

Ж. І. Рибченко, Т. О. Палладіна

## Функціонування $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерів плазматичних і вакуолярних мембран у рослинних клітинах за умов засоленого середовища та вплив на них біологічно активних препаратів

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

*Досліджено роль вторинно-активних  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -насосів у солестійкості рослин та вплив на них біологічно активних препаратів на проростках кукурудзи, експонованих в присутності 0,1 М NaCl. Активність  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерів у вакуолярних мембранах клітин коренів виявилася на порядок вищою, ніж у плазматичних мембранах. У присутності NaCl активність антипортерів, особливо у вакуолярних мембранах, значно зросла, посилюючись з часом. Обробка насіння препаратом метіур, який відзначається сильним солепротекторним ефектом, викликала подальше посилення активності  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерів, особливо за умов сольової експозиції, тоді як вплив слабшого за нього препарату івін був незначним. Встановлено, що солепротекторна спроможність метіуру значною мірою пояснюється його здатністю посилювати функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерів, які виводять з цитоплазми клітин токсичний для них  $\text{Na}^+$  назвні та до вакуолярного простору.*

Засолення ґрунтів є небезпечним екологічним фактором, розповсюдження якого через глобальні зміни клімату скорочує різноманіття рослинного світу та продуктивність агропромисловості. Стан сольового стресу в рослинах є результатом порушення в них осмотичного й іонного гомеостазу, причому провідну негативну роль відіграє натрій як головний катіон солей, що засолюють ґрунти. Якщо для тваринних організмів натрій є життєво необхідним елементом, то для рослинних він є непотрібним, а в підвищених концентраціях — токсичним.  $\text{Na}^+$  потрапляє в рослинні клітини через потенціалзалежні канали для  $\text{K}^+$ , заважаючи проникненню останнього [1]. Накопичення  $\text{Na}^+$  в цитоплазмі порушує перебіг метаболізму, і тому адаптація рослинних клітин до умов засолення передусім полягає в підтриманні в ній низького рівня  $\text{Na}^+$ . Виведення його з цитоплазми до позаклітинного та вакуолярного простору здійснюється вторинно-активними  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерами, які функціонують у плазматичних і вакуолярних мембранах, споживаючи енергію потенціалів, які створюються на них первинно-активними  $\text{H}^+$ -насосами [2].

Визначальна роль  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерів у солестійкості рослин привернула до них інтерес дослідників, тому було проведено ізолювання їх білків з ряду рослин, з'ясовано молекулярні характеристики та шляхи регуляції [3, 4]. На підставі отриманих результатів було знайдено радикальний спосіб посилення солестійкості рослин шляхом створення їх трансгенних форм, що містять чужорідні гени потужних  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерів та їх регуляторних білків [1]. Проте впровадженню їх в практику заважає негативне ставлення споживачів агропродукції, що вимагає шукати альтернативні шляхи. Одним з них є застосування безпечних біоактивних препаратів, здатних відчутно посилювати солестійкість будь-яких рослин.

За результатами дослідження солепротекторної здатності ряду препаратів, зокрема метіуру та івіну, синтезованих в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, встановлено перевагу метіуру, на підставі чого він був запропонований для вирощування кукурудзи на зерно на засолених ґрунтах [5]. Метіур є дешевим і практично нетоксичним препаратом ( $LD_{50} > 4000$ ), захисна дія якого зберігається протягом циклу розвитку однорічних рослин. Порівняно з метіуром івін ( $LD_{50} > 1800$ ) виявляв більш слабкий ефект, який обмежувався періодом вегетативного росту.

Метою даної роботи стало з'ясування впливу препаратів метіуру та івіну на функціонування  $Na^+$ - $H^+$ -антипортерів плазматичних і вакуолярних мембран в клітинах коренів рослин у присутності NaCl.

Дослідження здійснювали на проростках гібриду кукурудзи Десна СВ, вирощених у водній культурі на середовищі Хогленда, які в 7-добовому віці експонували в присутності 0,1 М NaCl протягом 1 або 10 діб. Препарати застосовували шляхом замочування насіння в  $10^{-7}$  М розчинах. Мембрани ізолювали з тканин коренів на ультрацентрифузі Optima™L-90K Beckman Coulter. Фракцію плазматичних мембран отримували методом розподілу фаз [6], а тонопласта — в ступінчатому градієнті сахарози [7, 8]. Активність  $Na^+$ - $H^+$ -антипортерів визначали флуоресцентним методом на спектрофлуориметрі Shimadzu RF 1501, використовуючи для плазматичних мембран квінакриновий зонд [9], а для вакуолярних — акридиновий оранжевий зонд [10]. Результати подавали в  $\Delta\% F / (\text{мг білка} \cdot \text{хв})$ , кількість білка визначали за Бредфорд. Досліди виконували в 6 біологічних і 3 аналітичних повторях, визначаючи достовірність за критерієм Стьюдента.

Як показали результати дослідження, за відсутності NaCl активність  $Na^+$ - $H^+$ -антипортерів у плазматичних мембранах 8-добових проростків була ледве помітною, оскільки білок знаходився в неактивній формі [4], проте через 10 діб зростала в 4 рази. Метіур викликав її посилення саме у 8-добових проростків, яке зникало у часі, тоді як ефект івіну не спостерігався (табл. 1). При 1-добовій сольовій експозиції активність  $Na^+$ - $H^+$ -антипортерів збільшувалася у 6 разів, тоді як при 10-добовій — лише в 1,3 рази, а отже, відповідь цих антипортерів на присутність  $Na^+$  проявлялася переважно на початку експозиції. Застосування метіуру посилювало функціонування антипортерів, яке зростало при 10-добовій експозиції, що спостерігалось, хоча й меншою мірою, у досліді з івіном (табл. 2). Одержані результати свідчать про здатність цих препаратів, головним чином метіуру, стимулювати викид  $Na^+$  через плазматичні мембрани. Посилене функціонування  $Na^+$ - $H^+$ -антипортерів плазматичних мембран у присутності NaCl було відмічено у солестійких ліній арабідопсису [1].

Активність  $Na^+$ - $H^+$ -антипортерів вакуолярних мембран у клітинах коренів 8-добових проростків за безсольових умов у 22 рази перевищувала таку в плазматичних мембранах,

Таблиця 1. Вплив біологічно активних препаратів на функціонування  $Na^+$ - $H^+$ -антипортерів плазмалеми в клітинах коренів проростків кукурудзи,  $M \pm m$ ;  $n = 6$

Препарат	Вік проростків			
	8 діб		17 діб	
	$\Delta\%F / (\text{мг білка} \cdot \text{хв})$	% відносно контролю	$\Delta\%F / (\text{мг білка} \cdot \text{хв})$	% відносно контролю
Контроль	$0,068 \pm 0,02$	100	$0,273 \pm 0,09$	100
Метіур	$0,088 \pm 0,03$	129	$0,280 \pm 0,07$	102
Івін	$0,071 \pm 0,04$	104	$0,275 \pm 0,09$	99

проте з віком проростків різниця між ними скорочувалася більш ніж удвічі. За відсутності в середовищі NaCl активність  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -антипортерів вакуолярних мембран зростала з віком проростків, тоді як значний стимулюючий ефект метіуру знижувався, а івіну практично зникав (табл. 3). Сольова експозиція незначно посилювала функціонування  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -антипортерів вакуолярних мембран, активність яких, як і за безсольових умов, зростала у часі. Застосування метіуру, на відміну від івіну, посилювало активність антипортерів такою ж мірою, як і за відсутності NaCl, скорочуючись з часом (табл. 4).

Таким чином, згідно з результатами дослідження підтримка низького рівня  $\text{Na}^+$  у цитоплазмі клітин коренів відбувається в основному шляхом його локалізації у вакуолярному просторі клітин. Цей процес здійснюється за допомогою вакуолярних  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -антипортерів, активність яких зростає з часом. Активність у клітинах коренів  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -антипортерів плазматичних мембран, які контролюють транспорт  $\text{Na}^+$  на довгі дистанції [4], є значно слабшою і знижується при подовженні сольової експозиції. Застосування препарату метіур посилює активність обох  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -антипортерів, причому функціонування того, що діє

Таблиця 2. Вплив біологічно активних препаратів на функціонування  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -антипортерів плазмалеми в клітинах коренів проростків кукурудзи за умов засолення,  $M \pm m$ ;  $n = 6$

Препарат	Термін експозиції проростків			
	1 доба		10 діб	
	$\Delta\%F/(\text{мг} \cdot \text{хв})$	% відносно контролю	$\Delta\%F/(\text{мг} \cdot \text{хв})$	% відносно контролю
Контроль	$0,410 \pm 0,02^{\#}$	100	$0,364 \pm 0,08$	100
Метіур	$0,490 \pm 0,02^*$	119	$0,610 \pm 0,07^*$	167
Івін	$0,410 \pm 0,02$	100	$0,423 \pm 0,01$	116

Примітка. Тут і в табл. 3, 4  $p < 0,05$ , достовірно відносно контролю без сольової експозиції ( $\#$ ) та відносно контролю при сольовій експозиції (\*).

Таблиця 3. Вплив біологічно активних препаратів на функціонування  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -антипортерів тонопласта в клітинах коренів проростків кукурудзи,  $M \pm m$ ;  $n = 6$

Препарат	Вік проростків			
	8 діб		17 діб	
	$\Delta\%F/(\text{мг} \cdot \text{хв})$	% відносно контролю	$\Delta\%F/(\text{мг} \cdot \text{хв})$	% відносно контролю
Контроль	$1,50 \pm 0,02$	100	$2,72 \pm 0,01$	100
Метіур	$2,01 \pm 0,01^{\#\#}$	134	$3,30 \pm 0,03^{\#\#}$	121
Івін	$1,62 \pm 0,05^*$	108	$2,80 \pm 0,02^{\#}$	102

Таблиця 4. Вплив біологічно активних препаратів на функціонування  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -антипортерів тонопласта в клітинах коренів проростків кукурудзи за умов засолення,  $M \pm m$ ;  $n = 6$

Препарат	Термін експозиції проростків			
	1 доба		10 діб	
	$\Delta\%F/(\text{мг} \cdot \text{хв})$	% відносно контролю	$\Delta\%F/(\text{мг} \cdot \text{хв})$	% відносно контролю
Контроль	$1,82 \pm 0,03^{\#}$	100	$2,85 \pm 0,05^{\#}$	100
Метіур	$2,53 \pm 0,01^{\#\#}$	139	$3,50 \pm 0,02^{\#\#}$	122
Івін	$1,65 \pm 0,02^{\#\#}$	90	$3,00 \pm 0,01^{\#\#}$	105

в плазматичних мембранах, збільшується з тривалістю сольової експозиції, а у вакуолярних мембранах — знижується. Івін, на відміну від метіуру, практично не впливає на активність  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерів у клітинах коренів, чим може великою мірою пояснюватися відсутність у нього протекторного ефекту на рослини. Функціонування  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортерів енергетично залежить від  $\text{H}^+$  насосів у цих мембранах, на активність яких впливає метіур [11]. Участь метіуру в механізмах регуляції функціонування транспортних механізмів мембран за умов натрієвого засолення буде висвітлено в подальших дослідженнях.

1. *Shabata S., Pottosin I. I.* Potassium and potassium-permeable channels in plant salt tolerance // Ion channels and plant stress responses. – Berlin: Springer, 2010. – P. 87–110.
2. *Shi H., Quintero F. J., Pardo J. M., Zhu J. K.* The putative plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter SOS 1 controls long-distance  $\text{Na}^+$  transport in plants // Plant Cell. – 2002. – **14**. – P. 465–477.
3. *Garbarino J., DuPont F. M.* NaCl induces a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in tonoplast vesicles from barley roots // Plant Physiol. – 1998. – **86**. – P. 0231–0236.
4. *Zorb C., Noll A., Karl S.* Molecular characterization of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporters (ZmNHX) of maize (*Zea mays* L.) and their expression under salt stress // J. Plant Physiol. – 2005. – **162**. – P. 55–65.
5. *Палладіна Т. О., Рибченко Ж. І., Контурська О. О.* Залежність адаптогенного ефекту препарату метіур на рослини за умов сольового стресу від його молекулярної структури // Біотехнологія. – 2012. – **5**, № 1. – С. 115–119.
6. *Larsson C., Sommarin M., Widell S.* Isolation of Highly Purified Plasma Membranes and Separation of Inside-Out and Right-Side-Out Vesicles // Meth. Enzymol. – 1994. – **228**. – P. 451–469.
7. *Qiu Q.-S., Barkla B. J., Zhu J.-K. et al.*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Exchange Activity in the Plasma Membrane of Arabidopsis // Plant Physiol. – 2003. – **132**. – P. 1041–1052.
8. *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.
9. *Martinez-Atienza J., Jiang X., Garcideblas B. et al.* Conservation of the salt overly sensitive pathway in rice // Plant Physiol. – 2007. – **143**. – P. 1001–1012.
10. *Palmgren M. G.* Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations // Anal. Biochem. – 1991. – **192**. – P. 316–321.
11. *Рибченко Ж. І., Палладіна Т. О.* Функціонування транспортних  $\text{H}^+$ -АТФаз плазматичних і вакуолярних мембран у клітинах коренів кукурудзи в умовах сольового стресу та дії адаптогенних препаратів // Укр. біохім. журн. – 2011. – **83**, № 6. – С. 63–68.

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

Надійшло до редакції 19.06.2012

**Ж. И. Рыбченко, Т. А. Палладина**

### **Функционирование $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортеров плазматических и вакуолярных мембран растительных клеток в условиях засоления среды и влияние на них биологически активных препаратов**

*Исследована роль в солестойкости растений вторично-активных  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -насосов и влияние на них биологически активных препаратов на проростках кукурузы, экспонированных на 0,1 М NaCl. Активность  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортеров в вакуолярных мембранах клеток корней была на порядок выше, чем в плазматических мембранах. В присутствии NaCl активность антипортеров, особенно в вакуолярных мембранах, значительно повышалась, усиливаясь со временем. Обработка семян препаратом метиур, который обладает сильным солепротекторным эффектом, усиливала активность  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортеров, особенно в условиях*

солевой экспозиции, тогда как влияние более слабого препарата ивин оказалось незначительным. Установлено, что солепротекторная способность метиура объясняется в основном его способностью усиливать функционирование  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -антипортеров, которые выводят из цитоплазмы клеток токсический для них  $\text{Na}^+$  во внешнее и вакуолярное пространство.

**Zh. I. Rybchenko, T. O. Palladina**

### **$\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -antiporters function in plant cell plasma and vacuolar membranes under salinity conditions and effect of biological active preparations**

*A role of secondary-active  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -pumps in plant salt tolerance and their influencing with biological-active preparations have been studied on corn seedlings roots exposed at 0.1M NaCl presence. It has been found that  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -antiporter activity in a vacuolar membrane exceeded it in a plasma one by ten times. NaCl presence increased these activities mainly in a vacuolar membrane. Corn seed treatment with preparation Methyure possessing a potent salt protective effect induced a further intensification of  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -antiporters in NaCl presence mainly, whereas an answer of a less effective preparation Ivine was negligible. Obtained results showed that a salt protective effect of preparation Methyure depends predominantly on its ability to increase a toxic  $\text{Na}^+$  removal from plant cell cytoplasm by means of  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -pumps activation.*