

Г. Т. КАЗАРЯН, Г. Н. ХАЧАТРЯН, Г. А. ПАНОСЯН

ВЛИЯНИЕ pH СРЕДЫ И ПРОТОНОФОРА ДИЦИКЛОГЕКСИЛ- КАРБОДНИМИДА (ДССД) НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК КОРЕШКОВ КУКУРУЗЫ

Показано, что существует определенная зависимость мембранного потенциала от градиента pH среды. Изменение мембранного потенциала при действии протонифора ДССД позволяет предположить существование протонного насоса, локализованного в мембране клеток высших растений.

В последние годы появились работы [1—5], посвященные изучению влияния индукторов транспорта протона, таких как 2,4-ДНФ, дициклогексилкарбоднимид (ДССД) и другие, на мембранный транспорт и генерацию электрического потенциала. В большинстве случаев действие этих веществ на мембранный потенциал и транспорт H^+ объясняется подавлением активных транспортных систем в результате разобщения окислительного фосфорилирования.

При действии протонифоров на интактные клетки специфическое повышение проводимости для H^+ должно сопровождаться изменением мембранного потенциала и перераспределением H^+ . Ряд авторов [6—10] развивает представление, согласно которому на плазматической мембране локализована зависящая от АТФ система электрогенного выведения H^+ из клетки в среду, обеспечивающая поддержание мембранного потенциала.

В связи с этим представляет интерес выяснение вопроса о том, зависит ли мембранный потенциал клеток корешков кукурузы от градиента pH и присутствия в перфузате ингибитора протонного насоса ДССД.

Материал и методика. Объектом исследования служили 3-дневные корешки кукурузы. Семена замачивали в воде в течение 24 час. и ставили на проращивание в термостат при 24—26°.

Мембранный потенциал (МП) отводили при помощи стеклянных микроэлектродов, заполненных 3М раствором KCl. Электрометрическим усилителем служил pH-метр марки «рН 340», а электродом сравнения—хлорсеребряный электрод заводского изготовления марки «ЭВЛ-1М3». Контрольные значения МП регистрировали в 1 мМ растворе KCl. Для проверки стабильности работы всей установки микроэлектрод вводили в клетку на определенную глубину (400—500 мк) и МП регистрировали в течение 60 мин.

В экспериментах использовали растворы pH от 1 до 9. Кислый pH (от 1 до 5) получали при помощи 0,1 HCl, приготовленного на 1 мМ растворе KCl. Для получения щелочных значений pH (от 6 до 9) использовали трис-HCl буфер. Полученные растворы контролировались на pH-метре марки «рН 340».

От корешка отрезали сегмент длиной 20—25 мм и помещали в раствор с определенным рН на 30 мин. После инкубации сегмент переносили в перфузионную камеру и регистрировали величину МП.

Концентрация ДССД, приготовленного на 1 мМ КСl, в перфузионной камере составляла 8×10^{-4} М.

Результаты и обсуждение. Приведенные на рис. 1 данные показывают, что существует определенная зависимость МП клеток корешков от градиента рН среды: наименьший потенциал регистрировали при рН 1 (около 20 мв), наибольший—при рН 5 (около 80 мв). При рН 9 МП падает до 60 мв.

Масловски и Комошински [11] исследовали активность АТФазы, выделенной из корней кукурузы, в зависимости от рН среды (от рН 4 до 9), и показали, что максимум активности АТФазы проявляется при

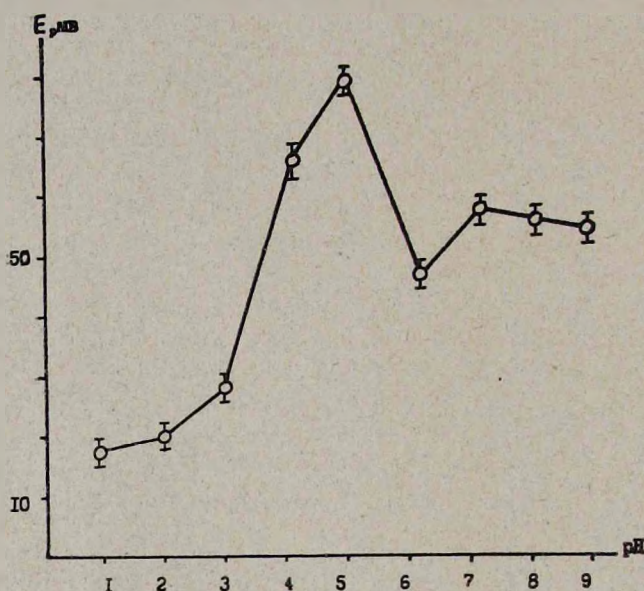


Рис. 1. Зависимость МП клеток корешков от рН среды.

рН 5—7. С дальнейшим увеличением рН активность АТФазы резко падает.

Данные ряда работ указывают на возможное существование электрогенного Н-насоса в клетках растений [2, 8]. В связи с этим совпадение рН-оптимумов и АТФазной активности может явиться дополнительным косвенным доказательством в пользу наличия в мембранах растительных клеток Н-стимулируемого электрогенного насоса.

В связи с предположением о существовании протонного насоса в клетках высших растений представляло определенный интерес исследование влияния протонофора ДССД на МП клеток корешков кукурузы.

На рис. 2 приведены результаты, показывающие, что при действии ДССД МП во времени по абсолютной величине уменьшается; деполя-

ризация, развивающаяся за 10 мин, достигает 70 мв. Такое снижение МП говорит о том, что в клетках корешков функционирует довольно мощная протонная помпа.

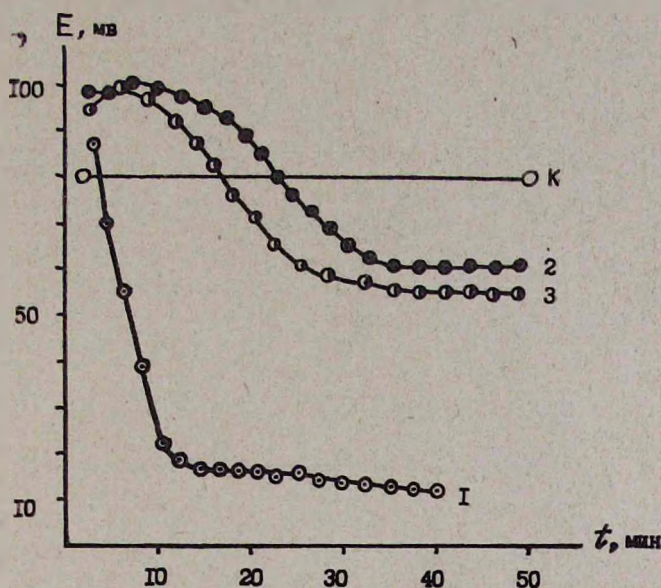


Рис. 2. Влияние инкубации в растворах ДССД, красителя ЗС и ДССД+ЗС на МП клеток корешков. К—контроль; 1—ДССД, 8×10^{-4} М раствор; 2—краситель ЗС, 10^{-4} % раствор; 3—ДССД+краситель.

Для доказательства того, что полученный эффект обусловлен ДССД, но не спиртом, на котором готовятся растворы ДССД, был поставлен следующий эксперимент. Были приготовлены растворы с ДССД и без него (концентрация спирта одинакова в обоих растворах и равна 0,017%) и раствор (без ДССД), в котором концентрация спирта составляла 1%. Результаты, приведенные на рис. 3, показывают, что регистрируемый эффект полностью зависит от присутствия протонофора.

В полевых и лабораторных экспериментах довольно подробно исследовалось влияние красителя зеленого светлого (ЗС) на рост и развитие ряда сельскохозяйственных растений и величину МП клеток coleoptiles и корешков. Показано, что 10^{-4} % раствор красителя, оказывающий стимулирующий эффект на рост растений, увеличивает и МП (рис. 2, кр. 2). Гиперполяризация, развивающаяся с первых минут измерения и равная 15—20 мв, сохраняется до 12—16 мин (в различных экспериментах), а затем начинает снижаться.

Было сделано предположение, что концентрации красителей, оказывающие стимулирующий эффект на рост растений и вызывающие гиперполяризацию клеток, активируют работу электрогенного насоса. Исходя из этого, было интересно исследовать влияние ДССД на МП

клеток в присутствии $10^{-4}\%$ раствора красителя ЗС. Результаты, приведенные на рис. 2 (кр. 3), показывают, что краситель снимает эффект ДССД; ход кривых 2 и 3 почти совпадает.

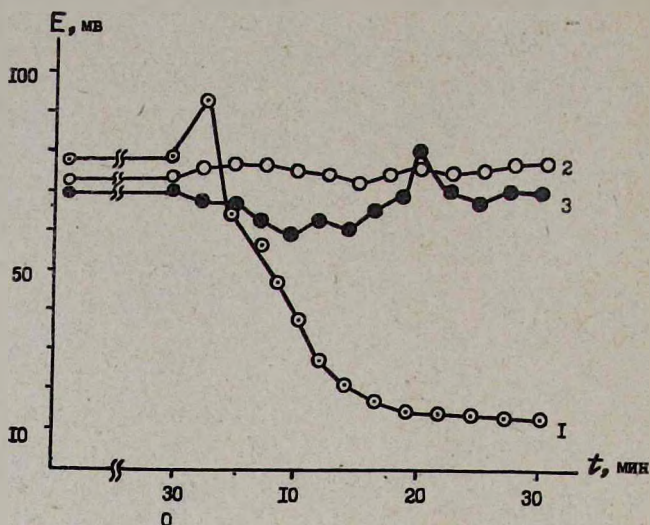


Рис. 3. Влияние ДССД и различных концентраций спирта на МП клеток корешков. К—контроль; 1—ДССД, 8×10^{-4} М раствор; 2—0,017% раствор спирта (концентрация спирта в 8×10^{-4} М растворе ДССД); 3—1,0% раствор спирта.

На основании проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы. Изменение МП под действием протонифора ДССД свидетельствует о наличии протонного насоса в клетках высших растений; изменение рН наружного раствора вызывает изменение МП, что, возможно, связано с изменением активности протон-транспортирующей АТФазной системы.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 12.VIII 1977 г.

Հ. Տ. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Գ. Ն. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՄԻՋԱՎԱՅՐԻ թН-ի եվ ԴԻՑԻԿԼՈՂԵՔՄԻԿԱՐՐՈՂԻՄԻԴԻ
(ԴՏՏԴ) ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵԳԻՊՏԱՑՈՐԵՆԻ ԱՐՄԱՏԱՅԻՆ
ԲՋԻՋՆԵՐԻ ՄԵՄԲՐԱՆԱՅԻՆ ՊՈՏԵՆՑԻԱԼԻ ՎՐԱ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ գոյություն ունի որոշակի կախվածություն մեմբրանային պոտենցիալի և միջավայրի թН-ի զրադիենտի միջև: ԴՏՏԴ-ի ազդեցությամբ մեմբրանային պոտենցիալի փոփոխությունը հնարավորություն է տալիս ենթադրելու ջրածնային պոմպի գոյության մասին, որը գտնվում է բարձրակարգ բույսերի, բջիջների մեմբրանում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Андрианов В. К., Булычев А. А., Курелла Г. А., Литвин Ф. Ф. Биофизика, 16, 1031, 1971.
2. Лялин О. О., Ктиторова И. Н. Физиол. раст., 23, 305, 1976.
3. Spanswick R. H. Membr. biol., 2, 59, 1970.
4. Vredenberg W. In Ion transport in plant. (W. Anderson ed.), 153, London, Acad. Press, 1973.
5. Скулачев В. П. Преобразование энергии в биемембранах. М., 1973.
6. Mitchell P. Chemi-osmotic coupling and energy transduction. Glynn Research, Bodmin Cornwall, London, 1968.
7. Lüttge U., Pitman M. Transp. Plant. 2, A, Cells., 251—259, Berlin e. a., 1976.
8. Slayman C. Biophys. J., 15, 9, 968—971, 1975.
9. Higinbotham N. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 25—46, 1973.
10. Helmy A. K., Peinemann N., Perretro E. A. Plant and Soil, 40, 2, 253—259, 1974.
11. Richards Y. L., Hope A. B. J. Membrane Biol., 16, 2, 124—144, 1974.
12. Maslowski P., Komoszynski M. Phytochemistry, 13, 1, 89—92, 1974.