

4. Биопробы и биотесты (незаконченные рукописи академика А.М.Гродзинского). Под ред. Грахов В.П., Бойко Е.Н., Заименко Н.В. – Киев: «Золотые ворота», 2011. – 364 с.

ИЗМЕНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО pH И РЕДОКС-СТАТУСА АСКОРБАТА В ЛИСТЬЯХ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE* L.) ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННОЙ β -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ

**Савченко Г.Е., Кабашникова Л.Ф., Кондратьева В.В.,
Анрианов А.А.**

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь*

Повышение общей неспецифической устойчивости растений к неблагоприятным факторам биотической и абиотической природы путем индукции природных защитных механизмов – одна из интенсивно исследуемых проблем растениеводства в мире. Одним из эффективных веществ такого рода является β -аминомасляная кислота (β -АМК), обладающая праймирующим эффектом – сенсбилизацией и дополнительным активированием иммунной системы растений перед будущей патогенной атакой или действием иных стрессоров. Разработка защитных препаратов на основе β -АМК требует подбора концентраций и детального изучения особенностей ее влияния на конкретный вид растений. Особый интерес при этом вызывают методы быстрой оценки возможных нежелательных эффектов β -АМК и события, разыгрывающиеся сразу после обработки листьев β -АМК, которые могут приводить к изменению важных в регуляторном аспекте параметров в результате связи β -АМК с рецептором. К такому можно отнести изменения величины pH в разных компартментах клетки и состояния аскорбата (соотношения его восстановленной и окисленной формы) как основного (в количественном отношении) антиоксиданта растительных клеток.

Работу проводили с листьями 7-дневных проростков ячменя, выращенными в лабораторных условиях. Изменения pH оценивали с помощью флуоресцентных зондов. Контроль pH апопласта осуществляли непосредственно в листе с помощью флуоресцеинизотиоцианата (FITC), соединенного с высокомолекулярным декстраном (FITC-D, 4000). Способ основан на измерении pH-чувствительного отношения интенсивности свечения

двух пиков в спектре испускания флуоресцентного зонда FITC (I_{520}/I_{555}). Для наблюдения за изменением рН в апопласте в срезанные листья заранее вводили зонд, а затем переносили их на раствор β -АМК (10^{-3} М).

Изменение рН цитоплазмы оценивали с помощью рН-чувствительного зонда пиранина, который вводили в срезанный лист с транспирационным током, инкубируя лист на растворе пиранина в течение 1 ч. После этого лист переставляли на дистиллированную воду на 1 ч для удаления зонда из межклеточного пространства, а затем переносили его на раствор β -АМК и измеряли изменение параметров флуоресценции пиранина через разные временные интервалы (каждая временная точка – новый лист). Для определения рН использовали калибровочную зависимость величины отношения интенсивности флуоресценции при 520 нм от рН, регистрируемой при разных длинах волн возбуждающего света (404 и 456 нм). При работе с зондами всегда измеряли спектры испускания одинаковых участков листа (не менее 4-х биологических повторностей).

В основу измерения содержания аскорбата положен спектрофотометрический метод определения содержания аскорбата (модификация метода Окамура), основанный на восстановлении аскорбиновой кислоты (АК) трехвалентного железа до двухвалентного, образующего комплекс с бипиридилом, поглощающий при 524 нм.

Из таблицы 1 видно, что рН апопласта изменялась примерно на 0,2 единицы в сторону защелачивания уже через 20 мин после начала инкубации, а через 30 мин начинала приближаться к исходному уровню.

Таблица 1 – Изменение рН в апопласте при инкубации срезанного листа на растворе β -АМК (10^{-3} М)

№	Время инкубации на β -АМК, мин	I_{520}/I_{550}	рН
1	7	1,07±0,10	5,09
2	13	1,15±0,11	5,32
3	19	1,16±0,11	5,35*
4	27	1,11±0,12	5,20

* $P(t)$ при сравнении с вариантом 1 равно 0,001

В контрольном варианте в ходе инкубации листа на дистиллированной воде, возможно, за счет раневого стресса, происходило закисление цитоплазмы (таблица 2). Однако действие β -АМК способствовало еще большему ее закислению. В результате в первые 30 мин инкубации в средней части листа рН изменилось от 5,8 до 5,2. Через 45 мин инкубации на β -АМК цитоплазма начала защелачиваться и спустя

3,5 ч различия между вариантами составляли в единицах I_{404}/I_{456} $10,81 \pm 0,75$ и $21,11 \pm 0,96$ для варианта с β -АМК и контроля, соответственно, и были статистически надежными, $t=55,3$, $P(t) < 0,001$. В единицах рН изменение составило примерно 0,4 единицы (6,0 и 5,6, соответственно).

Таблица 2 – Изменение рН в цитоплазме при инкубации срезанного листа ячменя на растворе β -АМК (10^{-3} М)

Время инкубации на β -АМК, мин	0	30	45	60	210	210, контроль
I_{404}/I_{456}	$12,50 \pm 1,25$	$24,20 \pm 2,40$	$30,10 \pm 3,08$	$26,30 \pm 1,20$	$10,81 \pm 0,75$	$21,11 \pm 0,96$
рН	5,8	5,2	5,3	5,4	6,0	5,6

Действие β -АМК (10^{-3} М) на срезанный лист вызывало увеличение относительного содержания окисленного аскорбата (снижение редокс-статуса) без существенного изменения содержания общего аскорбата (таблица 3).

Таблица 3 – Изменение содержания различных форм аскорбата при инкубации срезанных листьев ячменя в течение 60 мин на растворе β -АМК (10^{-3} М)

Вариант	Общий аскорбат (1)	Восстановленный аскорбат (2)	Окисленный аскорбат (3)	2:3
Контроль	$2,69 \pm 0,09$	$2,19 \pm 0,001$	0,50	4,38
β -АМК	$2,59 \pm 0,06$	$1,23 \pm 0,006$	1,36	0,90

Таким образом, под влиянием β -АМК, введенной в срезанные листья ячменя, происходили сравнительно быстрые и обратимые изменения рН: защелачивание межклеточного пространства на 0,2 единицы рН в первые 20-30 мин инкубации на растворе β -АМК и закисление цитоплазмы на 0,6 единицы рН. Примерно в это же время можно было наблюдать и изменение редокс-состояния аскорбатного пула, присутствующего в листе. Изменение рН апопласта в сторону защелачивания на 0,2 единицы рН в первые 20 мин, возможно, связано со снижением работы протонных помп, но нельзя исключить и иные причины. Полученные данные указывают на участие β -АМК в системе регуляции внутриклеточного рН. Возможно, в

срезанных листьях ячменя в присутствии β -АМК увеличился выход аскорбата в апопласт, где он окислялся, и этому способствовало показанное нами защелачивание апопласта в результате действия β -АМК.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ВЫХОДА ИОНОВ КАЛИЯ ИЗ КЛЕТОК КОРНЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ПРИ СТРЕССЕ

Самохина В.В., Мацкевич В.С., Соколик А.И., Демидчик В.В.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Окислительный стресс возникает в растительной клетке в результате практически любых неблагоприятных воздействий. Засоление, механический стресс, засуха, гипоксия и другие стресс-факторы среды индуцируют дисбаланс производства и детоксификации активных форм кислорода (АФК) [1]. Одновременно, с синтезом АФК у растений наблюдается выход из клеток ионов калия (K^+), который является основным ионом, ответственным за генерацию и поддержание разности электрических потенциалов на плазматической мембране клетки, регулятором ростовых и анаболических процессов. Сигнально-регуляторная роль АФК может быть обусловлена их влиянием на катионные каналы, в частности, K^+ -проницаемые каналы [2]. Целью работы была выявление закономерностей воздействия высоких уровней NaCl, гидроксильного радикала и H_2O_2 на кинетику выхода K^+ ($^{86}Rb^+$) из корней арабидопсиса.

В работе был использован $^{86}Rb^+$ в форме хлорида (POLATOM; Польша). Объектом исследования являлись корни проростков *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh 'WS-0', а также нокаутные мутанты *gork1-1*, лишенные гена GORK, кодирующего наружу выпрямляющий K^+ -канал. Культура целых растений выращивалась вертикально из семян на чашках Петри (100% среды Мурашиге и Скуга, 0,25% фитогеля, 1% сахарозы, pH 6). Накопленная активность проростков измерялась при помощи β -радиометра, имеющего детектор размером 5×7 см. Проростки закреплялись в специальных держателях и погружались в раствор следующего состава (ммоль/л): 0,1 KCl, 0,1 CaCl₂, pH 6,0, 2 Трис /4 Мес, содержащий ^{86}Rb . Через 30 мин загруженные ^{86}Rb проростки извлекались из раствора и помещались в такой же раствор, но без изотопа. Через определенные интервалы времени проростки извлекались из раствора, ополаскивались и помещались на подставку, покрытую фильтровальной бумагой, для помещения в измерительный отсек β -радиометра. Через 5 мин с начала регистрации выхода $^{86}Rb^+$