

## РОЛЬ ПЛАЗМЕЛЕММНОЙ $H^+$ -АТФазы В ПРОРАСТАНИИ СЕМЯН

Н.В. Обручева, С.В. Литягина, И.А. Синькевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, [obroucheva@ippras.ru](mailto:obroucheva@ippras.ru), [n.obroucheva@mail.ru](mailto:n.obroucheva@mail.ru)

**Аннотация.** Плазмалеммная  $H^+$ -АТФаза осуществляет транспорт  $H^+$  ионов из цитоплазмы в оболочки клеток, что приводит к их подкислению и повышению растяжимости. В различных семенах фермент при набухании приобретает нужную конформацию и переходит до начала прорастания из самоингибированной в активную форму.

**Ключевые слова:** прорастание семян, подкисление оболочек, плазмалеммная  $H^+$ -АТФаза

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-571-574

Прорастание семян реализуется в результате растяжения клеток осевых органов зародыша при поступлении воды в набухающие семена. Деление клеток начинается или одновременно с растяжением или значительно позже. Преимущество растяжения клеток заключается в гораздо более быстром увеличении размеров осевых органов, что обеспечивает контакт с фронтом почвенной влаги и возможность дальнейшего успешного развития проростка. Прорастание обычно регистрируют по проклевыванию кончика зародышевого корешка через семенную кожуру.

Растяжение клеток coleoptилей и гипокотилей обычно описывают как «кислый рост». Его механизм заключается в размягчении структуры клеточных оболочек в кислой среде, приводящей к повышению растяжимости клеток в результате активации гидролитических ферментов и белка экспансина, приводящих к частичному гидролизу полимеров и большему скольжению их цепей относительно друг друга [Шарова, 2004]. Под напором воды, поступающей в клетку по осмотическому градиенту, объем клетки начинает возрастать. Предполагается, что триггером «кислого» роста является фермент плазмалеммная  $H^+$ -АТФаза [Nager, 2003], поскольку одна из его функций заключается в выносе  $H^+$  ионов из цитоплазмы в апопласт через плазмалемму в обмен на ионы калия [Buch-Pederson et al., 2009]. Такая активация была описана как ответная реакция на обработку ауксинами [Шишова и др., 2012; Takahashi et al., 2012].

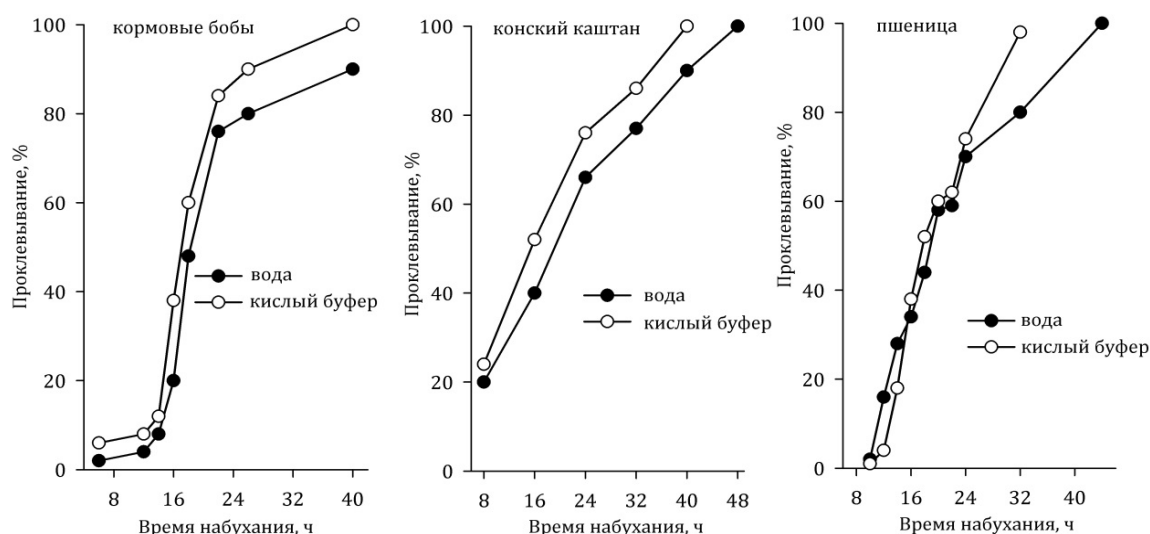
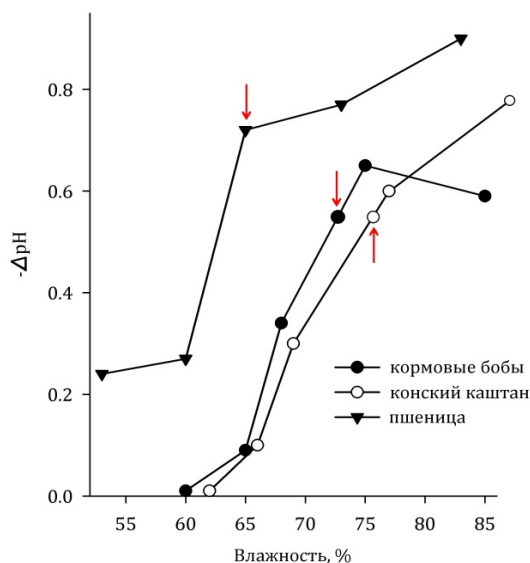


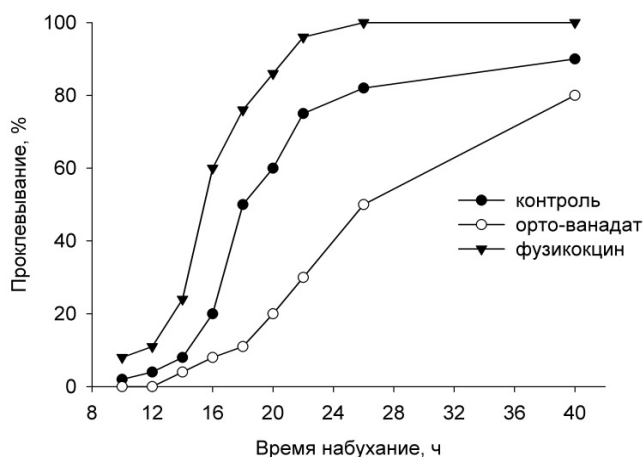
Рис. 1. Прорастание семян в кислом буфере.

В опытах с прорастающими семенами конского каштана, кормовых бобов и пшеницы нами было показано, что в осевых органах набухающих семян перед наклеванием начинается выделение  $H^+$  ионов в апопласт в ответ на обработку кислым буфером (рис. 1, 2).



**Рис. 2. Подкисление наружного раствора осевыми органами. Стрелками показано проклеывание.**

Подкисление наружного раствора регистрировали по изменению рН раствора, в котором инкубировали осевые органы в присутствии  $10^{-4}$  М КСl. Такое подкисление усиливается под действием  $5 \cdot 10^{-5}$  М фузикокцина, активатора и стабилизатора плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы [Camoni et al., 2013] и ингибируется в присутствии  $5 \cdot 10^{-3}$  М орто-ванадата, аналога фосфат-иона. Успешное функционирование плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы подтверждается тем, что фузикокцин стимулирует само прорастание семян, а орто-ванадат ингибирует его (рис. 3).

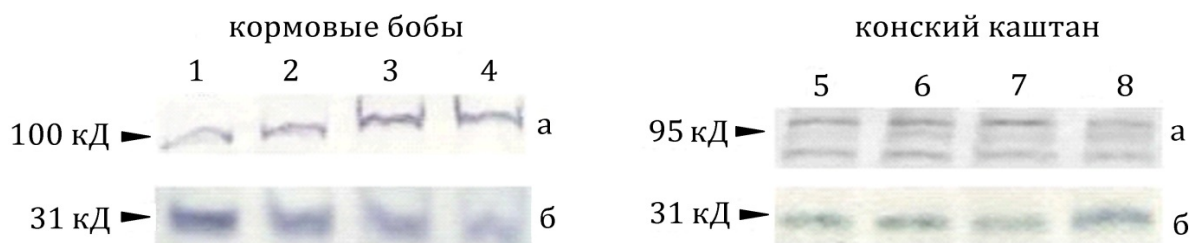


**Рис. 3. Активация и ингибирование прорастания семян кормовых бобов.**

Активация плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы в прорастающих семенах не ингибируется 10  $\mu$ М циклогексимидом, ингибитором синтеза белков, и 5  $\mu$ М  $\alpha$ -аманитином, ингибитором транскрипции новых мРНК. Следовательно, ее активация в набухающих семенах не является результатом синтеза белка *de novo*, а образование молекул этого

фермента происходило еще в созревающих семенах на долгоживущих мРНК. Присутствие молекул фермента было показано у зародышей, выделенных из сухих семян кукурузы [Sanchez-Nieto et al., 1998], а его слабая активность в семенах, набухавших 5 часов, не сопровождалась синтезом белка [Sanchez-Nieto et al., 2011].

В наших опытах был использован иммунохимический метод идентификации белка плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы в микросомной фракции из осевых органов семян кормовых бобов и конского каштана с использованием специфических антител [Agrisera, Sweden]. Белок плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы с мол. массами 100 кД (кормовые бобы) и 95 кД (конский каштан) (рис. 4а) был обнаружен при набухании (полосы 1, 2, 5, 6), при проклевывании корешка (полосы 3, 7), и в растущих после проклевывания осевых органах (полосы 4, 8).



**Рис. 4. Иммунохимическая идентификация белков плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы (а) и 14-3-3 белка (б) в набухающих, прораставших и растущих осевых органах. 1 – набухание, влажность 40%; 2 – набухание, влажность 60%; 3 – проклевывание, влажность 72-73%; 4 – рост; 5 – влажность, 62%; 6 – набухание, влажность 64-66%; 7 – проклевывание, влажность 73-74%; 8 – рост.**

Можно предположить, что молекулы фермента находятся в начале набухания в самоингибированном состоянии; при поступлении воды приобретают активную конформацию [Portillo, 2000] в результате отодвигания регуляторного домена в цитоплазму, что делает его доступным для фосфорилирования. Фосфорилирование сопровождается связыванием 14-3-3 регуляторного белка, которое стабилизируется фузикооксином [Camoni et al., 2013], и фермент становится функционально активным. Недавно было показано, что в превращении фермента из самоингибированного состояния в активное принимает участие и смещение N-конца молекулы, что облегчает доступность протеинкиназы к треонину [Ekberg et al., 2010]. Наличие 14-3-3 белков наряду с присутствием плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы было подтверждено нами на всех этапах набухания и прорастания семян кормовых бобов и каштана (рис. 4б). Однако сам факт фосфорилирования треонина в модельных опытах подтвержден не был. Следует предположить, что при набухании переход из самоингибированного в активное состояние происходит за счет сдвигов С- и N-концов молекулы, вследствие приобретения молекулой фермента активной конформации в результате повышения оводненности. В ходе дальнейшей активации [Borch et al., 2002] взаимодействие между 14-3-3 белком и молекулой фермента может не зависеть от фосфорилирования, так как 14-3-3 белок взаимодействует с фосфотреонином, расположенным в конце регуляторного домена, и это связывание вызывается фузикооксином.

Таким образом, в прорастающих семенах имеются все необходимые компоненты для активации плазмалеммной  $H^+$ -АТФазы, а именно, сам фермент и 14-3-3 белок; следует добавить, что и лиганды эндогенного фузикооксина были обнаружены в прорастающих семенах конского каштана и кормовых бобов [Antipova et al., 2003].

*Работа поддержана грантом РФФИ № 17-04-00859.*

## Литература

- Шарова Е.И. Клеточная стенка растений // Изд-во С.-Пб. Университета. – 2004. – 151 с.
- Шишова М.Ф., Танкелон О.В., Рудашевская Е.Л., Емельянов В.В., Шахова Н.В., Кирпичникова А.А. Изменение транспортной активности протонных насосов клеток колеоптилей на разных этапах развития проростков кукурузы // Онтогенез. – 2012. – Т. 43, № 6. – С. 413–423.
- Antipova O.V., Bartova L.M., Kalashnikova T.S., Obroucheva N.V., Voblikova V.D., et al. Fusicoccin induced cell elongation and endogenous fusicoccin-like ligands in germinating seeds // *Plant Physiol Biochem.* – 2003. – V. 41. – P. 157–164.
- Borch J., Bych K., Roepstorff P., Palmgren M.G., Fugisang A.T. Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 protein and plasma membrane  $H^+$ -ATPase // *Bioch. Soc. Transactions.* – 2002. – V. 30, No. 4. – P. 411–415.
- Buch-Pedersen M.J., Pedersen B.P., Veierskov B., Nissen P., Palmgren M.G. Protons and how they are transported by proton pumps // *Eur. J. Physiol.* – 2009. – V. 457, No. 3. – P. 573–579.
- Camoni L., Visconti S., Aducci P. The phytotoxin fusicoccin a selective stabilizer of 14-3-3 interactions? // *Int. Union Biochem. Mol. Biol.* – 2013. – V. 65, No. 6. – P. 513–517.
- Ekberg K., Palmgren M.G., Veeierskov B., Buch-Pedersen M.J. A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285, No. 10. – P. 7344–7350.
- Hager A. Role of plasma membrane  $H^+$ -ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects // *J. Plant Res.* – 2003. – V. 116, No. 6. – P. 483–505.
- Portillo F. Regulation of plasma membrane  $H^+$ -ATPase in fungi and plants // *Bioch. Biophys. Acta.* – 2000. – V. 1469. – P. 31–42.
- Sanchez-Nieto S., de Gomez-Puyou M.T., Rodriguez-Sotres R., Garballo A., Gavilanes-Ruiz M. Comparison of plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – V. 1414, No. 1–2. – P. 175–187.
- Sanchez-Nieto S., Enriquez-Arredondo C., Guzman-Chavez F., Hernandez-Munoz R., Ramirez J. et al. Kinetics of the  $H^+$ -ATPase from dry and 5-hours-imbibed maize embryos in its native, solubilized and reconstituted form // *Mol. Plant.* – 2011. – V. 4, No. 3. – P. 505–515.
- Takahashi K., Hayashi K., Kinoshita T. Auxin activates the plasma membrane  $H^+$ -ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2012. – V. 159, No. 2. – P. 632–641.

## ROLE OF PLASMALEMMA $H^+$ -ATPASE IN SEED GERMINATION

N.V. Obroucheva, S.V. Lityagina, I.A. Sinkevich

K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia,  
*obroucheva@ippras.ru, n.obroucheva@mail.ru*

**Abstract.** Plasmalemma-located  $H^+$ -ATPase provides  $H^+$  ion transport from cytoplasm to cell walls, thus providing their acidification and higher extensibility. In various imbibing seeds, the enzyme molecules acquire proper conformation, leave their autoinhibited state and become activated prior to germination.

**Keywords:** seed germination, cell wall acidification, plasmalemma  $H^+$ -ATPase