in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* grown at high (NaCl) salinity. *Desalination*. **249**, 163–166.
4. Guo Q., Liu L., Barkla B.J. 2019. Membrane lipid remodeling in response to salinity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4264.
5. Singer S. D., Zou J., Weselake R.J. 2016. Abiotic factors influence plant storage lipid accumulation and composition. *Plant. Sci.* **243**, 1–9.
6. Niu Y., Xiang Y. 2018. An overview of biomembrane functions in plant responses to high-temperature stress. *Front. Plant. Sci.* **9**, 915.
7. Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam M.M., Roychowdhury R., Fujita M.H. 2013. Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 9643–9684.
8. Valitova J., Renkova A., Mukhitova F., Dmitrieva S., Minibayeva F. 2019. Membrane sterols and genes of sterol biosynthesis are involved in the response of *Triticum aestivum* seedlings to cold stress. *Plant. Physiol. Biochem.* **142**, 452–459.
9. Лось Д.А. 2005. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений *Вестн. РАН.* **75**, 338–345.
10. Narayanan S., Tamura P.J., Roth M.R., Prasad P.V., Welti R. 2016. Wheat leaf lipids during heat stress:

- I. High day and night temperatures result in major lipid alterations. *Plant. Cell. Environ.* **39**, 787–803.
11. Senthil-Kumar M., Ali K., Dahuja A., Tyagi A. 2015. Role of phytosterols in drought stress tolerance in rice. *Plant. Physiol. Biochem.* **96**, 83–89.
  12. Mazur P. 1969. Freezing injury in plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **20**, 419–448.
  13. Gerbeau-Pissot P., Der C., Dominique T., Anca I., Grosjean K., Roche Y., Perrier-Cornet J., Mongrand S., Plas F. 2014. Modification of plasma membrane organization in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant. Physiol.* **164**, 273–286.
  14. Болдырев А.А. 1985. *Биологические мембраны и транспорт ионов*. М.: Изд-во МГУ. 208 с.
  15. Sairam R.K., Saxena D.C. 2000. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: Possible mechanism of water stress tolerance. *J. Agron. Crop. Sci.* **184**, 55–61.
  16. Bagatolli L., Gratton E., Fidelio G. 1998. Water dynamics in glycosphingolipid aggregates studied by LAURDAN fluorescence. *Biophys. J.* **75**, 331–341.
  17. Sanchez S.A., Triccerri M.A., Gunther G., Gratton E. 2007. Laurdan generalized polarization: From cuvette to microscope. *Formatex*. 1007–1014.
  18. Nichols B.W. 1963. Separation of the lipids of photosynthetic tissues: Improvements in analysis by thin-layer chromatography. *Biochem. Biophys. Acta.* **70**, 417–422.
  19. Котлова Е.Р., Сеник С.В., Кюхер Т., Шаварда А.Л., Кияшко А.А., Псурцева Н.В., Зубарев Р.А. 2009. Изменения в составе мембранных глицеро- и сфинголипидов в ходе развития поверхностной культуры *Flammulina velutipes* II. *Микробиология.* **78**, 226–235.
  20. Александров В.Я., Кислюк И.М. 1994. Реакция клетки на тепловой шок: физиологический аспект. *Цитология.* **36**, 5–59.
  21. Алексеева В.Я., Лыгин А.В., Гордон Л.Х., Николаев Б.А. 1999. Изменение липидного состава корней пшеницы при модификации кальцием клеточной поверхности. *Физиология и биохимия культурных растений.* **31**, 440–446.
  22. Nepler P.K., Wayne R.O. Calcium and plant development. 1985. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **36**, 397–439.
  23. Forstner J., Manery J. 1970. Calcium binding sites in human erythrocyte ghosts. *Fed. Proc.* **29**, 664.
  24. Левин С.В. 1976. *Структурные изменения клеточных мембран*. Л.: Наука ЛО. 224 с.
  25. Marsan M., Muller I., Milon A. 1996. Ability of clionasterol and poriferasterol (24-epimers of sitosterol and stigmasterol) to regulate membrane lipid dynamics. *Chem. Phys. Lipids.* **84**, 117–121.
  26. Ермишкин Л.Н., Зильберштейн А.А. 1982. Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства. *Итоги науки и техники. Биофизика мембран.* М., **2**, 82–160.
  27. Coutinho A., Silva L., Fedorov A., Prieto M. 2004. Cholesterol and ergosterol influence nystatin surface aggregation: relation to pore formation. *Biophys. J.* **87**, 3264–3276.
  28. Гордон Л.Х., Валитова Ю.Н., Огородникова Т.И., Рахматуллина Д.Ф., Алябьев А.Ю., Лосева Н.Л., Ценцевичский А.Н., Рубан Н.Ф. 2005. Энергетический обмен клеток корней пшеницы при модификации ионной проницаемости плазмалеммы каналлоформером нистатином. *Цитология.* **7**, 1088–1094.
  29. Valitova J., Sulkarnayeva A., Kotlova E., Ponomareva A., Mukhitova F., Murtazina L., Ryzhkina I., Beckett R., Minibayeva F. 2014. Sterol binding by methyl- $\beta$ -cyclodextrin and nystatin - comparative analysis of biochemical and physiological consequences for plants. *FEBS J.* **281**, 2051–206.
  30. Renkova A., Valitova J., Schaller H., Minibayeva F. 2019. The homoeologous genes encoding C24-sterol methyltransferase 1 in *Triticum aestivum*: Structural characteristics and effects of cold stress. *Biol. Plantarum.* **63**, 59–69.
  31. Xu H., Zhou S., Jiang D., Chen H.Y. 2018. Cholesterol oxidase/triton x-100 parked microelectrodes for the detection of cholesterol in plasma membrane at single cells. *Anal. Chem.* **90**, 1054–1058.
  32. Кейтс М. 1975. *Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов*. М.: Мир. 322 с.
  33. Ленинджер А. 1974. *Биохимия*. М.: Мир. 957 с.
  34. Zhang T., Yang J., Sun Y., Kang Y., Yang J., Qi Z.J. 2018. Calcium deprivation enhances non-selective fluid-phase endocytosis and modifies membrane lipid profiles in Arabidopsis roots. *Plant Physiol.* **226**, 22–30.
  35. Horvath S. E., Daum G. 2013. Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid. Res.* **52**, 590-614.
  36. Zhang M., Deng X., Yin L., Qi L., Wang X., Wang S., Li H. 2016. Regulation of galactolipid biosynthesis by over expression of the rice mgd gene contributes to enhanced aluminum tolerance in tobacco. *Front. Plant. Sci.* **7**, 337.
  37. Киселева М.А., Котлова Е.Р. Влияние длительного фосфорного голодания на мембранные липиды свободноживущей и симбиотических зеленых водорослей рода *Pseudococcomyxa* II. 2008. *Бот. журн.* **93**, 88–96.
  38. Tjellström H., Andersson M.X., Larsson K.E., Sandelius A.S. 2008. Membrane phospholipids as a phosphate reserve: The dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant. Cell. Environ.* **31**, 1388–1398.
  39. Härtel H., Dormann P., Benning C. 2000. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 10649–10654.
  40. Andersson M.X., Larsson K.E., Tjellström H., Liljeborg C., Sandelius A.S. 2005. Phosphate-limited oat. The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **280**, 27578–27586.
  41. Jouhet J., Maréchal E., Baldan B., Bligny R., Joyard J., Maryse A., Block J. 2004. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *Cell. Biol.* **167**, 863–874.
  42. Gaude N., Tippmann H., Flemetakis E., Katinakis P., Udvardi M., Dörmann P. 2004. The galactolipid digalactosyldiacylglycerol accumulates in the peribacteroid

- membrane of nitrogen-fixing nodules of soybean and Lotus. *J. Biol. Chem.* **279**, 34624–34630.
43. Bloch, K.E. 1983. Sterol structure and membrane function. *Crit. Rev. Biochem.* **14**, 47–82.
  44. Shuler I., Durtail G., Glasser N., Benveniste P., Hartmann M.A. 1990. Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols: a fluorescence anisotropy study. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1028**, 82–88.
  45. Schaller H. 2003. The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid. Res.* **42**, 163–175.
  46. Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В. 2016. Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия.* **81**, 1050–1068.
  47. Schuler I., Milon A., Nakatani Y., Ourisson G., Albrecht A.M., Benveniste P., Hartman M.A. 1991. Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6926–6930.
  48. Furt F., Simon-Plas F., Mongrand S. Murphy A.S., Schulz B., Peer W. 2011. Lipids of the plant plasma membrane. *Plant. Cell. Monographs.* Heidelberg: Springer. **19**, 3–30.
  49. Valitova J.N., Minibayeva F.V., Kotlova E.R., Novikov A.V., Shavarda A.L., Murtazina L.I., Ryzhkina I.S. 2011. Effects of sterol-binding agent nystatin on wheat roots: The changes in membrane permeability, sterols and glycosceramides. *Phytochemistry.* **72**, 1751–1759.
  50. Swain E., Baudry K., Stuke J., McDonough V., Germann M., Nickels J.T. 2002. Sterol-dependent regulation of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 26177–26184.
  51. Hartmann M.A., Perret A.M., Carde J.P., Cassagne C., Moreau P. 2002. Inhibition of the sterol pathway in leek seedlings impairs phosphatidylserine and glucosylceramide synthesis but triggers an accumulation of triacylglycerols. *Biochim. Biophys. Acta.* **1583**, 285–296.
  52. Nieto B., Fores O., Arry M., Ferrer A. 2009. Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry.* **70**, 53–59.
  53. Скоупс Р. 1985. Методы очистки белков. М.: Мир. 358 с.
  54. Махмудова К.Х., Богданова Е.Д., Левитес Е.В. 2009. Индукция тритоном X-100 наследуемых изменений морфологических признаков у *Triticum aestivum* L. *Генетика.* **45**, 564–568.
  55. Кирикович С.С., Левитес Е.В. 2010. Морфологические и физиологические изменения у *Beta vulgaris* L. под действием Тритона X-100. *Экологическое равновесие и устойчивое развитие территории*: Сб. науч. тр. СПб: ЛГУ им. А.С. Пушкина. 268–272.

## The Lipid Profile of Wheat Roots Treated with Membranotropic Agents

J. N. Valitova<sup>1,\*</sup>, V. R. Khabibrakhmanova<sup>2</sup>, A. V. Belkina<sup>2</sup>, A. G. Renkova<sup>1</sup>, F. V. Minibayeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, 420111 Russia

<sup>2</sup>Kazan National Research Technological University, Kazan, 420015 Russia

\*e-mail: yulavalitova@mail.ru

Most crops are seriously threatened by various abiotic stressors. Biological membrane is a primary barrier protecting from stress factors and acting as a target that takes a hit on itself. An important component of membranes, on which the state of a plant membrane depends, its permeability to ions, microviscosity, and the activity of membrane-bound enzyme complexes, are lipids. The aim of this study was to study the lipid profile in the roots of wheat seedlings of *Triticum aestivum* L. with a directed alteration of the membrane state by specific agents: CaCl<sub>2</sub> (1 mM) and β-sitosterol (0.5 mM) that increase the membrane rigidity, as well as the channel former nystatin (0.1 mM) and detergent Triton X-100 (16 μM) that increase the membrane permeability. It was found that stabilization of membranes by CaCl<sub>2</sub> did not lead to changes in the lipid composition of wheat root cells, while the stability index and degree of membrane ordering increased. Saturation of membranes with β-sitosterol also caused an increase in membrane stability and ordering of the lipid bilayer, which was accompanied by an increase in the content of sterols and monogalactosyl diacylglyceride and a decrease in the level of phosphatidylcholine and glycosceramides. The action of the channel former nystatin on intact seedlings did not affect the stability and orderliness of the membranes, despite a decrease in the total level of sterols in the cells of the roots of wheat. Damage of the root membranes by Triton X-100, which manifested itself in a significant increase in the electrolyte leakage and a decrease in the ordering of the bilayer, was accompanied by an increase in the proportion of terpenoids.

**Keywords:** wheat, sterols, phospholipids, membranotropic substances, permeability, microviscosity