

РОЛЬ ВАКУОЛЯРНОГО КОМПАРТМЕНТА В МЕТАБОЛИЗАЦИИ АМИНОКИСЛОТ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ АЭРАЦИИ, ГИПОКСИИ И CO₂-СРЕДЫ

А.Н. Ершова, Н.В. Винокурова

ФГБОУ ВО Воронежский государственный педагогический университет,
Воронеж, e-mail: aershova@vspsu.ac.ru

Специфичность в проявлении метаболических свойств одних и тех же соединений достигается их пространственной изоляцией в клетке, т. е. компартиментализацией. Вакуоли представляют собой мультифункциональные органеллы (Андреев, 2001). Выступая в качестве донора или акцептора тех или иных соединений, необходимых для выполнения клеточных функций, вакуоль ведет себя как функциональный аналог внеклеточной среды. В вакуолярном соке найдены все аминокислоты, содержащиеся в белках, в то время как небелковые аминокислоты и амиды обычно имели экстровакуолярную локализацию (Farre et al., 2001). Объемы митохондриального фонда аминокислот обычно невелики, вследствие чего анализируют обычно вакуолярный и цитоплазматический фонды аминокислот в клетках растений.

В условиях дефицита кислорода нарушается синтез белка, происходят изменения в обмене кислот цикла Кребса и аминокислот. Предполагается, что одним из механизмов адаптации растений к гипоксии является накопление в их клетках органических кислот малата или сукцината (Rocha et. al., 2010) и аминокислот лизина, ГАМК и аланина, что препятствует развитию клеточного ацидоза. Благодаря значительному накоплению в клетках растений ГАМК и аланина, их стали называть “стрессовыми” аминокислотами. Показано (Ершова, 2007), что накапливающийся при дефиците кислорода в тканях растений CO₂ усиливает все эффекты гипоксии. Вакуоль, являясь мультифункциональным компартментом (Андреев, 2001), играет важную роль и в ответных защитных реакциях растений на стрессовые воздействия. Однако объемы вакуолярного фонда аминокислот для большинства растений практически не исследованы, а для условий гипоксии такие исследования единичны. Исследовали внутриклеточные фонды «стрессовых» и связанных с ними аминокислот, а также влияние условий кратковременного дефицита кислорода и CO₂-среды на скорость их пополнения у растений с использованием мембранотропных соединений.

Анализировали неустойчивые к гипоксии проростки гороха (Рамонский 77), выращенные в лабораторных условиях методом гидропоники при 12-часовом фотопериоде. При выделении цитоплазматического и вакуолярного фондов аминокислот использовали мембранотропное соединение ДМСО по методике (Delmer, 1979) в нашей модификации. В предварительных опытах были подобраны концентрации ДМСО для селективного разрушения плазмалеммы или тонопласта. Нарушение проницаемости тонопласта оценивали по выходу красителя нейтрального красного, разрушение тонопласта контролировали путем микроскопического просмотра. Выход аминокислот анализировали после хроматографического разделения на пластинках с силикагелем G. В опытах по изучению влияния дефицита кислорода надземную часть проростков помещали в темновых условиях в разные газовые среды на 3–6 часов (воздух – контроль, азот и CO₂ из баллонов), после чего анализировали клеточные фонды аминокислот.

Как показали полученные результаты (табл. 1), в клетках растений гороха основным местом локализации ГАМК, аланина, аспаргина и валина служила цитоплазма, а аспаргат, глутамат и фенилаланин были приблизительно поровну распределены между цитоплазматическим и вакуолярным фондами клетки.

В условиях дефицита кислорода через 3 часа (табл. 2), содержание ГАМК в клетках увеличивалось на 25 %, а в CO₂ среде на 40 %. С увеличением сроков экспозиции содержание ГАМК возрастало в 1,5 и 2,5 раза соответственно. При этом в первые часы наиболее активно насыщался цитоплазматический фонд этой аминокислоты. Содержание ГАМК в вакуоле не менялось. Только через 6 часов экспозиции растений в условиях разных газовых сред начинал возрастать вакуолярный фонд ГАМК (почти в 3 раза). Пополнение этого фонда происходило более эффективно при действии CO₂-среды, чем инертного газа азота. Содержание глутамата в проростках несколько возрастало во всех вариантах опыта. При этом увеличивались как вакуолярный, так и цитоплазматический его фонды, особенно при действии среды углекислого газа. Содержание другой «стрессовой» аминокислоты аланина в клетках проростков гороха возрастало с увеличением сроков экспозиции, но наиболее эффективно в среде углекислого газа, где содержание этой аминокислоты увеличивалось почти вдвое. В отличие от ГАМК, накопление аланина происходило только за счет возрастания цитоплазматического фонда. Содержание аспартата в клетках при этом, наоборот, уменьшалось как при гипоксии, так и в CO₂-среде. В тоже время цитоплазматический фонд аспартата у растений при дефиците кислорода поддерживался на уровне аэрируемых растений. Снижение количества этой аминокислоты происходило только за счет вакуолярного фонда, где содержание аспартата падало в 2,5 и 6 раз соответственно.

Таблица 1

**Внутриклеточное распределение аминокислот в листьях проростков гороха
(а – мкмоль · г⁻¹ сырой массы)**

Соединения	Содержание					
	В клетках		В цитозоле		В вакуоле	
	а	%	а	%	а	%
Аспартат	8,57±0,13	100	4,30±0,10	50	4,28±0,15	50
Глутамат	6,72±0,31	100	3,56±0,16	53	3,00±0,13	46
Аланин	4,04±0,20	100	2,91±0,09	72	1,13±0,04	26
ГАМК	3,93±0,05	100	2,57±0,10	65	1,30±0,02	33
Аспарагин	0,26±0,01	100	0,15±0,04	60	0,10±0,01	38
Валин	0,63±0,00	100	0,55±0,01	87	0,08±0,02	13
Фенилаланин	1,25±0,06	100	0,73±0,00	58	0,51±0,01	40

Таблица 2

**Влияние гипоксии и CO₂-среды на содержание и локализацию аминокислот
в клетках проростков гороха (мкмоль · г⁻¹ сырой массы, %, Ц – цитоплазматический фонд,
В – вакуолярный фонд)**

Экспозиция, часы	Аминокислоты	Воздух			Гипоксия		CO ₂ -среда	
		Содержание в клетке	%	Ц : В	% от контроля	Ц : В	% от котроля	Ц : В
3	Аспартат	8,89±0,20	100	50:50	82	64:36	88	75:25
	Глутамат	6,09±0,10	100	54:46	115	60:40	132	51:49
	Аланин	4,34±0,10	100	72:26	132	73:27	115	76:24
	ГАМК	3,38±0,09	100	64:36	124	72:28	141	70:30
6	Аспартат	8,34±0,10	100	53:47	70	70:30	58	87:13
	Глутамат	5,68±0,10	100	56:44	131	56:44	161	73:27
	Аланин	3,92±0,07	100	73:27	124	79:21	214	92:8
	ГАМК	3,09±0,08	100	61:39	163	55:45	263	48:52

Проведенные нами опыты показали, что для ГАМК в первые часы действия как гипоксии, так и CO₂-среды быстрее пополнялся цитоплазматический фонд клетки. С увеличением же сроков экспозиции растений начинал возрастать вакуолярный, метаболически инертный фонд ГАМК. Это могло происходить за счет переброса в него избы-

точных количеств накопившейся аминокислоты, как это ранее только предполагалось (Ершова, 2007). Показано, что у проростков гороха накопление ГАМК не сопровождалось значительным изменением цитоплазматического фонда глутамата. Это подтверждает высказанное ранее (Ершова, 2007) предположение о том, что у слабоустойчивых к гипоксии растений гороха увеличение содержания ГАМК не связано с возрастанием активности глутаматдекарбоксилазы, локализованной в цитоплазме, а является, в большей степени, результатом торможения утилизации ГАМК. Накопление другой стрессовой аминокислоты растений аланина, в отличие от ГАМК, происходило при всех сроках экспозиции проростков в условиях газовых сред, только за счет увеличения цитоплазматического фонда этой аминокислоты. Оно было частично связано с активацией декарбоксилирования аспартата, содержание которого в клетках растений снижалось. Поддержание высокой скорости этой реакции могло осуществляться за счет постоянной переброски аспартата из вакуолей в цитоплазму, что способствовало уменьшению вакуолярного фонда этой аминокислоты на фоне стабилизации ее содержания в цитоплазме.

Таким образом, нашими исследованиями было установлено, что в условиях кратковременного (до суток) дефицита кислорода у растений возрастает роль вакуолярного фонда клеток. Именно в него уводились избыточные количества одних аминокислот (ГАМК) или из которого пополнялись цитоплазматические фонды предшественников других аминокислот (аспартата). Отмечено, что повышенные концентрации диоксида углерода только усиливали скорость образования стрессовых аминокислот, но не меняли характера пополнения клеточных фондов этих соединений в растениях.

Литература

Андреев И.М. Функции вакуоли в клетках высших растений // Физиология растений. – 2001. – Т. 48 – С. 777–787.

Ершова А.Н. Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2007. – 264 с.

Delmer H. Dimethylsulfoxide as a Potential Tool for Analysis of Compartmentation in Living Plant Cells // Plant Physiol. – 1979. – 64. – P. 623–629.

Farre E.M., Tressen A., Roessner U., Gelgenberger P., Trettewey R., Willmitzer L. Analysis of the compartmentation of glycolytic intermediates, nucleotides, sugar, organic acids, amino acids and sugar alcohols in potato tubers using a nonaqueous fractionation method // Plant Physiol. – 2001. – 127. – P. 685–600.

Rocha M., Lucausi F., Araujo W.L., Nunes-Nesi A., Soder K., Fernie A.R., van Dongen J.T. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicas* // Plant Physiol. – 2010. – V. 152. – P. 15011–1513.