

УДК 581.632.121

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПРОТОННОЙ АТФазы В РАСТЕНИЯХ КУКУРУЗЫ ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

Кабузенко С.Н., Кузнецова Н.Н., Омельченко А.В.

На проростках кукурузы параллельно изучали активность фермента протонной H^+ -АТФазы, играющего ключевую роль при адаптации растений к солевому стрессу, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и восстановительную активность тканей и выделенных хлоропластов. Установлена положительная взаимозависимость в изменении указанных показателей при солевом стрессе. Делается вывод, что усиление ПОЛ в данных условиях можно рассматривать как проявление адаптивной реакции на действие стресса, обеспечивающей активацию H^+ -АТФазы, которая участвует в выведении из клеток «засоляющих» катионов Na^+ .

Ключевые слова: кукуруза, восстановительная активность тканей, дегидрогеназы, H^+ -АТФаза, перекисное окисление липидов (ПОЛ).

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов адаптации культурных растений к солевому стрессу на сегодня остается актуальным в силу распространения почвенного засоления во многих странах мира, связанного с изменением климатических условий и хозяйственной деятельностью человека. Ответной реакцией растений на высокое содержание солей в почве является поддержание в клетках ионного гомеостаза, в частности, определенной концентрации катионов натрия, позволяющей в данных условиях осуществлять продукционный процесс и ростовые функции.

Ключевую роль в ионном гомеостатировании цитоплазмы клеток растений-гликофитов играет протонная H^+ -АТФаза, в то время как у галофитов обнаружена Na^+ -транспортирующая Na^+ -АТФаза, которая отличается от протонной по ряду параметров [1]. H^+ -АТФаза участвует в создании мембранного протонного градиента, который используется для выведения из клеток «избыточного» натрия с помощью Na^+/H^+ -антипортера, локализованного на плазмалемме и тонопласте растительных клеток [2]. Этот механизм считается универсальным для растений гликофитного типа, и многими исследователями отмечено повышение активности протонной АТФазы в условиях засоления [3, 4]. Однако причины этой активации в литературе трактуются по-разному. Так, ряд исследователей отмечали активацию протонной АТФазы катионами и анионами солей (до определенных пределов концентрации), которая наблюдалась только в составе мембраны, т.е. в нативном состоянии фермента [3, 5 – 7]. Накамура [8] наблюдал усиление гидролитической активности H^+ -АТФазы в плазмалемме клеток корней бобов в присутствии 100 мМ $NaCl$. В клетках корней галофита *Salicornia* активация происходила при более

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПРОТОННОЙ АТФАЗЫ

высокой концентрации хлорида натрия – 200 мМ. Авторы объясняют повышение активности фермента под действием соли посттрансляционными изменениями молекулы белка, по-видимому, усиливающими его сродство к субстрату. В литературе высказывается мнение, что для H^+ -АТФазы, которая относится к мембранным ферментам, возможны четыре способа регуляции активности: генная, ковалентная, аллостерическая и липидная [9].

В некоторых работах отмечена связь активности H^+ -АТФазы с консистенцией липидного матрикса клеточных мембран растений, с липидным составом мембран и характером взаимодействия фермента с липидами. Изменение этих параметров изучалось на фоне действия температурных стрессов и установлена прямая зависимость между активностью H^+ -АТФазы и ПОЛ (перекисным окислением липидов), которое рассматривается как неспецифическая реакция растений на любое стрессовое воздействие [10, 11]. Однако в доступной нам литературе мы не встречали работ, посвященных изучению ПОЛ в условиях засоления, устанавливающих связь этого явления с активацией H^+ -АТФазы. Мы предположили, что одной из причин повышения активности H^+ -АТФазы в условиях засоления может являться ПОЛ, которое значительно влияет на свойства липидного слоя мембран и изменяет характер взаимодействия белков с липидами.

Поэтому целью настоящего исследования явилось параллельное изучение активности H^+ -АТФазы и содержания продуктов ПОЛ растений кукурузы на фоне хлоридного засоления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили проростки кукурузы сорта Одесская 10 на начальных этапах развития, выращенные в условиях почвенной культуры в лаборатории физиологии растений биологического факультета ТНУ. Контрольные растения выращивали на лугово-черноземной почве, взятой в долине р. Салгир. В опытные сосуды вносили с поливной водой поваренную соль в концентрации 100 мМ.

В органах 3-14 дневных проростков кукурузы определяли активность H^+ -АТФазы методом Полевого и Танкелюн [12], общую восстановительную активность тканей по Касумову [13], дегидрогеназную активность [14], содержание продуктов ПОЛ по методу Гаврилова и Мишкорудной [15].

Эксперименты проводили в трехкратной биологической и аналитической повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований установлено, что гидролитическая активность фермента H^+ -АТФазы в корневых окончаниях 4- дневных проростков кукурузы увеличивалась на 24,2% против контроля (табл. 1).

В работах, проведенных нами в предыдущие годы было установлено, что повышение активности H^+ -АТФазы под влиянием засоления прямо коррелирует с солеустойчивостью культуры [4, 16]. Как следует из данных таблицы 1,

концентрация хлорида натрия 200 мМ повышала активность фермента Н⁺-АТФазы в корнях кукурузы всего на 4,2 % против контроля.

Таблица 1.
Гидролитическая активность фермента Н⁺-АТФазы в корневых окончаниях 4х-дневных проростков кукурузы сорта Одесская 10, выращенных на фоне хлоридного засоления ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Варианты опыта	количество фосфора неорганического, отщеплённого Н ⁺ -АТФазой за 1 час при t=37 ⁰ С	
	мкг на 0,5 г сырых корней	% отношение к контролю
контроль (Н ₂ О)	130,9±0,6	100,0
100мМ NaCl	162,6±1,1	124,2
200мМ NaCl	136,5±0,1	104,2

Одновременно с повышением активности Н⁺-АТФазы в клетках корня нами отмечено на солевом фоне увеличение содержания катионов Na⁺ [4, 16], но мы не связываем активацию фермента с прямым действием ионов на белок, т.к. в литературе имеются данные о стимуляции одновалентными катионами Н⁺-АТФазы только в составе мембран [3, 6].

Поскольку основным механизмом, участвующим в выведении из клеток корня кукурузы «избыточного» Na⁺ считается Na⁺/H⁺-антипортер [2, 3, 10], работа этого механизма должна способствовать изменению редокс-статуса клеточных органоидов и растительных тканей в целом, что побудило нас определить влияние соли на восстановительную активность клеток корня, листа и выделенных хлоропластов (табл. 2).

Таблица 2.
Восстановительная активность тканей листа, корня и выделенных хлоропластов растений кукурузы сорта одесская 10 ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Вариант опыта/ объект исследований	Восстановительная активность в динамике опыта, отн.ед.		
	3 сутки	7 сутки	14 сутки
Контроль			
Корни	0,008±0,0002	0,008±0,0002	0,012±0,0003
Листья	0,010±0,0003	0,015±0,0004	0,017±0,0004
Хлоропласты			0,015±0,0004
Опыт (NaCl 100 мм)			
корни	0,005±0,0001	0,021±0,0006	0,011±0,0003
листья	0,017±0,0004	0,010±0,0003	0,018±0,0004
хлоропласты			0,010±0,0003

Как следует из данных таблицы 2, в тканях корней и листьев растений контрольного варианта в динамике опыта наблюдалось повышение восстановительной активности.

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПРОТОННОЙ АТФАЗЫ

В корнях растений опытного варианта восстановительная активность резко возрастала на 7 сутки, чему предшествовала активация ферментов дегидрогеназ (рис.).

Восстановительная активность хлоропластов на солевом фоне снижалась, что свидетельствует о негативном влиянии хлорида натрия на работу электронтранспортной цепи хлоропластов. По-видимому, ионная обстановка в клетках корней опытного варианта способствовала усиленному образованию восстановленных форм НАДФ·Н, которые активируют ферменты НАДФ·Н-зависимые оксигеназы, индуцирующие перекисное окисление липидов.

Перекисное окисление липидов может происходить и в нормальных условиях, но протекает с небольшой скоростью из-за наличия антиоксидантных систем [17].

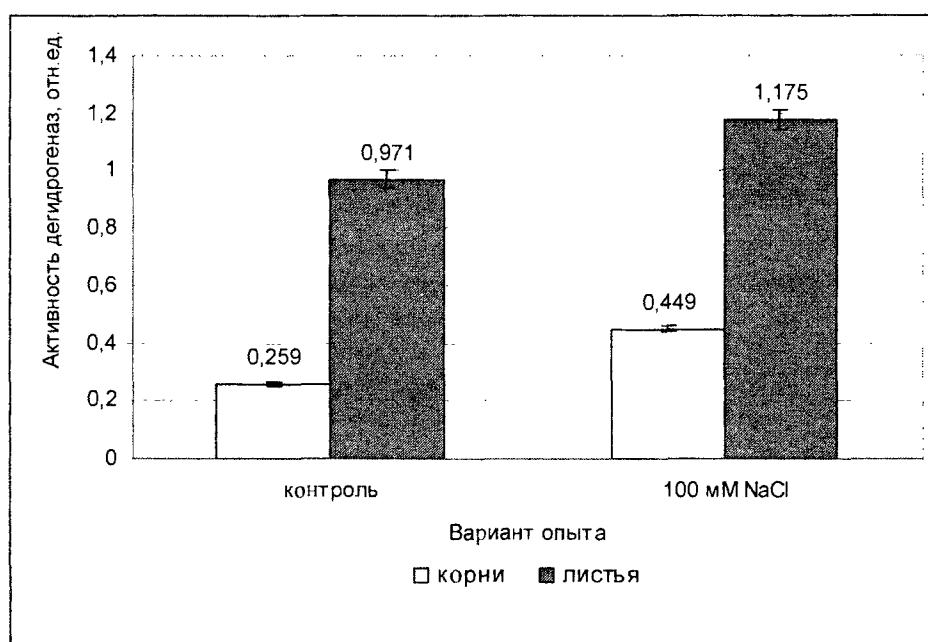


Рис. Активность дегидрогеназ 3-х дневных проростков кукурузы сорта Одесская 10 в условиях хлоридного засоления.

Доступным субстратом для окислительных процессов являются мембранные липиды, которые содержат большое количество ненасыщенных жирных кислот. Этот процесс может влиять на состояние мембран, изменяя их физико-химические свойства. Накопление продуктов ПОЛ увеличивает подвижность липидного бислоя, нарушает пространственное положение и структуру белковых молекул. Одним из ответов растительной клетки на неблагоприятное воздействие среды является активация процессов, которые препятствуют развитию ПОЛ [18].

В наших исследованиях под действием хлорида натрия наблюдалось увеличение содержания диеновых конъюгатов в клетках корня уже на третий день действия солевого стресса. Одновременно повышалось содержание триенов и

кетонов, которые так же являются продуктами свободно-радикального окисления липидов (табл. 3).

Таблица 3.
Содержание гидроперекисей в клетках корней кукурузы на фоне солевого стресса, относительные единицы ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

Вариант опыта	Диены	Триены	Кетоны
Контроль (бессолевой фон)	0,72 ±0,021	1,0±0,036	1,04±0,035
NaCl, 100 мМ	1,22±0,037	1,18±0,035	1,18±0,034

Как следует из данных таблицы 3, под действием засоления достоверно возросло содержание диеновых конъюгатов, наиболее влияющее на ригидность мембран. В литературе высказывается мнение, что процессы липопероксидации можно рассматривать как фактор, который оказывает регулирующее действие на активность H^+ -АТФазы при неблагоприятных воздействиях [10].

В основе такого действия могут лежать: 1) нарушение характера взаимодействия фермента с липидами мембран; 2) прямое окисление мембранных белков; 3) нарушение проницаемости липидного бислоя.

Перестройка в липидном окружении увеличивает подвижность мембранных белков, изменяет кинетические свойства и активность мембранных ферментов, что может играть позитивную роль в адаптации растений к стрессовым факторам [19].

ВЫВОДЫ

1. Интенсификация перекисного окисления липидов может являться одной из причин повышения активности H^+ -АТФазы плазмалеммы растительных клеток в условиях солевого стресса, направленной на поддержание ионного гомеостаза на фоне токсического действия солей.
2. Неспецифические ответные реакции растений на действие стресса включают несколько взаимосвязанных механизмов, и способность растений к адаптации определяется согласованностью между отдельными элементами системы в данных условиях.

Список литературы

1. Стриж И.Г., Попова Л.Г., Балконин Ю.В. Физиологические аспекты адаптации морской микроводоросли *Tetraselmis (Platymonas) viridis* к различной солености среды // Физиология растений. – 2004. – Т. 51, № 2. – С. 197–204.
2. Пагис Л.Я., Попова Л.Г., Андреев И.М., Баллокин Ю.В. Ионная специфичность Na^+ -транспортирующих систем в плазматической мембране галотолерантной водоросли *Tetraselmis (Platymonas) viridis* Rouch. // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, №3. – С. 334–340.
3. Палладина Г.А. Роль протонных насосов плазмалеммы и тонопласта в устойчивости растений к солевому стрессу // Успехи современной биологии. – 1999. – Т. 119, № 5. – С. 451–461.

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ ПРОТОННОЙ АТФАЗЫ

4. Кабузенко С.Н., Омельченко А.В. Динамика накопления активного натрия в проростках растений кукурузы, отличающихся по степени солеустойчивости // Ученые записки ТНУ. Серия «Биология, химия». – 2006. – Т.19 (58), №1. – С. 50–56.
5. Достанова Р.Х., Клышев Л.К., Мукажанова К.С. Влияние засоления среды на локализацию катионов Na^+ , K^+ и АТФазную активность в корнях гороха и кукурузы // Изв. АН КазССР. Серия «Биология», – 1980. – Вып. 3. – С. 29–36.
6. Плеханова Л.С., Ивлева Л.Б., Ибрагимова Э.А. Влияние засоления на активность АТФазы плазматических мембран и растворимой глицерофосфатазы хлопчатника // Материалы IV Всесоюзного симпозиума по солеустойчивости растений. Ташкент: ФАН. – 1986. – С. 70.
7. Мукажанова С.К., Клышев Л.К. Изучение действия солей на активность Mg^{2+} -зависимой, K^+ -стимулируемой АТФазы // Материалы IV Всесоюзного симпозиума по солеустойчивости растений. Ташкент: ФАН. – 1986. – С. 73.
8. Nacamura Y., Kasamo K., Shimosato N., Sakata M., Ohta E. Stimulation of the extrusion of protons and H^+ -ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact mung bean roots under high- NaCl stress and its relation to external levels of Ca^{2+} ions // Plant and Cell Physiology, 1992. – Vol. 33, No. 2.–, P. 139–149.
9. Sussman, M.R. and Surowy, T.K. Physiology and molecular biology of membrane ATPases // Oxford Surveys of Plant Molecular and Cellular Biology. –1987. – V. 4, P. 47–71.
10. Опригов В.А., Худяков В.А., Пятыхин С.С. О роли жидкостности липидного матрикса плазмалеммы клеток высшего растения в модуляции активности H^+ -АТФазы при различных формах умеренного холодового воздействия // Физиология растений. – 1992. – Т. 39, Вып. 3. – С. 533–540.
11. Веселов А.П., Курганова Л.Н., Лихачев А.В., Сушкова У.А. Возможное регуляторное влияние перекисного окисления липидов на активность H^+ -АТФазы плазмалеммы в условиях стресса // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, № 3. – С. 385–389.
12. Танкелюн О.В., Полевой В.В. Изучение мембранных АТФаз колеоптилей кукурузы // Физиология и биохимия культурных растений. – 1981. – Т. 13, № 2. – С. 180–185.
13. Касумов Н.А. О нарушении стационарного состояния внутриклеточного метаболизма растений при неблагоприятных условиях // ДАН Азербайджан. ССР, 1971. – Т. XXVII, № 4. – С. 48–51.
14. Плешков В.П. Практикум по биохимии растений. – М.: Колос. 1985. – 216 с.
15. Гаврилов В.В., Мешкорудная М.Н. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лабораторное дело, 1983. – № 3. – С. 3–35.
16. Кабузенко С.Н., Омельченко А.В. Накопление активного натрия в органах культурных растений и стратегия их адаптации к засолению // Вісник Луганського ДУ. – Біологічні науки. 2002. – №5 (49). – С. 84–89
17. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. – 1985. – Т. 54, № 9. – С. 1540–1550..
18. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. – М.: Изд-во МГУ. 1990. – 144 с.
19. Шибарова А.Н. Анализ влияния малых доз ионизирующей радиации на протонную проницаемость и активность H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток высшего растения // Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.12. – Нижний Новгород. 2006. – 20 с.

Кабузенко С.М., Кузнецова Н.М., Омельченко О.В. Можливі механізми активації протонної АТФази в рослинах кукурудзи при сольовому стресі // // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2007. – Т. 20 (59). – № 2. – С.26-32.

На проростках кукурудзи паралельно вивчали активність ферменту протонної H^+ -АТФази, яка грає ключову роль при адаптації рослин до сольового стресу, вміст продуктів перекисного окислювання ліпідів (ПОЛ) і відновлюючи активність тканин і виділених хлоропластів. Установлено позитивну взаємозалежність у зміні зазначених показників при сольовому стресі. Робиться висновок, що посилення ПОЛ у даних умовах можна розглядати як прояв адаптивної реакції на дію стресу, що забезпечує активацію H^+ -АТФази, яка бере участь у виведенні з клітин «засолоючих» катіонів Na^+ .

Ключові слова: кукурудза, відновлююча активність тканин, дегідрогенази, H^+ -АТФаза, перекісне окислювання ліпідів.

Kabuzenko S.N., Kuznetsova N.N., Omelchenko A.V. Suggested mechanisms of protonic ATPase activation in maize plants under salt stress // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2007. – V.20 (59). – № 2. – P. 26-32.

Protonic ATPase enzyme activity, which plays the key role in adaptation of plants to salt stress, content of products of peroxide oxidation of lipid (POL) and reducing activity of tissues and extracted chloroplasts were parallel studied on maize seedlings. Positive interdependence can be observed when the above-mentioned properties are changed under conditions of salt stress. It can be concluded that intensification of POL under the given conditions can be considered as display of adaptive stress reaction ensuring activation of ATPase that takes part in removal of causing salinization Na^+ kations from cells.

Keywords: maize, reducing activity of tissues, dehydrogenases, H^+ -ATPase, peroxide oxidation of lipid.

Поступила в редакцію 05.10.2007 г.