

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПОСТУПЛЕНИЯ ИОНОВ АММОНИЯ В КОРНИ
ПРОРОСТКОВ *Zea mays* И КЛЕТКИ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ *Syringa vulgaris*
ПРИ ВАРЬИРОВАНИИ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА
ИСТОЧНИКОВ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА**

Т.В. Цап, М.П. Шапчиц, А.П. Кудряшов

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

Азот – необходимая составляющая питания как для растений, так и для животных. Он входит в состав белков, нуклеиновых кислот, ферментов и ряда других функционально необходимых биомолекул. Растения являются, пожалуй, единственной группой высших организмов (многоклеточных организмов с дифференцировкой на отдельные органы и ткани) способных усваивать минеральные соединения азота, синтезируя органические. Чаще всего азот, как и другие необходимые растению минеральные элементы в достаточном количестве для оптимального роста и развития, находятся в почве, хотя общее их содержание в ней относительно невелико. Для успешного произрастания в таких условиях растения развили специализированные системы поглощения питательных веществ (мембранные транспортные системы).

Еще в 1952 г. Эпстейн и Хаген предложили концепцию связанных с мембраной транспортеров или переносчиков. Данная гипотеза была выдвинута из аналогии зависимостей скорости реакции катализируемой ферментами от концентрации субстрата и потока иона через плазмалемму от его содержания в среде (скорость поглощения иона корневой системой возрастает с увеличением концентрации иона до момента насыщения). В соответствии с этим была высказана мысль о наличии в мембранах транспортеров (интегральные мембранные белки, характеризующиеся высоким сродством к определенным ионам). Основываясь на этом Эпстейн предположил, что взаимодействие переносчика с ионом можно описать как и взаимодействие фермента с субстратом уравнением Михаэлиса-Ментен [1].

Действительно в последующих работах Эпстейна и других было показано, что поглощение большинства ионов, включая NH_4^+ и NO_3^- , можно описать при помощи модели Михаэлиса-Ментен [2, 3, 4]. Данная модель описывает кинетику поступления NH_4^+ и NO_3^- в пределах концентраций 10^{-4} – $2 \cdot 10^{-4}$ М [5]. При высоких внешних концентрациях использование данной модели для описания транспорта ионов через плазмалемму растительной клетки не адекватно наблюдаемым явлениям. По-видимому, это может быть связано с работой нескольких транспортных систем ионов. К примеру, для NO_3^- в корнях растений идентифицировано 3 транспортные системы, функционирующие в пределах концентраций 0 – 10^{-3} М. Для первых двух систем (I, II) характерно наличие насыщения, перенос ионов через третье (III) линейно зависит от концентрации. Транспортные системы II и III объединены под одним названием – низкоаффинная транспортная система (LATS), которая работает при высоком содержании нитрат-иона в среде. При достаточно низких внешних концентрациях NO_3^- (10^{-6} – 10^{-4} М) включается первая транспортная система, получившая название HATS (высоко аффинная) [5, 6]. Транспорт ионов аммония в корнях растений определяется работой двух транспортных систем, которые по аналогии с транспортом нитрат-ионов называются LATS и HATS, активация каждой из систем так же зависит от концентрации NH_4^+ во внешнем растворе [5, 7].

Кроме того, была предложена альтернативная точка зрения [8], согласно которой многофазная природа поглощения ионов аммония и нитрат ионов определяется одной транспортной системой, для которой характерен концентрационно зависимый фазовый переход. Однако, последующие работы по клонированию генов *NATS*, *LATS* показали несостоятельность данной гипотезы [5].

Белки переносчики ионов аммония были выделены и охарактеризованы сначала для микроорганизмов, а затем для растений. Для белка Amt B – аммонийный транспортер *E. coli* впервые была сделана полная кристаллограмма структуры белка [9]. Однако остается невыясненным механизм регуляции активности транспортной системы ионов аммония (ТСА) у растений, поскольку скорость поступления элементов минерального питания должна зависеть не только от наличия их в почве, но и от потребностей организма. Действительно, было продемонстрировано, что скорость транспорта аммония через плазмалемму зависит от интенсивности роста растения и стадии его развития [10].

Регуляция обменных процессов у высших растений может осуществляться на разных иерархических уровнях – субклеточном, клеточном, тканевом, организменном. Имеющиеся экспериментальные данные не позволяют вполне определенно ответить на вопрос, какой же из указанных уровней регуляции является определяющим работу транспортной системы аммония плазмалеммы растительной клетки. В связи с этим нами предпринято исследование закономерностей поступления аммония в двух модельных системах: проростках кукурузы и клетках суспензионной культуры сирени.

Объекты и методы исследования

Для изучения физиологических и биохимических процессов поступления и ассимиляции веществ, чаще всего используют проростки различных растений. В такой модельной системе должны функционировать механизмы регуляции субклеточного, клеточного, тканевого и организменного уровней. Поэтому регуляция поглощения и ассимиляции NH_4^+ проростками растений не всегда однозначна, что связано со сложной морфологией корня, клеточной специализацией, различной физиологической ролью корня и стебля. Использование суспензионной культуры клеток высшего растения позволяет получить весьма удачную модель, где не функционируют механизмы тканевой и организменной регуляции и которая имеет ряд преимуществ для подобного рода исследований по сравнению с проростками одноклеточными водорослей. Суспензионная культура клеток характеризуется практически однородной популяцией не дифференцированных клеток. Вряд ли такие клетки могут рассматриваться как отдельный организм (что характерно для одноклеточных водорослей). Рост такой культуры обусловлен гетеротрофным питанием (как у клеток корней растений), но отсутствует дальний транспорт метаболитов. Однако, в суспензионных культурах можно осуществлять варьирование качественного и количественного состава элементов минерального питания (азотное голодание, выращивание на мочеvine или NO_3^- [11]).

В наших экспериментах объектами исследования служили десятидневные проростки кукурузы, а также суспензионная культура клеток *Syringa vulgaris*. Для выращивания проростков семена кукурузы (сорт Порумбень 270 Молдавской селекции) предварительно стерилизовали слабым раствором KMnO_4 и 3% раствором перекиси водорода в течение 10 мин. Затем семена помещали в чашки Петри, на фильтровальную бумагу, смоченную 0,3% раствором H_2O_2 , и проращивали трое суток в темноте при 24°C. Проросшие семена, культивировали рулонным методом десять дней в водных культурах. Растения делились на три группы: первая – растения, выращенные на питательной среде Кнопа [12], вторая – растения, выращенные на модифицированной среде Кнопа, где нитратный азот был заменен

на аммонийный, третья – растения, выращенные на питательной среде Кнопа без азота (условиях азотного голодания).

Суспензионную культуру клеток *Syringa vulgaris* (сорт Жемчужина) белорусской селекции стеблевого происхождения две недели культивировали на питательной среде содержащей минеральную основу среды Мурасиге и Скуга (MS) [13] (в том числе NO_3^- – $4 \cdot 10^{-2}$ М, NH_4^+ – $2 \cdot 10^{-2}$ М) с добавлением 3 мг/л 3-индолилуксусной кислоты, 0,2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 0,04 мг/л кинетина, 1 мг/л тиамина, 30 г/л сахарозы (среда выращивания). В дальнейшем часть клеток *Syringa vulgaris* продолжали культивировать на вышеуказанной питательной среде. Для создания условий азотного голодания 50 мл суспензионной культуры вносили в среду выращивания аналогичную приведенной выше, но не содержащую соединений азота. В третьем варианте суспензию клеток сирени выращивали на среде MS, где аммонийный азот был полностью заменен на нитратный ($[\text{KNO}_3]$ – $4 \cdot 10^{-2}$ М). Отметим, что суспензию культуры клеток сирени, лишенную источника минерального азота, культивировали в течение 5 суток в условиях термостата в темноте при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$, а клетки *Syringa vulgaris*, в питательной среде которых содержался или нитратный и/или аммонийный азот в течение 14 суток при аналогичных условиях. По окончании культивирования, перед началом эксперимента культуру клеток трехкратно отмывали равными объемами 2%-го раствора сахарозы.

Поступление ионов аммония в корни кукурузы и клетки *Syringa vulgaris* определялось по убыли ионов аммония из стандартных сред: для проростков кукурузы – 10^{-4} М раствор хлорида аммония, а для суспензионной культуры – 2% раствор сахарозы (для поддержания осмотического давления раствора при инкубации клеток), содержащий хлорид аммония. Для определения содержания аммония в пробах сред использовался фенол-индофеноловый метод. Данный способ определения аммонийного азота основан на реакции аммиака в щелочном растворе с избытком гипохлорита натрия, с образованием монохлорамина, который в присутствии фенола и иона нитропрусида дает индофеноловый голубой. По интенсивности поглощения света с длиной волны 630 нм определяется концентрация аммиака.

Процедура исследований заключалась в отборе проб экспериментальной среды по 5 мл через определенные промежутки времени. Параллельно с измерением содержания аммония в среде проводился контроль величины pH последней с помощью pH-метра.

В результате устанавливалась динамика изменения содержания аммония в экспериментальных средах в каждом из вариантов. Для определения нетто потока ионов аммония внутрь корней или клеток суспензионной культуры оценивалась убыль молярного содержания NH_4^+ из среды за минуту отнесенная к сухой массе корней или клеток.

Результаты и обсуждение

Исследование динамики изменения содержания аммонийного азота в экспериментальной среде, в которой находились проростки кукурузы, продемонстрировало различные результаты при использовании растений, выращенных при варьировании количественного и качественного состава источников минерального азота. Так при использовании проростков кукурузы, выращенных на питательной среде, в состав которой входил хлорид аммония, как источнике минерального азота, в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М, не отмечалось заметного снижения концентрации аммония в экспериментальной среде, в которой находились корни растений, даже после 2 ч периода инкубации (Рис. 1).

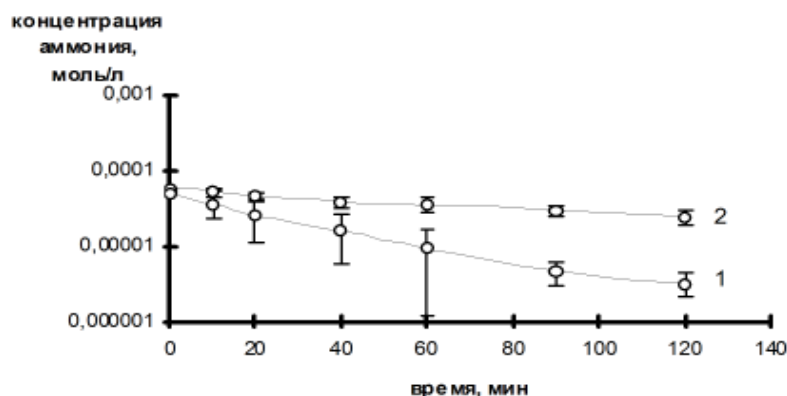


Рисунок 1 – Изменения содержания аммония в экспериментальных средах с проростками кукурузы, выращенных в условиях азотного голодания (1), и на питательной среде с аммонийным азотом (2)

В тоже время помещение проростков кукурузы, выращенных в условиях азотного голодания или на питательной среде Кнопа, где в качестве источника азота присутствовала соль азотной кислоты – кальций азотнокислый ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), в экспериментальную среду вызывало постепенное снижение концентрации аммония в ней. При этом наиболее значительное уменьшение содержания аммония в среде происходило в течение первых 10-30 мин (рис. 1, рис. 2).

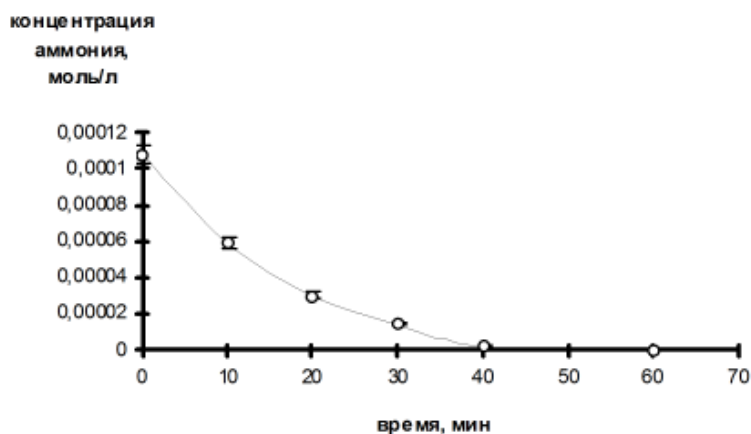


Рисунок 2 – Динамика изменения содержания аммония в экспериментальной среде с проростками кукурузы, выращенными на питательной среде с нитратным азотом

Таким образом, растения, выращенные в условиях азотного голодания или на нитратном азоте, способны интенсивно поглощать ионы аммония из среды. Причем наиболее мощные потоки ионов аммония в клетки корней кукурузы характерны для проростков, выращенных на питательной среде Кнопа. Следует отметить, что в этом случае отмечалось снижение концентрации NH_4^+ в экспериментальной среде до очень низких уровней (ниже, чем 10^{-7} М), т. е. растения были способны извлекать аммонийный азот из крайне разбавленных растворов, и по истечению 1 ч экспозиции наличия NH_4^+ в среде не регистрировалось.

Для растений, выращенных в условиях азотного голодания, скорость транспорта NH_4^+ в клетки корней была примерно в 2 раза ниже, чем у растений, росших на нитратном азоте. Очевидно, недостаток азота в организме растения приводит к снижению процессов биосинтеза белков, в том числе и белков-транспортёров ионов аммония. Аналогичные результаты были получены нами и на проростках ячменя [14]. Следует отметить, что по морфологическим признакам растения трех вариантов значительно различались, так у проростков, выращенных в условиях азотного голодания листовая пластинка и объем корней были меньше, чем у растений, в питательной среде которых присутствовал азот. Кроме того, после 10 суток культивирования у проростков кукурузы лишенных источника азота наблюдалось пожелтение листьев и угнетение роста.

Полученные результаты полностью согласуются с точкой зрения, согласно которой рост растений в условиях азотного голодания, недостатка минерального азота или при обеспечении лишь окисленными формами азота способствует активации транспортной системы аммония, а присутствие в питательной среде значительного количества восстановленных форм азота (ионы аммония) приводит к инактивации ТСА. Таким образом, активирование и инактивирование транспортной системы ионов аммония зависит от условий произрастания, а именно от качественного и количественного состава минеральных источников азотного питания растений. Однако в этом случае не вполне ясны механизмы регуляции ТСА клеток корней: не исключается как системы регуляции, функционирующие на организменном уровне (например, гормональная), так и локальная внутриклеточная регуляция. Эксперименты, проведенные на клетках микроводорослей [14] на первый взгляд указывают на приоритет второго варианта, но с другой стороны каждая клетка водоросли – это целый организм, со всеми системами регуляции. В связи с этим дальнейшие исследования проводились с использованием недифференцированных клеток высшего растения *Syringa vulgaris*.

Как и растения кукурузы, так и культура клеток сирени, выращенные в условиях обеспечения аммонийным азотом практически не поглощали NH_4^+ из экспериментальной среды: даже по истечению 3 часов инкубации клеток суспензионной культуры *Syringa vulgaris* содержание аммония в среде отличалось от первоначального не более чем на 30% (рис. 3).

Клетки же суспензионной культуры сирени, выращенные при наличии в среде культивирования только солей нитратов, поглощали аммонийный азот на протяжении всего эксперимента и по истечению 2 ч инкубирования в экспериментальной среде аммонийный азот практически не регистрировался.

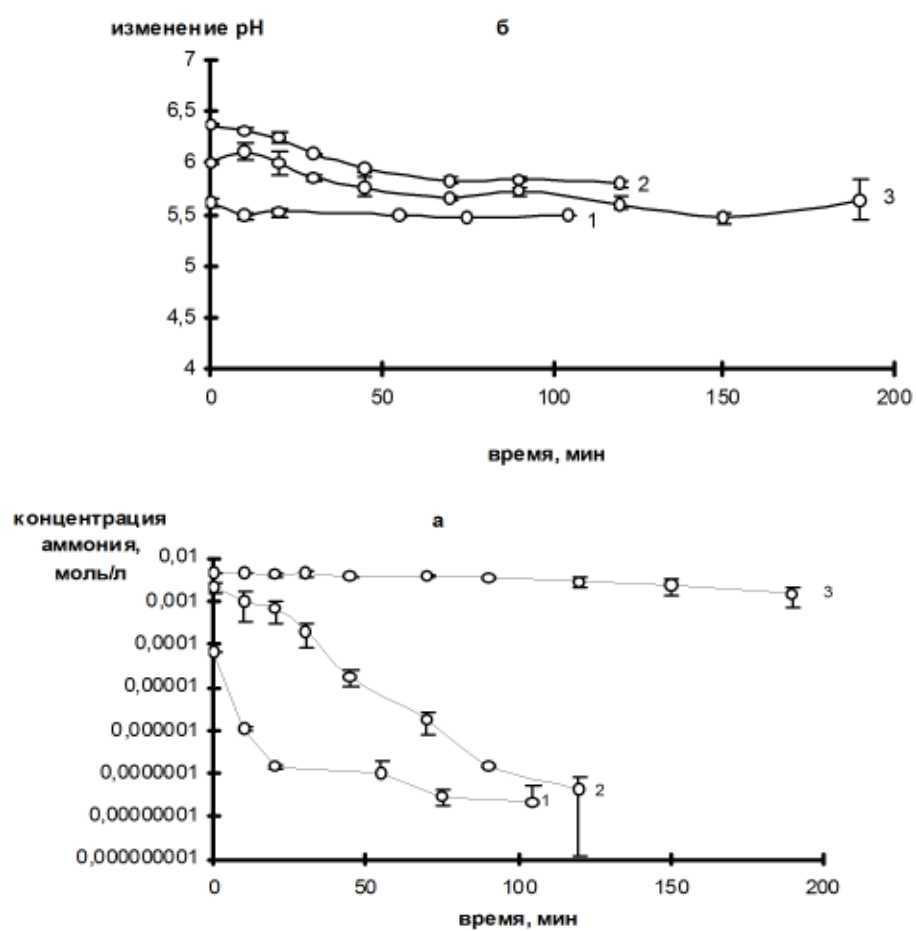


Рисунок 3 – Изменения концентраций аммония (а) и pH (б) в экспериментальных средах содержащих суспензионную культуру клеток *Syringa vulgaris*, прединкубированных в условиях азотного голодания (1) и в питательных средах с нитратом калия (2) и стандартной Мурасиге-Скуга (3), содержащей аммонийный и нитратный азот

Для клеток, выращенных в условиях азотного голодания, была характерна высокая начальная скорость транспорта NH_4^+ , однако по истечению 20 минут наступила фаза насыщения, и ионы аммония далее слабо поглощались клетками суспензионной культуры *Syringa vulgaris*. Вероятно, несовпадение скоростей транспорта ионов аммония в клетки суспензионных культур, выращенных в условиях азотного голодания и на нитратном азоте, можно объяснить теми же причинами, на которые мы указывали при обсуждении результатов экспериментов с проростками кукурузы.

По данным Ванга [15] скорость транспорта ионов аммония в корни риса в значительной степени зависит от pH внешнего раствора. Следует отметить, что в процессе определение скорости поглощения ионов аммония клетками суспензионной культуры *Syringa vulgaris* проводилось измерение величины pH экспериментального раствора. При этом не было отмечено заметных сдвигов показателя кислотности при инкубации клеток (см. Рис. 3). Таким образом, как существенные различия в скорости поглощения аммония клетками *Syringa vulgaris* в вариантах эксперимента, так и изменения потоков аммония в процессе инкубации не являются следствием сдвига pH экспериментальных растворов. Наблюдаемое незначительное подкисление среды в процессах инкубации клеток может быть связано как с дыханием последних, так и с активностью H^+ -АТФазы плазмалеммы. Упомянутые процессы способствуют снижению pH среды, а их интенсивность зависит от разных причин и может различаться у клеток, выращенных при варьировании качественного и количественного состава источников минерального азота.

Важно отметить, что и при использовании недифференцированных клеток растений отмечается ингибирование работы ТСА в случае культивирования их на аммонийном азоте, подобное явление, скорее всего, связано с высокой внутриклеточной концентрацией ингибитора работы ТСА, который синтезируется в клетках в процессах первичной ассимиляции экзогенного аммонийного азота.

Заключение

Системы ингибирования активности транспортной системы аммония плазмалеммы растительной клетки функционируют в растениях локально, а не связаны во едином. Вероятно, в каждой отдельной клетке работа транспортной системы аммония находится под жестким метаболическим контролем, а ее активация и инактивация определяется наличием, отсутствием или концентрацией каких-то эндогенных агентов в цитоплазме. Не исключено, что в качестве таких агентов могут выступать продукты первичной ассимиляции аммонийного азота. В то же время представленные результаты указывают на определенную зависимость интенсивности транспорта аммония от общего уровня процессов азотного обмена в растениях и их клетках. Однако эта зависимость не только не отрицает, но и в

определенной мере подтверждает наши предположения о роли эндогенного агента и связи последнего с процессами азотного обмена.

Литература

1. Epstein, E.A Kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots / E. Epstein, C.E. Hagen // Plant physiology. – 1952. – Vol. 27, № 3. – P. 457–474.
2. Fried, M. Mulytipile site uptake of individual cations by roots as affected by hydrogen ion / M. Fried, J.C. Noggle // Plant physiology. – 1957. – Vol. 33, № 2. – P. 139–144.
3. Wang, M.Y. Ammonium Uptake by Rice Roots (III. Electrophysiology) / M.Y. Wang [et. all] // Plant physiology. – 1994. – Vol. 104, № 3. – P. 899–906.
4. Laine, P. Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: effects of low temperatures or previous nitrate starvation / P. Laine [et. all] // Physiologia Plantarum. – 1993. – Vol. 88, № 1. – P. 85–92.
5. Bassirirad, H. Kinetics of nutrient uptake by roots: responses to global change / H. Bassirirad // New phytologist. – 2000. – Vol. 147, № 1. – P. 155–169.
6. Malagoli, P. Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data / P. Malagoli [et. all] // Plant physiology. – 2004. – Vol. 134, № 1. – P. 388–400.
7. Kronzucker, H.J. Kinetics of NH_4^+ influx in spruce / H.J. Kronzucker, M.Y. Siddiqi, A.D.M. Glass // Plant physiology. – 2004. – Vol. 110, № 3. – P. 773–779.
8. Nissen, P. 'Multimodal' kinetics: cyanobacterial nitrate reductase and other enzyme, transport and binding system / P. Nissen, M.J. Nieto // Physiologia plantarum. – 1998. – Vol. 104, № 3. – P. 503–511.
9. Nygaard, T. Ammonium recruitment and ammonia transport by *E. coli* ammonia channel AmtB. / T. Nygaard [et. all] // J. Biophysical. – 2006. – Vol. 91, № 12. – P. 4401–4412.
10. Imsande, J. N demand and the regulation of nitrate uptake / J. Imsande, B. Touraine // Plant physiology. – 1994. – Vol. 105, № 1. – P. 3–7.
11. Zhang, N. Nitrate use by tobacco cells in response to N-stress and ammonium nutrition / N. Zhang, C.T. MacKown // Plant cell reports. – 2004. – Vol. 11, № 9. – P. 470–475.
12. Чернавина, И.А. Большой практикум по физиологии растений / И.А Чернавина [и др.]; под ред. Б.А. Рубина. – М., 1978. – С. 13–105.
13. Murasshige, T. A revised medium for rapid growth and assay with tobacco tissue cultures / T. Murasshige, F. Skoog // Physiological plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
14. Цап, Т.В. Поступление ионов аммония внутрь растительных клеток / Т.В Цап, А.П. Кудряшов // Вестник могилевского государственного университета продовольствия. – 2007. – № 2 (3). – P. 117–123.
15. Wang, M.Y. Ammonium uptake by rice roots II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ influx across the plasmalemma / M.Y. Wang [et. all] // Plant physiology. – 1993. – Vol. 103, № 4. – P. 1259–1267.

THE PATTERN OF ION AMMONIUM UPTAKE INTO ZEA MAYS SEEDLING ROOTS AND SYRINGA VULGARIS SUSPENSION CULTURE CELLS IN RESPONSE TO VARIOUS QUANTITY AND QUALITY OF NITROGEN SOURCE

T.V. Tsap, M.P. Shapchits, A.P. Kudryashov
Belarusian State University, Minsk, Belarus

The processes of ammonium uptake by *Zea mays* and *Syringa vulgaris* suspension culture cells, which were cultured with media containing different nitrogen sources or with media without

any nitrogen, were studied. It was shown, that inhibitors of ammonium transport system work locally but not strong connected in organism system. Possibly, the work of ammonium transport system in a cell is strongly metabolically controlled and its activation depends on presence and concentration of some endogenous agents in cytoplasm.