

УДК 581.14.22+581.1

ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА ПРОТОНТРАНСЛОЦИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

© 2011 г. Э. П. Ладыженская, Н. П. Кораблёва

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва 119071

e-mail: ladyzhen@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 09.08.2010 г.

Обнаружено влияние салициловой кислоты (СК) на активность мембран-связанной H^+ -АТФазы и пассивную протонную проницаемость мембраны везикул плазмалеммы (ВП) из паренхимных клеток клубней картофеля. Выявлена корреляция между действием СК на прорастание клубней и на активность H^+ -АТФазы плазмалеммы: применение ростостимулирующих концентраций СК (10^{-10} – 10^{-8} М) в системе *in vitro* приводило к активации плазмалеммной H^+ -АТФазы, тогда как введение в среду инкубации СК в ростингибирующих концентрациях (10^{-4} , 10^{-5} М) вызывало подавление активности фермента. При добавлении в инкубационную смесь жасмоновой кислоты (ЖК) отмечалось усиление эффекта СК на накопление H^+ в ВП.

Регуляция покоя, роста и устойчивости клубней картофеля к патогенам имеет важное практическое значение для развития современного картофелеводства. Состояние покоя тесно связано с устойчивостью к поражению фитопатогенными микроорганизмами: покоящиеся клубни более устойчивы, чем прорастающие. Клубни, полученные от больных растений либо зараженные при хранении, подвержены преждевременному прорастанию, что приводит к потере семенного материала и ухудшению качества продовольственного картофеля [1]. В то же время искусственная стимуляция прорастания семенного картофеля при подготовке посадочного материала способствует получению раннего урожая, что снижает угрозу поражения фитофторой. Познавание молекулярных механизмов, контролирующих эти процессы, позволит целенаправленно изменять продолжительность состояния покоя и повышать устойчивость растений картофеля к патогенам и другим неблагоприятным факторам.

Фитогормон СК контролирует ответ растения на биотические и абиотические стрессы (заражение патогенными микроорганизмами, солевой, температурный, световой стрессы) [2–4]. Кроме того, СК участвует в регуляции ряда физиологических процессов: прорастание семян, рост сеянцев, цветение, старение [2, 5, 6].

В настоящее время накоплен обширный экспериментальный материал о механизмах действия СК на экспрессию защитных генов при индукции устойчивости растений к заражению патогенами [2]. Начальные этапы передачи сигнала СК – влияние этого соединения на функционирование цитоплазматической мембраны клетки значительно меньше привлекали внимание исследователей. Остаются также не-

достаточно изученными пути реализации сигнала СК при регуляции различных физиологических процессов у растений.

По современным представлениям, передача внешнего сигнала в растительную клетку обусловлена изменением функциональной активности компонентов цитоплазматической мембраны [7–9]. Мембраносвязанная H^+ -АТФаза (КФ 3.6.1.3) генерирует на плазмалемме трансмембранный электрохимический градиент H^+ , от величины которого зависит активность ионных каналов, пассивная диффузия и активный транспорт низкомолекулярных метаболитов [10]. Этот фермент участвует в регуляции многих функций растительной клетки и может рассматриваться, как одно из звеньев в цепи передачи внешних сигналов, контролирующих клеточный метаболизм. Показано, что активность протонтранслоцирующей АТФазы плазмалеммы растительной клетки изменяется под влиянием ряда сигнальных молекул (элиситоров защитных реакций, бактериальных и грибных токсинов, фитогормонов), различающихся по химической структуре, происхождению и действию на растение [7–10]. К числу таких соединений относится фитогормон ЖК, участвующий в регуляции состояния покоя и устойчивости растений [2, 3]. Установлено взаимодействие ЖК и СК в индукции защитных реакций у растений картофеля [12, 13], механизмы этого явления остаются неизученными.

Цель работы – оценка действия СК на прорастание клубней картофеля, активность H^+ -АТФазы цитоплазматической мембраны клеток клубня и взаимодействия СК и ЖК при регуляции протонтранслоцирующей активности плазмалеммы.

Влияние СК на прорастание клубней картофеля

Концентрация СК, М	Вес проростков, мг/клубень	Число клубней с боковыми корнями, шт.
0 (контроль)	863 ± 22	18 ± 1.1
10 ⁻⁵	535 ± 18	13 ± 0.9
10 ⁻⁶	648 ± 21	15 ± 0.6
10 ⁻⁷	784 ± 27	17 ± 0.7
10 ⁻⁸	1045 ± 32	22 ± 1.3
10 ⁻⁹	1234 ± 35	24 ± 1.2
10 ⁻¹⁰	1584 ± 33	28 ± 1.4

МЕТОДИКА

Объект исследования. В опытах использовали клубни картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Невский, находящиеся на начальной стадии прорастания, хранившиеся в темноте при +4°C.

Оценка действия СК на прорастание клубней. Клубни опрыскивали растворами СК (10⁻⁵–10⁻¹⁰ М). Исходный раствор 10⁻³ М СК, приготовленный на дистиллированной воде, содержал 0.125% этанола. Контрольные клубни обрабатывали дистиллированной водой с аналогичным содержанием этанола. Для каждого варианта использовали 30 клубней. После обработки клубни помещали во влажные камеры при оптимальных условиях для прорастания (20°C, темнота). Через 7 сут из опытных и контрольных клубней извлекали проросшие “глазки” и взвешивали их вместе с образовавшимися боковыми корнями. Вес проростков пересчитывали на 1 клубень. Опыты проводили в 3-кратной повторности.

Выделение фракции, обогащенной ВП. Выделение проводили из паренхимных тканей клубней описанным ранее методом с помощью дифференциального центрифугирования и очистки микросомальной фракции распределением в двухфазной системе ПЭГ 3350–декстран Т-500 [14].

Измерение скорости накопления Н⁺ в ВП. Накопление и выход Н⁺ оценивали по начальной скорости изменения интенсивности флуоресценции акридинового оранжевого (АО), как описано ранее [14]. Основная инкубационная среда содержала (мМ): сахароза – 150; трис-морфолиноэтансульфоновая кислота (МЕС) – 10; MgSO₄ – 3; этиленгликоль-бис-(аминоэтиловый эфир) N,N,N,N'-тетрауксусной кислоты (ЭГТА) – 1; KNO₃ – 50; KCl – 50; АО – 10 и препарат ВП (конечная концентрация 50 мкг белка/мл), рН 6.5. Реакцию начинали добавлением АТФ до конечной концентрации 1 мМ. В зависимости от варианта опыта в инкубационную среду вместе или по отдельности добавляли СК (10⁻⁵–10⁻¹² М) и ЖК (10⁻⁸ М). Объем среды инкубации – 1 мл. Накопление протонов в ВП рассчитывали как [(F₀ – F)/F₀]/мин/мг белка, где F₀ и F –

флуоресценция АО в инкубационной среде до и после начала реакции соответственно. При оценке действия СК и СК + ЖК на начальную скорость АТФ-зависимого накопления протонов в ВП контролем служила величина [(F₀ – F)/F₀]/мин/мг белка = 1.4, полученная при отсутствии фитогормонов в среде инкубации. В присутствии 10⁻⁸ М ЖК эта величина возрастала до 2.

Измерение скорости пассивной утечки протонов. В инкубационную смесь через 10 мин после начала реакции вводили дициклогексилкарбодимид (ДЦКД) до конечной концентрации 200 мкМ и регистрировали кинетику возрастания флуоресценции АО. При определении влияния СК и ЖК на пассивный выход протонов совместно с ДЦКД добавляли СК и ЖК в соответствующей концентрации. В контрольных опытах в инкубационную смесь вместо растворов АТФ, ДЦКД, СК и ЖК вносили равный объем буферного раствора. Контролем служила величина 1.1, полученная при отсутствии фитогормонов в среде инкубации. ЖК не влияла на выход Н⁺ из ВП.

Флуоресценцию АО измеряли на спектрофлуорофотометре RF-5301PC (“Shimadzu” Япония). Белок определяли по методу Брэдфорд.

Опыты по измерению скорости накопления и пассивной утечки Н⁺ проводили в 5 биологических повторностях. В таблице и на рисунках приведены средние арифметические величины и их стандартные отклонения.

Реактивы. Использовали АО, БСА, дитиотрейтол, МЕС, трис, тетракаин, ЭГТА, фенолметилсульфонилфлуорид, СК и ЖК – “Sigma”, США; АТФ, ДЦКД – “Serva”, Германия; ПЭГ-3350 и декстран Т-500 – “Pharmacia”, Швеция. Остальные реактивы отечественного производства, квалификации х.ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Действие СК на прорастание клубней. Обработка клубней, находящихся на начальной стадии прорастания, СК в концентрациях 10⁻⁵–10⁻¹⁰ М показала, что препарат в низких концентрациях стимулировал рост “глазка” и образование на нем боковых корней. Максимальный стимулирующий эффект обнаружен при концентрации СК 10⁻¹⁰ М. Применение более высоких концентраций СК приводило к снижению величины стимулирующего действия, замедлению роста апексов и подавлению образования боковых корней (таблица). Известно, что начальные этапы прорастания апикальной меристемы клубней картофеля связаны с процессами растяжения центральной стержневой меристемы клеток точек роста [15, 16], тогда как боковые корни являются продуктом деятельности периферической меристемы, которая митотически более активна, чем центральная зона апексов [17]. Это обстоятельство может свидетельствовать о регуляции СК процессов деления и растяжения клеток меристем апексов клубней кар-

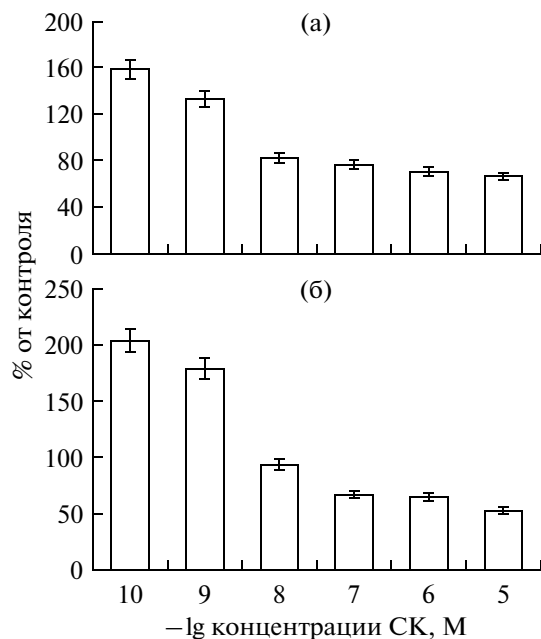


Рис. 1. Действие СК (а) и СК + ЖК (10^{-8} М) (б) на начальную скорость АТФ-зависимого накопления H^+ в ВП из клубней картофеля, % от контроля.

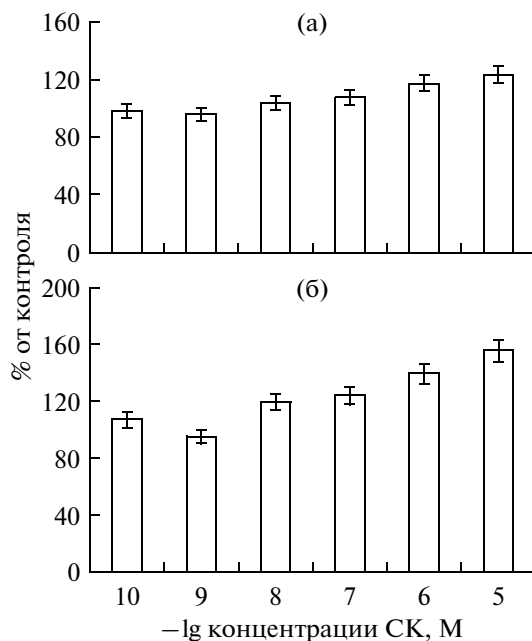


Рис. 2. Действие СК (а) и СК + ЖК (10^{-8} М) (б) на начальную скорость пассивного выхода H^+ из ВП, % от контроля.

тофеля. Влияние СК на митотическую активность отмечалось ранее для клеток корней проростков пшеницы и гороха [18].

Установлено, что ингибирование прорастания клубней картофеля связано с действием абсцизовой кислоты (АБК), синтез которой может стимулироваться при введении в ткани клубней дополнительных количеств этилена [16]. Показана также стимуляция образования этилена в клетках клубней картофеля, обработанных СК в концентрации 90 мкМ [19]. Кажется весьма вероятным, что обнаруженный в наших экспериментах ростингибирующий эффект 10^{-5} – 10^{-7} М СК связан с этилен-индуцированным повышением содержания АБК в тканях клубня.

Характеристика полученного препарата мембран.

Ранее было показано, что использованный нами метод позволяет выделить фракцию мембран, состоящую в основном из ВП, с незначительной примесью везикул тонопласта и содержит не менее 30% инвертированных ВП. Введение в инкубационную среду 50 мМ KNO_3 полностью подавляло активность нитратчувствительной АТФазы тонопласта [14]. Таким образом, выделенный препарат может быть использован для оценки активности H^+ -АТФазы плазмалеммы. Установлено также, что наблюдавшееся в опытах падение интенсивности флуоресценции АО при добавлении АТФ в инкубационную смесь отражает АТФ-индуцированное закисление внутренней полости мембранных везикул [14].

Действие СК на транспорт H^+ через везикулярную мембрану. Введение СК в основную инкубационную

смесь изменяло начальную скорость тушения флуоресценции АО; характер действия определялся концентрацией фитогормона. В концентрациях 10^{-10} и 10^{-9} М СК увеличивала начальную скорость накопления протона в ВП; повышение концентрации СК до 10^{-8} – 10^{-5} М вызывало прогрессирующее снижение протонтранслоцирующей активности (рис. 1а).

Накопление H^+ в ВП зависит как от поступления в везикулы за счет функционирования H^+ -АТФазы, так и от пассивной утечки из везикул по градиенту концентрации. Подавление активности H^+ -АТФазы путем добавления ДЦКД в инкубационную смесь при сформированном градиенте H^+ на мембране ВП (через 10 мин после начала реакции) позволяет оценить скорость пассивного выхода H^+ из ВП. Сопоставление кинетики возрастания интенсивности флуоресценции АО в присутствии и отсутствии СК в инкубационной смеси обнаружило некоторое повышение скорости выхода H^+ из ВП при добавлении 10^{-5} и 10^{-6} М СК (рис. 2а). Очевидно, значительное подавление накопления H^+ в ВП повышенными концентрациями СК связано отчасти со стимуляцией выхода протона из везикул.

В отсутствие АТФ либо Mg^{2+} в среде инкубации не наблюдалось стимуляции СК (10^{-10} и 10^{-9} М) поступления протонов в ВП и уменьшалась величина ингибирующего действия более высоких концентраций СК. Наиболее вероятным объяснением полученных результатов кажется влияние этого соединения на активность протонтранслоцирующей АТФазы; в высоких концентрациях СК может вы-

полнять функции протоннофора. СК вызывала диссипацию протонного градиента на плазмалемме клеток корней проростков пшеницы [18]. Авторы предполагают, что СК, обладая свойствами протоннофора, стимулирует протонную проводимость мембран патогена, подавляя тем самым его развитие.

Активация СК плазмалеммой H^+ -АТФазы отмечалась ранее при индукции термоустойчивости в листьях гороха и проростках винограда [4, 20]. Механизм действия СК на функциональную активность плазмалеммы может быть связан со стимуляцией образования активных видов кислорода, изменяющих структуру мембраны путем перекисного окисления мембранных липидов [21–23].

Полученные данные свидетельствуют о возможности непосредственного взаимодействия СК с плазмалеммой клеток клубней картофеля, что влияет на активность мембраносвязанной H^+ -АТФазы и пассивную протонную проницаемость мембраны.

Прорастание клубней картофеля в значительной степени обусловлено притоком низкомолекулярных питательных веществ и фитогормонов из запасющей паренхимы в апикальные меристемы. Этот процесс во многом зависит от функционирования H^+ -АТФазы цитоплазматической мембраны [10]. Соответственно, влияние СК на интенсивность ростовых процессов в апикальных меристемах может осуществляться путем модификации активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток паренхимы клубней картофеля.

Действие СК на локальную и системную устойчивость клубней картофеля к фитотфоре также определялось концентрацией вещества. При высоких концентрациях (7×10^{-4} – 7×10^{-5} М) СК стимулировала заражение грибом, при более низких (7×10^{-9} – 7×10^{-8} М) – подавляла, а дальнейшее снижение концентрации СК приводило к уменьшению защитного действия вплоть до полного его исчезновения [24]. Устойчивость клубней картофеля к заражению патогенами зависит от физиологического состояния: прорастающие клубни менее устойчивы, чем покоящиеся [1]. Одним из механизмов влияния СК на устойчивость клубней может быть рострегулирующее действие этого фитогормона, синтез которого активируется в ответ на заражение фитотфоров.

В месте инфекции возрастает содержание не только СК но и ряда других сигнальных веществ [2], одно из которых – ЖК обладает свойствами регулятора роста клубней картофеля и влияет на функциональную активность плазмалеммы [11]. В наших экспериментах введение в инкубационную смесь ЖК в концентрации 10^{-8} М, стимулирующей рост и H^+ -АТФазную активность ВП, приводило к усилению эффекта СК на накопление H^+ в ВП (рис. 1). При низких концентрациях СК в инкубационной смеси, стимулирующих активность H^+ -АТФазы, до-

бавление ЖК вызывало дальнейшую активацию фермента, тогда как в присутствии более высоких концентраций СК, подавляющих накопление H^+ в ВП, ЖК усиливала ингибирующее действие СК.

Пассивная протонная проницаемость везикулярной мембраны несколько возрастала при добавлении ЖК в инкубационную смесь, содержащую СК в высоких концентрациях. При низких концентрациях СК не наблюдалось действия ЖК на выход H^+ из везикул (рис. 2).

В литературе имеется противоречивые сведения о взаимосвязи эффектов ЖК и СК. По мнению ряда авторов, взаимодействие между путями передачи сигнала этих соединений сводится к взаимному антагонизму [25, 26], однако получены данные о синергическом действии ЖК и СК при регуляции иммунного ответа клубней картофеля [12, 13]. Для развития защитных реакций у растений картофеля в отличие от арабидопсиса были необходимы оба эти фитогормона [13]. Предполагают функционирование единого пути передачи сигнала СК и ЖК [13].

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что СК в зависимости от концентрации может стимулировать или подавлять прорастание вышедших из покоя клубней картофеля и транспорт H^+ через мембрану ВП клеток клубня. Отмечена корреляция между действием СК на прорастание клубней и на активность H^+ -АТФазы плазмалеммы: применение ростостимулирующих концентраций СК приводило к активации плазмалеммой H^+ -АТФазы, тогда как введение в инкубационную смесь СК в ростингибирующих концентрациях вызывало подавление активности фермента и выход H^+ из ВП. ЖК усиливала как стимулирующий, так и ингибирующий эффекты СК, что свидетельствует о различных молекулярных механизмах действия этих фитогормонов на протонтранслоцирующую активность плазмалеммы.

Анализ полученных нами и литературных данных позволяет предположить, что одним из общих пусковых механизмов передачи сигнала СК и ЖК может служить регуляция транспорта H^+ через цитоплазматическую мембрану.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барская Т.А., Кораблёва Н.П., Морозова Э.В., Корневская Т.Ю. // Иммуитет и покой растений. М.: Наука, 1972. С. 172–179.
2. Rajjou L., Belghazi M., Huguet R., Robin C., Moreau A., Job C., Job D. // *Plant Physiol.* 2006. V. 141. №. 3. P. 910–923.
3. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2007. Т. 43. № 4. С. 405–411.
4. Liu Y., Liu H., Pan Q., Yang H., Huang W. // *Planta.* 2009. V. 229. № 5. P. 1087–1098.

5. *Morris K., MacKerness S.A.H., Page T., John C.F., Murphy A.M., Carr J.P., Duchfnan-Wollaston V.* // *Plant J.* 2001. V. 23. № 5. P. 677–685.
6. *Martintz C., Pons E., Prats G., Leon G.* // *Plant J.* 2003. V. 37. № 2, P.208–217.
7. *Тарчевский И.А.* Метаболизм растений при стрессе. Казань: ФЭн, 2001. 448 с.
8. *Тарчевский И. А.* Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 295 с.
9. *Ладыженская Э.П., Проценко М.А.* // *Биохимия.* 2002. Т. 67. № 2. С. 181–189.
10. *Morsomme P., Voutry M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1465. № 1. P. 1–16.
11. *Ладыженская Э.П., Кораблёва Н.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология,* 2003. Т. 39. № 3. С. 341–345.
12. *Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Валугева Т.А., Озерецковская О.Л.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2008. Т. 44. № 2. С. 236–240.
13. *Halim V.F., Altmann S., Ellinger D., Eschen-Lippold L., Miersch O., Scheel D., Roschl S.* // *Plant J.* 2009. V. 57. № 2. P. 230–242.
14. *Ладыженская Э.П.* // *Биол. мембраны.* 1999. Т. 16. № 5. С. 503–508.
15. *Платонова Т.А., Кораблёва Н.П.* // *Бот. журн.* 1992. Т. 77. № 1. С.73–77.
16. *Платонова Т.А., Кораблёва Н.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 1995. Т. 31. № 1. С. 103–114.
17. *Иванов В.Б.* Пролиферация клеток в растениях. М.: Мир, 1987. 216 с.
18. *Гордон Л.Х., Минибаева Ф.В., Огородникова Т.И., Рахматуллина Д.Ф., Ценцевитский А.Н., Колесников О.Р., Максютин Д.А., Валитова Ж.Н.* // *Докл. РАН.* 2002. Т. 387. № 6. С. 839–842.
19. *Liang W.-S., Wen J.-Q., Liang H.-G.* // *Phytochemistry.* 1997.V.44. № 2. P. 221.–223.
20. *Zhang J.-H., Liu Y.-P., Pan Q.-H., Zhan Ji.-C., Wang Xin-Qin* // *Plant Sci.* 2006.V. 170. № 4. P. 768–777.
21. *Kawano T., Sahashi N., Takahashi R., Uozumi N., Muto S.* // *Plant Cell Physiol.* 1998. V. 349. № 7. P.721–730.
22. *Ali M. B., Hahn E.J., Paek K.Y.* // *Plant Cell Rep.* 2006.V. 25. № 6. P. 613–620.
23. *Ali M. B., Hahn E.J., Paek K.Y.* // *Molekules.* 2007. V. 12. № 3. P. 607–621.
24. *Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Чаленко Г.И., Озерецковская О.Л.* // *Докл. РАН.* 1996. Т. 347. № 3. С. 418–420.
25. *Farmer E.E., Ryan C. A.* // *Plant Cell.* 1992. V. 4. № 2. P. 129–134.
26. *Kunkel B.N., Brooks D.M.* // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. V. 5. № 4. P. 325–331.

Effect of Salicylic Acid on the Proton Translocation Activity of Plasmalemma of Potato Tuber Cells

E. P. Ladyzhenskaya and N. P. Korablyova

Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii prosp. 33, Moscow, 119071 Russia

e-mail: ladyzhen@inbi.ras.ru

Received August 9, 2010

Abstract—Action of salicylic acid (SA) on the activity of membrane bound H⁺-ATPase and passive proton permeability of plasmalemma membrane vesicles (PMV) from parenchyma cells of potato tubers was detected. A correlation between SA action and germination of tubers and activity of plasmalemma H⁺-ATPase was revealed: the application of growth-stimulating concentrations of SA (10⁻¹⁰–10⁻⁸ M) in the system in vitro resulted in activation of plasmalemma H⁺-ATPase, while the utilization of growth-inhibiting concentrations (10⁻⁴, 10⁻⁵ M) provoked inhibition of the enzyme activity. Addition of jasmonic acid (JA) to the incubation mix resulted in increase of SA effect on the accumulation of H⁺ in PMV.