

Ж. І. Рибченко, Т. О. Палладіна

Вплив синтетичних адаптогенних препаратів на функціонування вакуолярної H^+ -АТФази в клітинах коренів кукурудзи за умов засолення

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костериним)

Досліджено участь одного з двох електрогенних H^+ -насосів вакуолярної мембрани рослинних клітин, механізм якого репрезентовано H^+ -АТФазою F_0F_1 -типу, у посиленні солестійкості проростків кукурудзи за допомогою адаптогенних препаратів метіур та івін. Встановлено, що при обробці насіння цими препаратами транспортна активність H^+ -АТФази у вакуолярних мембранах клітин коренів посилюється, тоді як гідролітична активність зростає лише з віком у проростків у варіанті з метіуром. За умов сольової експозиції, викликаній 0,1 М NaCl, обробка препаратами посилює транспортну активність H^+ -АТФази, послаблюючи гідролітичну активність. Таким чином, адаптаційний ефект препаратів може пояснюватися посиленням транспортної функції вакуолярної H^+ -АТФази, що забезпечує енергією роботу вторинноактивного Na^+-H^+ -антипортера, який видаляє натрій з цитоплазми.

Засолення ґрунтів є для рослин найсильнішим стресовим фактором постійної дії, вплив якого останнім часом швидко скорочує їх видову різноманітність та світовий масив зрошуваних угідь. Особливістю механізму утворення сольового стресу в рослинах є те, що до порушення осмотичного та іонного гомеостазу й посилення процесів пероксидного окиснення в тканинах додається токсичний ефект натрію, який є головним катіоном солей, що призводять до засолення. Принципова відмінність у ставленні тваринних і рослинних організмів до натрію полягає в тому, що для перших він є життєво необхідним елементом, а для других — токсичним, оскільки порушує метаболічні процеси в цитоплазмі клітини. Процеси активного транспорту через плазматичну мембрану тваринної клітини підтримуються енергією мембранного потенціалу, що створюється в ній електрогенним Na^+ -насосом, механізм якого репрезентований Na^+, K^+ -АТФазою E_1, E_2 -типу [1]. У рослинній клітині потенціал на плазматичній мембрані створюється електрогенним H^+ -насосом, репрезентованим H^+ -АТФазою також E_1, E_2 -типу. Крім того, у рослинній клітині існує вакуолярний простір, відділений від цитоплазми вакуолярною мембраною, в якій функціонують два електрогенні H^+ -насоси, репрезентовані вакуолярною H^+ -АТФазою F_0F_1 -типу та H^+ -РРазою (пірофосфатазою). Na^+ виводиться з цитоплазми через плазматичну і вакуолярну мембрани за допомогою вторинноактивних Na^+-H^+ -антипортерів [2].

Класичні методи селекції виявилися непридатними для створення солестійких рослин через відсутність істотної різниці між ними на клітинному рівні за цією ознакою. Тому увагу було перенесено на створення солестійких трансгенних форм шляхом вбудови чужорідних генів, які кодують білки більш потужних Na^+-H^+ -антипортерів та системи їх регуляції [3]. Проте існує також можливість посилення солестійкості рослин за допомогою біологічно активних сполук. Працюючи в цьому напрямі, ми обрали два практично нетоксичні препарати метіур та івін, що були синтезовані як регулятори росту рослин стимулювальної дії в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України.

Дослідження солепротекторної здатності вказаних препаратів, здійснені у вегетаційних і польових умовах на кукурудзі, яка є дуже солечутливим злаком, виявили перевагу метіуру, ефект якого був сильнішим й зберігався протягом вегетації, що сприяло формуванню врожаю зерна [4]. Біохімічні дослідження, проведені на проростках кукурудзи, вирощених у водній культурі, виявили здатність метіуру та івіну, хоча й різною мірою, послаблювати інтенсивність процесів пероксидного окиснення в тканинах [5], а також підтримувати стан осмотичного гомеостазу шляхом посилення синтезу осмолітів — розчинних цукрів та амінокислот [6]. Тому ми вважали доцільним з'ясувати можливість впливу цих препаратів на функціонування електрогенних H^+ -насосів та Na^+ - H^+ -антипортерів у плазматичній та вакуолярній мембранах, зокрема, за умов засолення.

Наша мета полягала в дослідженні впливу зазначених препаратів та умов засолення на гідролітичну і транспортну функції вакуолярної H^+ -АТФази (Е С 3.6.3.14) у вакуолярній мембрані клітин коренів проростків кукурудзи.

За рослинний об'єкт були проростки кукурудзи (гібрид Десна СВ), які вирощували у водній культурі на живильному середовищі Хохленда при 25 °С та освітленні люмінесцентними лампами 50 Вт/м². У тижневому віці проростки переносили на свіже середовище, яке у варіантах із засоленням містило 0,1 М NaCl, що є критичною концентрацією для даної культури, і експонували на ньому протягом 1 або 10 діб. Обробку біоактивними препаратами здійснювали шляхом замочування насіння протягом доби в їх 10⁻⁷ М водних розчинах перед пророщуванням. Ця концентрація застосовувалася як антидепресантна, тоді як для стимуляції росту застосовують 10⁻⁴ М.

Препарати вакуолярної мембрани ізолювали з коренів проростків шляхом центрифугування в ступінчатому градієнті сахарози [7]. Гідролітичну активність в H^+ -АТФази визначали за кількістю вивільненого неорганічного фосфору [8], а транспортну — флуоресцентним методом з використанням зонда акридинового оранжевого [9]. Досліди проводили в шести біологічних і трьох аналітичних повтореннях, достовірність одержаних даних визначали за критерієм Стюдента.

Результати дослідження впливу препаратів на гідролітичну та транспортну активність вакуолярної H^+ -АТФази без засолення наведено в табл. 1. У 8-добових проростків при дії обох препаратів гідролітична активність ферменту дещо зменшувалась, тоді як транспортна активність збільшувалася в 2,5 рази. Гідролітична активність ферменту не змінювалася

Таблиця 1. Вплив адаптогенних препаратів на функціонування вакуолярної H^+ -АТФази в клітинах коренів проростків кукурудзи

Варіант досліджу	Вік проростків	
	8 діб	17 діб
<i>Гідролітична активність H^+-АТФази, нмоль $P_{неорг}/(мг\ білка \cdot хв)$</i>		
Контроль	53,0 ± 2,0 (100)	52,5 ± 3,0 (100)
Метіур	46,0 ± 9,0* (87)	61,7 ± 2,0 [#] (118)
Івін	47,0 ± 3,0* (89)	37,4 ± 2,0 [#] (71)
<i>Транспортна активність H^+-АТФази, Δ%F/(мг білка · хв)</i>		
Контроль	3,4 ± 1,0 (100)	7,5 ± 1,0 (100)
Метіур	8,3 ± 0,7 [#] (249)	10,7 ± 0,3 [#] (142)
Івін	7,2 ± 1,2 [#] (216)	11,2 ± 0,2 [#] (149)

Примітка. Тут і в табл. 2 у дужках вказано відсоток щодо контролю. [#] — достовірно щодо “безсолевого” контролю, * — достовірно щодо “солевого” контролю.

протягом 10 діб експерименту, тоді як транспортна у 17-добових проростків посилювалася у 2 рази. При обробці метіуром гідролітична активність ферменту збільшувалася на 118%, а івіном — зменшувалася в 1,5 раза, при цьому транспортна активність в обох випадках зростала.

Результати, що були одержані при сольовій експозиції проростків, подано в табл. 2.

Порівняння одержаних даних на “безсольовому” і “сольовому” контролі показало, що при 1-добовій сольовій експозиції гідролітична активність вакуолярної H^+ -АТФази зменшувалася в 2,4 раза, проте у стільки ж збільшувалася транспортна. Підвищення транспортної активності вакуолярної H^+ -АТФази за умов засолення спостерігали також інші дослідники у генетично модифікованих солестійких клітинах тютюну, картоплі, бобів та соняшника [10]. Це явище може бути проявом адаптаційної реакції, внаслідок чого створюється необхідний потенціал для транспортування натрію до вакуолярного простору. Проте це явище не спостерігалось нами при подовженні сольової експозиції до 10 діб, коли посилювалася гідролітична активність, а транспортна практично не змінювалася.

При обробці насіння препаратами гідролітична активність H^+ -АТФази при 1-добовій сольовій експозиції зменшувалася майже однаковою мірою, тоді як транспортна, навпаки, посилювалася: за дії метіуру — у 2,5 раза, за дії івіну — у 2,4 раза. При 10-добовій сольовій експозиції також спостерігалось послаблення гідролітичної активності та посилення транспортної.

Можна припустити, що віддалена в часі дія препаратів пов'язана з їх впливом на експресію генів білків вакуолярної H^+ -АТФази та/або серин-треонін кінази, яка бере участь у регуляції її активності [10].

Одержані результати у більшості випадків свідчать про наявність протилежних змін щодо впливу обробки біоактивними препаратами при сольовій експозиції та без неї на гідролітичну і транспортну активність вакуолярної H^+ -АТФази. Посилення транспортної активності при послабленні гідролітичної активності вказує на те, що енергія АТФ використовувалася переважно на створення електрохімічного потенціалу, чому сприяло застосування біоактивних препаратів. Проте треба брати до уваги, що функціонування Na^+ - H^+ -антипортера у вакуолярній мембрані може залежати також від роботи H^+ -насоса, репрезентованого пірофосфатазою, роль якої в проростках може бути визначальною [2]. Для вирішення

Таблиця 2. Вплив адаптогенних препаратів на функціонування вакуолярної H^+ -АТФази в клітинах коренів препаратів, експонованих у присутності 0,1 NaCl

Варіант досліджу	Термін експозиції проростків	
	1 доба	10 діб
<i>Гідролітична активність H^+-АТФази, нмоль $P_{неорг}/(мг\ білка \cdot хв)$</i>		
Контроль I, без NaCl	53,0 ± 2,0 (100)	52,5 ± 3,0 (100)
Контроль II, NaCl	22,0 ± 2,0 [#] (42)	78,2 ± 3,0 [#] (149)
Метіур + NaCl	35,0 ± 2,0 ^{#*} (66)	45,0 ± 2,0* (86)
Івін + NaCl	29,0 ± 2,0 [#] (58)	45,0 ± 3,0* (86)
<i>Транспортна активність H^+-АТФази, $\Delta\%F/(мг\ білка \cdot хв)$</i>		
Контроль I, без NaCl	3,6 ± 1,0 (100)	7,5 ± 1,0 (100)
Контроль II, NaCl	8,7 ± 1,5 [#] (242)	7,6 ± 0,7 (101)
Метіур + NaCl	9,2 ± 2,0 ^{#*} (255)	10,9 ± 1,0 ^{#*} (145)
Івін + NaCl	8,7 ± 0,9 ^{#*} (242)	10,6 ± 0,4 ^{#*} (141)

цієї проблеми нами планується дослідити вплив використаних факторів на функціонування у вакуолярній мембрані H^+ -пірофосфатази та Na^+ - H^+ -антипортера.

1. *Лішко В. К.* Натриевый насос биологических мембран. – Киев: Наук. думка, 1997. – 143 с.
2. *Gaziola R. A., Palmgren M. G., Schumacher K.* Plant proton pumps // FEBS Lett. – 2007. – **581**. – P. 2204–2214.
3. *Zhu J.-K.* Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants // Ann. Rev. Plant Biol. – 2002. – **53**. – P. 247–249.
4. Пат. 26531 Україна, 51 МПК (2006), A01C 1/00. Спосіб посилення солестійкості кукурудзи для її вирощування на засолених ґрунтах / Т. О. Палладіна, І. М. Куриленко, Т. О. Чижикова. – Заявл. 21.05.2007; Опубл. 25.09.2007, Бюл. № 15.
5. *Куриленко І. М., Палладіна Т. О.* Вплив регуляторів росту на процеси пероксидного окислення у проростках кукурудзи за умов сольового стресу // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 6. – С. 56–60.
6. *Чижикова О. А., Палладіна Т. О.* Роль амінокислот і цукрів у підтриманні осмотичного гомеостазу у проростках кукурудзи за умов сольового стресу та оброблення зернівок синтетичними регуляторами росту // Там само. – 2006. – **78**, № 1. – С. 124–129.
7. *Poole R. J., Briskin D. P., Kratky Z., Johnstone R. M.* Density gradient localization of plasma membrane and tonoplast from storage tissue of growing and dormant red beet // Plant Physiol. – 1984. – **74**. – P. 594–556.
8. *Rhathbun W. B., Betlach V. M.* Estimation of enzymically produced orthophosphate in presence of cystein and adenosine triphosphate // Anal. Biochem. – 1969. – **28**. – P. 436–445.
9. *Ward J., Sze H.* Isolation and functional reconstitution of the vacuolar H^+ -ATPase // Meth. Plant Cell Biol. – 1995. – **42**. – P. 1148–1156.
10. *Queiros F., Fontes N., Silva P. et al.* Activity of tonoplast proton pumps and Na^+ / H^+ exchange in potato cell cultures is modulated by salt // J. Exp. Bot. – 2009. – **60**, No 4. – P. 1363–1374.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 29.10.2010

Zh. I. Rybchenko, T. O. Palladina

Influence of synthetic adaptogenic preparations on the functioning of vacuolar H^+ -ATPase in cells of roots of corn under salt stress conditions

The role of electrogenic H^+ -pump represented in vacuolar membrane by H^+ -ATPase of the F_0F_1 -type in realization of the adaptogenic effect of two bioactive preparations Methyure and Ivine has been studied on corn seedlings under salt stress conditions. It is found that both preparations used by seed pretreating increase a transport function of this H^+ -ATPase in corn seedlings roots, whereas its hydrolytical one is decreased except a variant with Methyure in more adult seedlings. In seedlings exposed at 0.1 NaCl during 1 and 10 days, both preparations increase the transport activity and decrease the hydrolytical one of this enzyme. Therefore, the adaptogenic ability of these preparations under salinity conditions can be explained by increasing the transport function of vacuolar H^+ -ATPase that supplies the vacuolar secondary active Na^+ - H^+ -antiporter which removes Na^+ from cytoplasm with energy.