

ИЗМЕНЕНИЕ АЦИДОФИЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ H^+ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА VBI-0

А.А. Кирпичникова, Т. Чэнь, С.Б. Теплякова, М.Ф. Шишова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, nastin1972@mail.ru

Аннотация. Рост растяжением растительных клеток является их уникальной особенностью. В основе реализации этого процесса лежит работа такого фермента, как H^+ -АТФаза плазмалеммы. Синхронизированная суспензионная культура клеток табака позволяет изучать изменения активности H^+ -АТФазы на разных стадиях развития. Наибольшая активность транспорта протонов характерна для клеток, характеризующихся максимальной интенсивностью роста. Этот процесс ингибировался ортованадатом натрия и присутствием ионов Ca^{2+} .

Ключевые слова: H^+ -АТФаза плазмалеммы, рост растяжением

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1268-1271

Рост растяжением является уникальной особенностью растительных клеток. В ходе роста растяжением происходит активный транспорт протонов во внеклеточное пространство, что связано с работой H^+ -АТФазы плазмалеммы. Интенсивность роста растяжением имеет ткане- и органоспецифичность. Поэтому в качестве модельного объекта была использована суспензионная культура клеток *Nicotiana tabacum* (VBI-0, *Virginia Bright Italia*). Преимуществом данной культуры является физиологическая однородность клеток, которые обладают способностью к синхронному переходу из одной фазы клеточного цикла в другую [Nagata et al., 1992]. Для данной культуры весь цикл развития составляет 21 день. На 3-6 сутки клетки активно делятся с образованием цепи из 4-8 клеток. В последующий период происходит синхронное прекращение клеточного деления, начинается рост клеток растяжением и в дальнейшем постепенная дезинтеграция клеточных цепей с формированием отдельных клеток популяции (рис. 1) [Zazimalova et al., 1993].

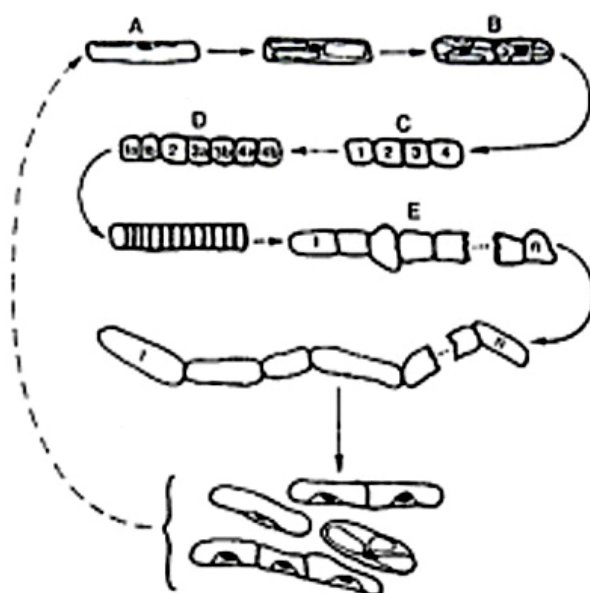


Рис. 1. Цикл развития клеток культуры табака (Zazimalova et al., 1993).

Суспензию клеток культивировали в темноте при температуре 26°C, при постоянном перемешивании на ротационном шейкере (при 110 оборотах в минуту). В работе были использованы клетки в возрасте 7, 14 и 21 суток.

Для определения интенсивности подкисления клетками табака был использован краситель-индикатор бромкрезоловый пурпуровый. Обычно этот краситель используют в диапазоне от pH 5.0 до 7.0 (рис. 2). В стерильную чашку Петри (диаметром 40 мм) вносили 4 мл культуральной среды с добавлением 10% раствора бромкрезолового пурпурового и 0,7% агара (pH 7.0). В каждую чашку Петри помещали 2,5 г клеток табака и проводили сканирование каждые 15 мин (общая продолжительность эксперимента составляла 2 часа). В дальнейшем изображение преобразовывали в черно-белое и определяли интенсивность окрашивания с помощью программы ImageJ [Чэнь и др., 2015].

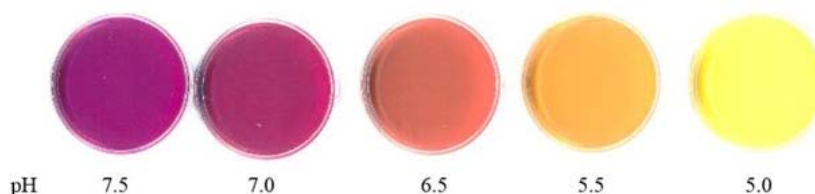


Рис. 2. pH-зависимое изменение окрашивания бромкрезолового пурпурового.

В ходе предыдущих исследований с использованием везикулярной фракции плазмалеммы, полученной из клеток суспензионной культуры табака VBI-0, было показано, что гидролитическая активность H^+ -АТФазы плазмалеммы изменяется нелинейно и была максимальной на 14 день развития (рис. 3). В наших экспериментах, проведенных с использованием нативных клеток, проанализирована протон-транспортирующая активность фермента, выявленная по интенсивности закисления среды культивирования.

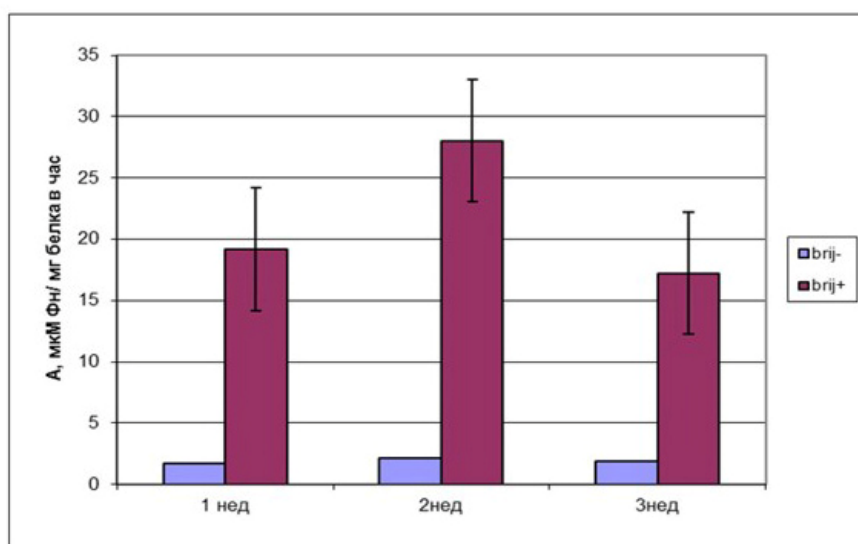


Рис. 3. Изменение гидролитической активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток табака суспензионной культуры VBI-0.

Было выявлено, что ацидофицирующая активность, также как и гидролитическая, достигала максимума на 14 день. Доказательство того, что данный процесс закисления опосредован активацией протонной помпы плазматической мембраны было доказано в

экспериментах с применением специфичного ингибитора – орто-ванадата натрия (рис. 4). Предобработка клеток раствором ингибитора в течение 2х часов приводила к значительному снижению изменения окраски индикатора.

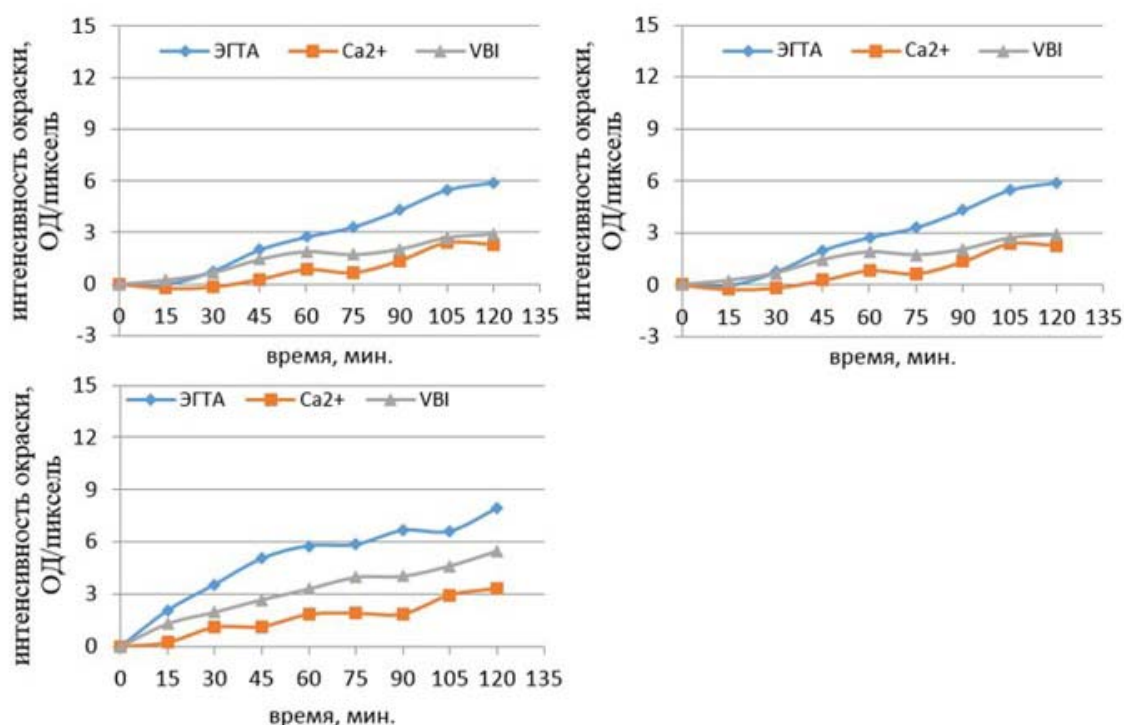


Рис. 4. Изменение ацидофицирующей активности H^+ -АТФазы плазмалеммы улеток суспензионной культуры табака VBI-0 в среде, содержащей Ca^{2+} или ЭГТА.

Показано, что наиболее чувствительными были клетки в возрасте 7 дней. Разница составляла около 50% по сравнению с 14 и 21 дневными клетками. Выявленное увеличение активности H^+ -АТФазы могло быть объяснено как усилением активности фермента, так и изменением числа ферментативных комплексов в составе плазмалеммы. Хорошо известно, что рост растяжением регулируется фитогормоном ауксином посредством изменения активности фермента, однако в наших экспериментах экзогенное внесение гормона не вызвало статистически достоверного изменения амплитуды закисляющей способности клеток. Наряду с этим известно, что первичные этапы трансдукции ауксинового сигнала включают в себя увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме. Ранее нами было показано, что этот процесс зависит от содержания кальция во внешней среде [Shishova, Lindberg 2004]. В связи с этим была проведена серия экспериментов, в которой анализировали амплитуду закисления при модуляции содержания кальция. Изменение окраски индикатора анализировали после прединкубации клеток в среде, содержащей ионы Ca^{2+} или среды с хелатором ЭГТА. Выявлено, что у всех трех возрастов закисление среды было больше в варианте с добавлением ЭГТА, особенно в возрасте 14 дней (рис. 4). Предполагается, что поступление кальция в цитоплазму при инициации роста растяжением приводит к кратковременному ингибированию H^+ -АТФазы плазмалеммы, что и отражается в снижении протонтранспортирующей работы фермента, особенно на этапе интенсивного роста клеток на 14 день развития.

Таким образом, клетки суспензионной культуры табака VBI-0 при усилении роста растяжением характеризуются увеличением закисляющей способности, за счет активации работы протонной помпы плазмалеммы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00743, с использованием оборудования Ресурсного центра СПбГУ “Развитие молекулярных и клеточных технологий”.

Литература

Чэнь Т., Михайлова Ю.В., Романюк Д.А., Шишова М.Ф. Тест-система визуализации закисляющей способности клеток суспензионной культуры табака. // Естественные и технические науки. – 2015. – № 12 (90). – С. 11–15.

Nagata T., Hasezawa S., Inze D. Tobacco By-2 Cells // Springer. – 2004. – 347 p.

Shishova M., Lindberg S. Auxin induces an increase of Ca^{2+} concentration in the cytosol of wheat leaf protoplasts // J. Plant Physiology. – 2004. – V. 161. – P. 937–945.

Zazimalova E., Opatrny Z., Brezinova A., Eder F. The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content // J. Exp. Bot. – 1993. – V. 46. – P. 1205–1213.

CHANGE OF ACIDIFYING ACTIVITY PLASMA MEMBRANE H^+ -ATPase IN VBI-0 TOBACCO SUSPENSION CULTURE CELLS

A.A. Kirpichnikova, T. Chen, S.B. Teplyakova, M.F. Shishova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State University", Saint-Petersburg, Russia, *nastin1972@mail.ru*

Abstract. Plant cell elongation is a unique process. It is based on the activity of plasma membrane H^+ -ATPase. Tobacco cells of synchronized suspension culture VBI-0 is useful model object to investigate H^+ -ATPase activity at different growth stages. Proton transport activity was the most intensive at the stage of maximum elongation growth. Acidification was inhibited by Na-ortho vanadate and in presence of Ca^{2+} .

Keywords: H^+ -ATPase plasmalemma, growth by stretching