

## АММОНИЙНЫЙ ФАКТОР В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

© А. П. Смолов,<sup>1</sup> В. К. Опанасенко

Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московская обл.;

<sup>1</sup> электронный адрес: star49@mail.ru

В представленном обзоре оценивается роль аммонийного фактора, не связанная с синтезом азотсодержащих соединений растительной клетки. Обсуждается, в частности, влияние свободного аммония на морфологические изменения поверхностных клеток корня, влияние этого компонента питательной среды на гетеротрофную фиксацию CO<sub>2</sub>, на светозависимое и темновое восстановление нитрата в растительных клетках, на формирование белоксинтезирующих органелл клетки и участие аммония в функционировании мембранных систем фотосинтезирующих органелл клетки. Собственный экспериментальный материал и результаты, полученные другими авторами, позволяют шире взглянуть на роль аммония в жизнедеятельности растительной клетки и не рассматривать его единственно как субстрат в процессах аминирования кетокислот.

Ключевые слова: аммоний, растительная клетка.

Нитрат и аммоний являются основными потребляемыми формами азота, без которого невозможны рост и функционирование фотосинтезирующих и нефотосинтезирующих клеток растений. Существуют некоторые виды фототрофных организмов, способных утилизировать свободный атмосферный азот, — бобовые, ольховые растения, сине-зеленые водоросли. Тем не менее и у них образование первых азотсодержащих органических соединений начинается только после превращения свободной формы азота в восстановленную (аммоний), т. е. происходит процесс ассимиляции аммония.

Процесс восстановления обязателен и при утилизации клеткой окисленной формы минерального азота (нитрата). Существует несколько путей «внедрения» неорганического азота в структуру органических молекул. Для этого у растительной клетки формируется и функционирует целый ряд ферментных систем, ассимилирующих азот, которые локализованы главным образом в цитоплазматическом компартменте клетки или в специализированных структурах (Измайлов, 1986).

Например, превращение свободного азота в аммоний у N<sub>2</sub>-фиксирующих объектов происходит в клубеньковых образованиях корней (или гетероцистах — в случае с сине-зелеными водорослями), и лишь затем образованная форма восстановленного азота транспортируется в клетки растения-хозяина. Окисленная форма минерального азота (нитрат) непосредственно поступает в содержимое фототрофной или гетеротрофной клетки, где и восстанавливается до аммония. Показано, что фотосинтезирующие органеллы — хлоропласты — также способны восстанавливать нитрат до аммония (Демидов и др., 1986), и это указывает на участие фотосинтезирующих структур в ассимиляции минерального азота. Поглощенный извне или образованный тем или иным путем эндогенный аммоний используется в дальнейшем для синтеза аминокислот (ре-

акции аминирования кетокислот) — первых азотсодержащих органических компонентов клетки.

Следовательно, ион аммония можно считать одним из субстратов при синтезе органических азотсодержащих соединений. Субстратная функция аммония, а точнее, его метаболическая утилизация, достаточно хорошо изучена (Измайлов, 1986; Кретович, 1987).

Однако к настоящему времени обнаружены и подтверждены в экспериментах данные по влиянию аммония на те или иные реакции растительной клетки, которые не могут быть объяснены его субстратной функцией.

Наиболее очевидным можно считать факт изменения архитектуры корневой системы растения — когда под действием аммония происходит увеличение количества корневых волосков во всасывающей зоне корня (Mahmood et al., 2002; Bloom et al., 2006; Boukcim et al., 2006). Такие морфологические изменения дают основание полагать, что воздействие аммония затрагивает механизм формообразования клеток корня, возможно через изменение соотношения «упругих» и «пластичных» компонентов клеточной стенки — целлюлозы, гемицеллюлозы и пектиновых веществ. Так, работая с каллусной культурой клеток *Silene vulgaris*, авторы (Gunter, Ovodov, 2005) пришли к выводу о том, что продукция силенана (пектинового компонента клеточной стенки) существенно увеличивалась, если в состав среды входили обе формы минерального азота в соотношении NH<sub>4</sub><sup>+</sup> : NO<sub>3</sub><sup>-</sup> как 1 : 1 или 1 : 2.

Вероятно, такие изменения химического состава клеточной стенки могут приводить к большей эластичности (или «разрыхлению») оболочки, а увеличение массы внутреннего содержимого клетки, вследствие продолжающегося роста, будет вызывать изменение формы поверхностной эпидермальной клетки корня в свободную от окружающих клеток сторону (появление корневых волосков). При достаточной обеспеченности клеток другими

необходимыми элементами питания увеличение всасывающей поверхности корня, естественно, может приводить и к увеличению накопления общей биомассы растительного объекта.

По-видимому, вследствие участия корневой системы растения в метаболизации минеральных азотных соединений и влияния аммонийного компонента на структуру (или свойства) поглощающей системы растения, логика исследования «несубстратного» влияния аммония на процессы жизнедеятельности растительной клетки шла по пути использования более простых по организации растительных объектов — культур клеток *in vitro*.

Установлено, что при добавке аммонийного компонента к нитратсодержащей питательной среде происходит усиление ростовой функции клеток. Так, добавка аммония стимулировала рост клеточной суспензии *Atropa belladonna* (Salonen, Simola, 1989), приводила к увеличению скорости роста сухого и сырого веществ, объема и числа клеток *Paul's Scarlet Rose* (Mohanty, Fletcher, 1978) и др.

Существует достаточно распространенное мнение о том, что эффект усиления ростовой функции клеток при использовании ими аммонийной подкормки связан со снижением энергозатрат клетки на восстановление нитрата. Энергия, не израсходованная на восстановление нитрата, может использоваться на ассимиляцию углекислоты и синтез других органических компонентов клетки, что в дальнейшем и приводит к увеличению общей биомассы растительного объекта. Однако заметим (см. выше), что на примере увеличения числа корневых волосков, т. е. увеличения поглощающей поверхности корней, можно предположить и другой вариант интерпретации повышения ростовой активности под действием аммония.

Следует сказать, что эффект усиления активности ростового процесса наблюдается только при определенных пропорциях окисленной и восстановленной форм минерального азота в среде. Отклонение от этих соотношений в ту или другую сторону приводит к подавлению ростовой функции вплоть до гибели клеток, если аммоний является единственным источником азота в питательной среде.

В клетках растения *Capsicum annuum* использование аммония в качестве единственного источника азота приводило к повреждению структуры фотосинтезирующих органелл — увеличению межтилакоидного пространства в гранах и разбуханию тилакоидов (Edit, Laszlo, 1992).

Для клеток гриба *Aspergillus nidulans* установлено (Martinelli et al., 1988), что токсическое действие аммония наблюдалось лишь при мутации в определенном гене (*su-aC*) и ассоциировалось с неправильным чтением кода во время белкового синтеза, что приводило к изменениям самих рибосомальных белков.

Исследования динамики поглощения нитратного и аммонийного компонентов питательной среды показывают, что скорости их поступления в клетки *in vitro* по-разному меняются в течение ростового периода (пассажа). По-видимому, не случайно на ранней стадии ростового цикла клетки культуры *in vitro* поглощали в первую очередь экзогенный аммоний, и лишь к началу линейной стадии ростового цикла, параллельно с ионами  $\text{NH}_4^+$ , начинал поступать экзогенный нитрат (Campbell et al., 1984).

Электронно-микроскопические исследования показали, что уже в лаг-фазе роста клеток культуры моркови, сахарной свеклы, табака и гаглопаппуса начиналось зна-

Таблица 1

Количество белка и число рибосом в клетках миксотрофного каллуса сои, выращенного на питательной среде (МС) с различным содержанием аммония

Концентрация $\text{NH}_4^+$ , мМ	Белок, мг на 1 г сухой массы	Число рибосом на 1 мкм <sup>2</sup> площади среза
0.00	42 ± 9	56 ± 10
0.01	50 ± 8	304 ± 53
0.10	43 ± 4	209 ± 65
0.50	40 ± 10	300 ± 107
1.00	45 ± 8	342 ± 157
5.00	65 ± 11	352 ± 41
10.00	100 ± 9	314 ± 107
20.00	94 ± 12	351 ± 90

чительное увеличение числа рибосомальных и полисомальных структур (Кордюм и др., 1980).

Такая избирательность клетки в поглощении минерального азота может указывать на то, что  $\text{NH}_4^+$ -ион требуется для формирования структуры белоксинтезирующего аппарата (табл. 1) и, возможно, для активации одного из азотассимилирующих ферментов — нитратредуктазы (Leleu, Vuylsteker, 2004) или пептидилтрансферазы (Michelinaki et al., 1997).

Известно, что некоторые неорганические ионы (например,  $\text{Mg}^{2+}$ ) являются обязательными элементами при формировании и функционировании рибосомального комплекса (Спирин, Гаврилова, 1971). По-видимому, такая же роль принадлежит и аммонию. Считается, что для стабилизации рибосомального комплекса и проявления им каталитической активности помимо ионов  $\text{Mg}^{2+}$  требуются либо  $\text{NH}_4^+$ , либо  $\text{K}^+$ , поскольку в этой роли они «взаимозаменяемы» (Спирин, Гаврилова, 1971).

Проведенные нами эксперименты на каллусной культуре сои показали, что катион  $\text{NH}_4^+$  в большей степени, чем  $\text{K}^+$ , отвечает за процесс биосинтеза белка в клетке, тогда как  $\text{K}^+$  эффективно влиял главным образом на ростовой процесс каллусной массы (рис. 1). Полное отсутствие аммония в среде не может полностью остановить процесс формирования и функционирования рибосом (20—70 рибосом/мкм<sup>2</sup> и ~50 мг белка на 1 г сухой массы) (табл. 1). В этом случае регуляторную роль экзогенного аммония способен выполнять либо  $\text{K}^+$  (Спирин, Гаврилова, 1971), либо эндогенный  $\text{NH}_4^+$ , который может образовываться в клетке в результате восстановления поглощенного нитрата питательной среды как за счет восстанавливающих эквивалентов темнового дыхательного процесса, так и за счет восстановителя фотосинтетического происхождения.

В отдельных экспериментах (результаты не приведены) в начальной стадии линейной фазы роста клеток нам удалось обнаружить эндогенное содержание свободного аммония в клетках, выращенных на безаммонийной среде (около 20—50 мкг  $\text{NH}_4^+$  на 1 г сырой массы). Такое содержание эндогенного аммония соответствует 1—3 мМ концентрации  $\text{NH}_4^+$  в клетке, что вполне согласуется с результатом, который указывает на минимальное содержание белка в клеточной массе при этой концентрации аммония (табл. 1).

С другой стороны, если в клетках *Paul's Scarlet Rose* искусственно подавляли процесс биосинтеза белка цикло-

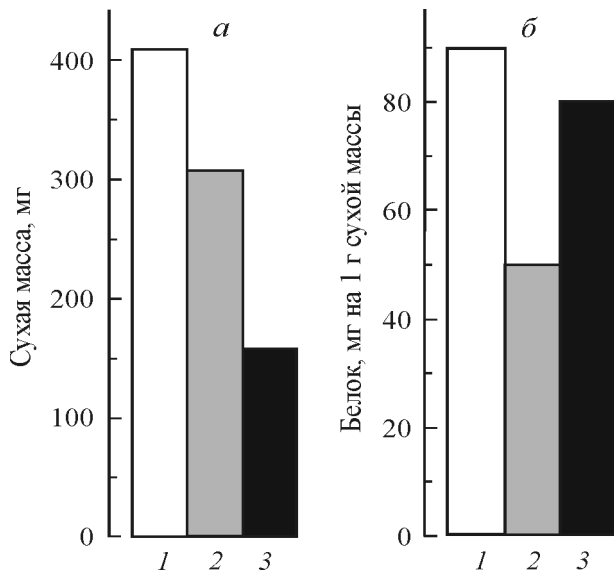


Рис. 1. Влияние  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{K}^+$  на накопление биомассы (а) и содержание белка (б) в клетках каллуса сои в конце пассажа.

1 — контроль ( $\text{NH}_4^+$  и  $\text{K}^+$  совместно), 2 — без  $\text{NH}_4^+$ , 3 — без  $\text{K}^+$ .

гесимидом или пурупацином, то уровень эндогенного  $\text{NH}_4^+$  и амидов существенно повышался за счет восстановления поступающего из среды  $\text{NO}_3^-$  (Bradford, Fletcher, 1982).

По-видимому, при отсутствии аммония в составе питательной среды (или его дефиците) образующаяся из поглощенного (или вакуолярного) нитрата восстановленная форма минерального азота в силу ее быстрой утилизации в аминокислоту недоступна для полноценного формирования рибосомного комплекса растительной клетки. В результате дефицита  $\text{NH}_4^+$  роль регулятора (или стабилизатора?) белоксинтезирующего комплекса частично способен выполнять  $\text{K}^+$  (Спирин, Гаврилова, 1971).

Данные табл. 1 показывают, что при всех испытанных концентрациях аммония в среде количество рибосомных частиц на единицу площади среза было значительно выше количества рибосом в клетках, выращенных на среде без экзогенного аммония. Следовательно, можно считать, что присутствие аммония в среде в концентрациях ниже «пороговой» (1 мМ) лишь способствует формированию белоксинтезирующих структур растительной клетки *in vitro*, т. е. выполняет «несубстратную» функцию. Допускаем, что при более высоких концентрациях аммония в среде (выше 1 мМ) в клетках усиливается синтез аминокислот и как следствие активизируется работа полностью сформированных рибосомных структур.

Заметим, что источником свободных катионов  $\text{NH}_4^+$  в клетках, выросших без экзогенного аммония, могут быть и катаболические процессы, связанные с распадом азотсодержащих компонентов (белки), и протекающие одновременно с анаболическими. По существующим оценкам (Тарчевский, 1993), скорость распада некоторых белковых молекул может быть весьма значительной, если судить по показателям удельной радиоактивности определявшихся белков.

Магистральный путь ассимиляции аммония растительной клеткой обусловлен реакциями аминирования органических кислот. Авторам (Behrend, Mateles, 1976), работавшим с клетками культуры *Nicotiana tabacum*, удалось наблюдать их рост на среде с аммонием в качестве единственного источника азота, но только при добавке в

среду ряда органических кислот. Сукцинат, например, не изменял скорость поступления аммония из среды в клетки, но влиял на его внутриклеточную концентрацию. Отмечается, что такие изменения все-таки не могут объяснить подавление ростовой функции клеток токсичностью аммония, скорее всего они вызваны недостатком углеродных скелетов для его ассимиляции.

С другой стороны, в присутствии аммония может наблюдаться и увеличение включения дополнительного количества углерода в органический материал растительной клетки через усиление аммонием гетеротрофной фиксации углекислоты. Эксперименты, проведенные на клетках *Acer pseudoplatanus*, показали, что поглощение экзогенного аммония (но не его ассимиляция, так как метионинсульфоксимин — ингибитор глутаминсинтетазы — не оказывал влияния на этот эффект) способствовало усилению гетеротрофной фиксации углекислоты и образованию органических кислот (Wright, Givan, 1988). Такой же эффект усиления проявлял и метиламин — препарат, не метаболизирующийся клеткой, что позволило авторам предположить механизм воздействия аммония по типу рН-стата, когда поглощенный аммоний (или метиламин) вызывает увеличение цитоплазматического рН (Marschner, 1986) и как следствие этого — повышение активности ФЕП-карбоксилазы, рН-оптимум которой сдвинут в щелочную сторону (Романова, 1980).

Воздействие экзогенного аммония на голодающие по азоту клетки листа кукурузы *Zea mays* увеличивало содержание белка и уровень mRNA для ФЕП-карбоксилазы в значительно большей степени, чем добавление в среду нитрата. Параллельно с этим увеличивалось содержание глутамина (но не глутамата), который также приводил к увеличению содержания mRNA. На этом основании выдвинуто предположение о том, что аммоний способен влиять на экспрессию гена ФЕП-карбоксилазы (Sugiharto, Sugiyama, 1992).

Повышение количества и активности ферментов гетеротрофной фиксации углекислоты вполне могло бы пополнить содержание органического вещества в клетках (рис. 2) и способствовать таким образом увеличению их продукции. Например, для миксотрофных клеток *Glycine max*, выращенных на аммоний-нитратной питательной среде, уровень гетеротрофной фиксации углекислоты был вполне сопоставим с уровнем фотосинтетической  $\text{CO}_2$ -фиксации и составлял примерно половину от последней (Klerk-Kiebert et al., 1982).

В ситуации, когда клетка использует ту или иную форму минерального азота (или обе одновременно), важным моментом является качественный состав синтезированных ею основных органических соединений — углеводов, липидов, белков, поскольку они будут определять впоследствии структурную организацию как отдельных компонентов клетки, так и самой клетки в целом.

При выращивании клеток *G. max* в питательной среде Гамборга В<sub>5</sub> с мальтозой, где азот был представлен в аммонийной и нитратной формах (1 мМ  $\text{NH}_4^+$  + 25 мМ  $\text{NO}_3^-$ ), наблюдалось резкое увеличение количества рибосом при замене слабометаболизируемой мальтозы сахарозой (Jackson, Lark, 1982). Поскольку в ряду испытанных для роста клеток углеводов предпочтение отдается сахарозе (Калинин и др., 1980), в клетках, растущих на мальтозе, возникает дефицит углеводного компонента, необходимого для синтеза рРНК. По нашему мнению, именно этот дефицит можно считать лимитирующим фактором при формировании рибосом.

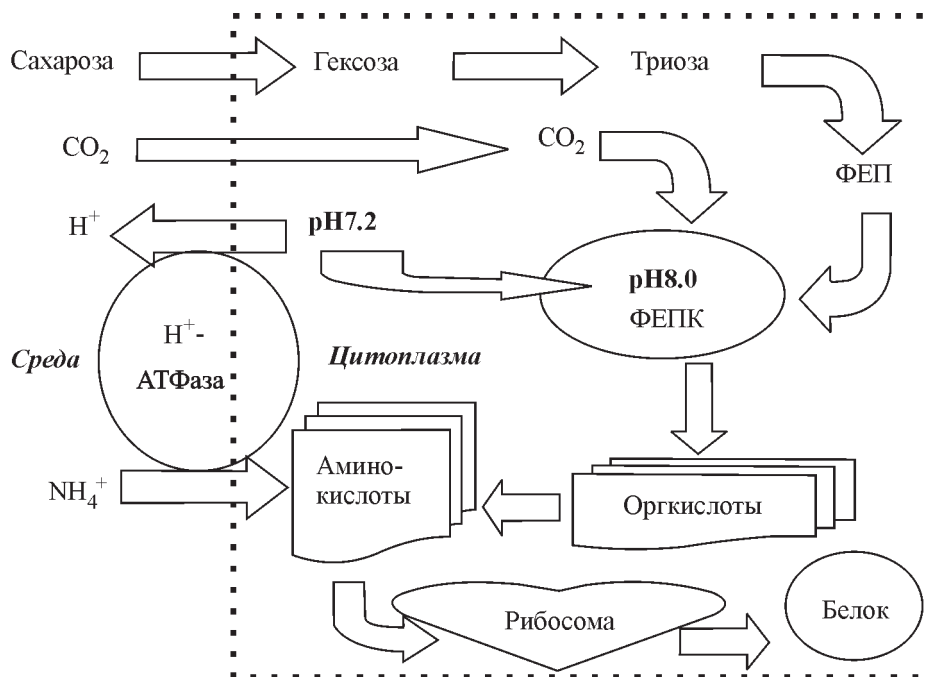


Рис. 2. Предполагаемая схема механизма влияния экзогенного аммония на процесс стимуляции гетеротрофной фиксации углекислоты в цитоплазме миксотрофных клеток культуры *in vitro*.

Подобный эффект (изменение числа рибосом в клетке) был получен и в наших экспериментах на каллусной культуре того же вида растения (Смолов, Семенова, 2008). Однако в наших опытах эффект увеличения количества рибосом обнаруживался при внесении в нитратсодержащую питательную среду (МС) аммонийного компонента.

Поскольку каждая рибосома представляет собой нуклеопротеидный комплекс, возникает вопрос: как соотносятся процессы формирования белоксинтезирующих структур и биосинтеза белка в клетке, идут ли они параллельно либо существует другой путь — увеличение каталитической активности самих рибосом под воздействием аммонийного фактора?

В пользу второго предположения говорит тот факт, что добавка «несубстратных» количеств аммония (около 70 мкМ) к нитратсодержащей питательной среде вызывала двукратное увеличение содержания белка в клетках (Mohanty, Fletcher, 1978).

Отметим, что процесс поглощения аммония клеткой растянут во времени. Следовательно, поступление аммония в клетку и его утилизация приводят к постоянному изменению концентраций этого компонента как в среде, так и в самой клетке.

Наши опыты по влиянию концентрации экзогенного аммония на содержание белка в каллусной ткани сои показали (Смолов, Семенова, 2008), что увеличение количества белка происходило в ограниченном диапазоне концентрации NH<sub>4</sub><sup>+</sup> — 2—10 мМ. Области более низких (менее 1 мМ) и более высоких (более 10 мМ) концентраций аммония не влияли на содержание белка в клеточной массе (табл. 1).

Поскольку при всех испытанных концентрациях экзогенного аммония (кроме 0 мМ) количество рибосомальных структур практически не изменялось (табл. 1), можно предположить, что наличие NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в среде (не более 0.01 мМ) является «сигналом» для начала формирования или сборки белоксинтезирующего аппарата клетки (не

исключается и индукция формирования всей его нуклеопротеидной структуры). Концентрация NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в среде, равная 1—2 мМ, является достаточной для проявления сформированными рибосомами заметной функциональной активности, которая при 10 мМ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> достигает своего максимального значения. Подобная зависимость указывает по меньшей мере на два участка воздействия аммония в процессе биосинтеза белка клетки. Один находится на этапах формирования (ниже 0.01 мМ) и стабилизации (до 1—2 мМ) рибосомальных структур, а другой (выше 1—2 мМ), связанный лишь с синтезом аминокислот, включается на этапе проявления функциональной активности уже готовых к работе рибосом.

При биосинтезе белка растительная клетка *in vitro*, по-видимому, может использовать аминокислоты, поступающие извне (Калинин и др., 1980; Измайлов, 1986), поэтому появляется возможность проверить функциональную способность рибосом, сформированных в клетке в отсутствие экзогенного аммония.

Перед началом исследования предполагалось, что отсутствие (или дефицит) аммония в составе питательной среды (и как следствие этого — снижение активности белкового синтеза) можно будет компенсировать добавкой в среду экзогенных аминокислот. Обычно для лучшего роста культур *in vitro* используют гидролизат казеина молока в концентрации 0.5—1.0 г/л (Калинин и др., 1980). Согласно данным Кочеткова и соавторов (1961), в гидролизате казеина больше всего содержится пролина, лейцина + изолейцина и глутамина.

Гидролизат казеина использовали на каллусной культуре *Atropa belladonna* в качестве экзогенного источника аминокислот, и было показано, что именно пролин способен усиливать ростовую и нитратредуктазную активность клеток (Salonen, Simola, 1989).

Однако, заменив в среде NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-ион на гидролизат казеина (диапазон использованных концентраций 0—2 г/л), мы не обнаружили какого-либо увеличения содержания белка в клетках сои (Смолов, Семенова, 2008).



Таблица 2

Количество нитрата ( $Q_a$ ), ассимилированного тремя различными вариантами клеток сои (Mixo, Mixo+I и Hetero), выращенных на аммонийсодержащей и безаммонийной питательных средах (МС) к концу пассажа

Показатель	Среда, содержащая $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$			Среда, содержащая $\text{NO}_3^-$		
	Mixo	Mixo+I	Hetero	Mixo	Mixo+I	Hetero
Сухая масса, мг	509 ± 21	338 ± 10	378 ± 18	502 ± 20	372 ± 36	397 ± 20
$Q_a$ , мг $\text{NO}_3^-$	69 ± 7	44 ± 4	51 ± 3	63 ± 5	32 ± 4	52 ± 5
$Q_a$ , мг $\text{NO}_3^-$ на 1 г сухой массы	135 ± 8	130 ± 12	135 ± 9	126 ± 12	86 ± 9	135 ± 14

Примечание. Mixo — миксотрофный каллус; Mixo+I — миксотрофный каллус, выращенный на среде МС с добавкой ингибитора фотосинтеза диурона ( $10^{-5}$  М); Hetero — гетеротрофный каллус.

Отсутствие эффекта усиления белкового синтеза при замене ионов аммония на гидролизат казеина можно объяснить либо низкой каталитической активностью рибосомальных структур клеток, выращенных на безаммонийной среде, либо низкой проницаемостью клеточных стенок сои для экзогенных аминокислот по сравнению с таковой у клеток *A. belladonna*.

В пользу первого предположения (т. е. низкая каталитическая способность рибосом) говорит тот факт, что добавка гидролизата казеина к питательной среде все-таки вызывала увеличение (в 2 раза) содержания хлорофилла в клетках (Смолов, Семенова, 2008). Небольшая величина наблюдавшегося эффекта могла быть связана с низким содержанием соответствующих аминокислот (глицина и аланина) в гидролизате казеина, которые требуются для начала синтеза хлорофилла (Чайка, Савченко, 1981).

Ранее нами было показано, что присутствие аммония в составе питательной среды значительно увеличивает содержание хлорофилла в клетках (Смолов и др., 1992), который входит в состав структуры пигмент-липопротеиновых комплексов хлоропластов клеток культуры *in vitro*. Эти комплексы были идентичны комплексам хлоропластов нативных клеток растений (Смолов и др., 1998). Связь между усилением синтеза хлорофилла и изменением направленности метаболических процессов под действием аммония (усиление образования аминокислот) (Bergmann et al., 1976) вполне оправдана, поскольку образование пиррольных колец хлорофилла происходит из молекул амино- и органических кислот (Чайка, Савченко, 1981). Согласно данным (Yamaa et al., 1977), содержание органических кислот в клетках, по-видимому, достаточно и не может лимитировать процесс биосинтеза хлорофилла.

Действительно, при наличии аммония в нитратсодержащей питательной среде наблюдается ряд эффектов: увеличение количества мембранных образований в фотосинтезирующих (в хлоропластах) и нефотосинтезирующих (в митохондриях) органеллах клетки и увеличение электронно-микроскопической плотности цитоплазмы (Смолов и др., 2004). Удаление аммония из этой питательной среды приводит к снижению количества мембранных образований в хлоропластах и митохондриях, к снижению плотности цитоплазмы, увеличению числа и размеров крахмальных зерен и накоплению осmioфильных глобул в фотосинтезирующих органеллах. Такие изменения явно указывают на подавление белковой направленности клеточного обмена.

Снижения количества мембран в хлоропластах в отсутствие аммония должны неизбежно приводить к сни-

жению фотосинтетической способности клеток и уменьшению их биомассы. При оценке скорости фотосинтетического выделения  $\text{O}_2$  у миксотрофных клеток сои, выращенных на нитратсодержащей среде в присутствии и в отсутствие экзогенного аммония, вышесказанное положение соблюдалось при расчете скорости выделения  $\text{O}_2$  на единицу сухой массы. Тогда как при расчете на единицу хлорофилла скорости фотосинтетического выделения  $\text{O}_2$  каллусом сои были выше у клеток, выращенных без аммонийного компонента, т. е. у хлоропластов с минимальной ламеллярной и гранальной системами (Смолов и др., 2004). По нашему мнению, такое «несоответствие» — усиление скорости фотосинтетического выделения  $\text{O}_2$  на единицу биомассы и подавление этого же показателя при расчете на единицу хлорофилла — в ответ на воздействие экзогенного аммония может быть вызвано комплексом причин: а) экранизацией поверхностными фотосинтезирующими клетками каллуса нижерасположенных фотосинтезирующих клеток; б) асинхронностью процессов клеточного роста и синтеза хлорофилла (Chagvardieff et al., 1988); в) различными путями и механизмами влияния аммония на процесс роста и процесс биосинтеза пигмента.

В каллусной культуре фотосинтезирующие миксотрофные клетки имеют большую скорость роста и большее накопление биомассы, чем гетеротрофные. При ингибировании диуроном ( $10^{-5}$  М) фотосинтетического электронного транспорта хлоропластов накопление биомассы миксотрофных клеток снижается до уровня биомассы гетеротрофных (табл. 2), так как в них прекращается образование восстановленного НАДФН<sub>2</sub> и, как следствие, происходит прекращение процесса фотосинтетической фиксации  $\text{CO}_2$ .

В экспериментах с каллусными клетками сои (неопубликованные результаты) мы наблюдали полное подавление процесса светозависимого восстановления нитрата при совместном внесении в среду нитратного и аммонийного компонентов (40 мМ  $\text{NO}_3^-$  и 20 мМ  $\text{NH}_4^+$ ). Т. е. если поступление свободного аммония в клетку не ограничено его дефицитом, то ассимиляция поглощенного нитрата осуществляется исключительно за счет восстановителя темнового происхождения (табл. 2). Относительная ассимиляция нитрата фотосинтезирующими клетками снижалась в присутствии диурона, если они выращивались на среде без аммония, причем эта величина становилась ниже, чем у гетеротрофных клеток (табл. 2). Это указывает на то, что 20—30 % поглощенного нитрата ассимилируется в клетках за счет восстановителя фотосин-

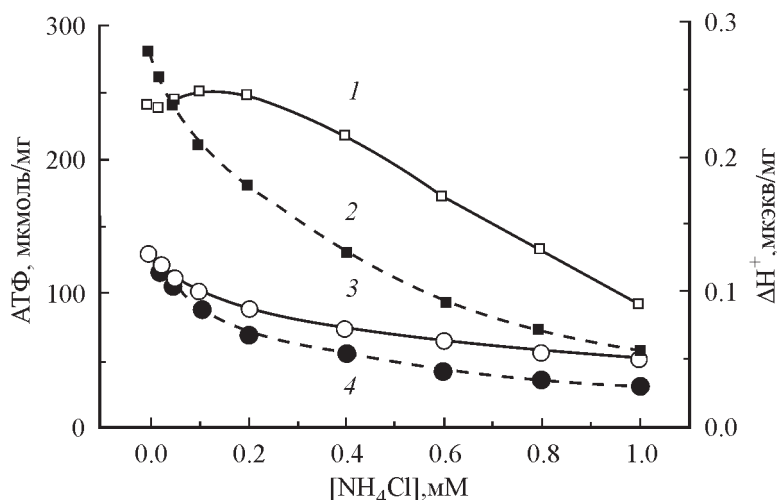


Рис. 3. Влияние аммония на синтез АТФ (1, 2) и  $\Delta\text{H}^+$ -светоиндуцированное поглощение протонов хлоропластами гороха (3, 4) в реакциях, катализируемых переносом электронов от воды к метилвиолгону (1, 3), и в циклической реакции ФС1 с феназинметосульфатом в присутствии диурона (2, 4).

Синтез АТФ и уровень  $\Delta\text{H}^+$  измеряли в мкмоль на 1 мг хлорофилла за 1 ч и мкЭВ  $\text{H}^+$  на 1 мг хлорофилла соответственно. Условия проведения реакций и методы измерения см. в работе: Opanasenko et al., 2002.

тетического происхождения (Смолов, Олейникова, 2003). Следовательно, способность хлоропластов к светозависимому восстановлению нитрата следует рассматривать как дополнительную, резервную, возможность клетки в обеспечении метаболических процессов восстановленным азотом.

Недавняя работа, выполненная на проростках *Arabidopsis thaliana*, показала, что аммонийное обеспечение голодающих по азоту клеток может приводить к экспрессии генов некоторых альтернативных оксидаз и НАД(Ф)Н-дегидрогеназ и поддерживать с помощью этой системы редокс-гомеостаз клетки, повышающийся из-за отсутствия необходимости в восстановлении и утилизации нитрата (Escobar et al., 2006).

Каким образом аммоний, поступающий вместе с нитратом, способен воздействовать на светозависимый путь восстановления нитрата (см. табл. 2), пока остается непонятным, даже если принять во внимание реорганизацию дыхательной цепи, вызванную экспрессией синтеза ферментов (Escobar et al., 2006). Во всяком случае, можно предположить как подавление аммонием реакций светозависимого восстановления нитрата по принципам обратной связи, так и скоординированное изменение активности (или размера пулов?) ферментов восстановления нитрата и ассимиляции аммония в хлоропластном и (или) цитоплазматическом компартменте.

Следует заметить, что все светозависимые процессы, связанные с преобразованием световой энергии в энергию химических эквивалентов (НАДФН<sub>2</sub> и АТФ), происходят на внутренних мембранных системах хлоропластов — ламеллах стромы и ламеллах гран.

Свидетельством воздействия аммония на мембранные системы (например, тонопласт) может служить факт ремобилизации эндогенного нитрата из достаточно консервативного (по отношению к нитрату) запасного компартмента клетки — вакуоли. Установлено (Beck, Renner, 1989), что даже в условиях азотного голодания клетки *Chenopodium rubrum* могли использовать вакуолярный нитрат лишь при добавке к среде аммонийного компонента. Следовательно, учитывая аналогичность организации всех нативных биологических мембран, можно предполо-

жить и способность аммония воздействовать на другие мембранные системы, в том числе и на фотосинтезирующие.

Обычно аммоний не рассматривается в качестве эндогенного регулятора энергетики хлоропласта, так как считается, что его содержание в строме незначительно. Однако прямое определение концентрации аммония в водной фазе тканей и апопласте листьев томатов и рапса дает значения 0.5—1.5 мМ (Husted et al., 2000). В культуре тканей, как показано в предыдущей части обзора, эта концентрация может достигать и более высоких значений.

Как известно, в физиологическом диапазоне рН этот амин имеет две формы — катионную (аммоний) и нейтральную (аммиак). Нейтральная форма свободно проникает сквозь клеточные мембраны, поэтому аммоний, как и другие эндогенные амины, легко теряется в процессах выделения органелл и, как правило, не обнаруживается в них *in vitro*.

В нативных клетках листа концентрация аммиака одинакова во всех компартментах. Концентрация же аммония зависит от значения рН, поэтому и различия между концентрациями аммония в компартментах клетки должны быть довольно значительными. В темноте самым кислым компартментом клетки является вакуоль (рН 5.6—6.0), а в цитозоле и в хлоропластах значения рН находятся в диапазоне 7.5—7.8 (Heldt et al., 1973; Gout et al., 1992). Таким образом, аммоний может запасаться в вакуолях. На свету рН стромы повышается, а в люменах хлоропластов снижается до 5.5—5.8 (Tikhonov et al., 2008), что вызывает перераспределение аммония между люменом и стромой хлоропласта в соответствии с трансмембранным градиентом  $\text{H}^+$ : в люменах концентрация аммония резко возрастает, а в строме снижается. Строма хлоропласта становится наиболее щелочным компартментом клетки, где значение рН достигает величины 7.8—8.0. Следовательно, в соответствии с трансмембранными градиентами рН на свету в строме хлоропластов концентрация аммония становится ниже, чем в цитозоле, и в 100—1000 раз ниже, чем в люменах.

Концентрация аммония в строме освещенных хлоропластов должна быть не ниже 0.5 мМ, чтобы обеспечи-

вать активный синтез аминокислот глутаминсинтезами хлоропласта, поскольку для этих ферментов значения  $K_m$  по аммонии лежат в области 0.5—0.6 мМ (Пушкин и др., 1983).

С другой стороны, концентрация аммония в строме не должна быть больше 1—2 мМ, так как выше этих концентраций аммоний выступает как эффективный разобщитель процессов переноса электронов и синтеза АТФ. Он снижает скорость синтеза АТФ, ускоряет перенос электронов на нативный (НАДФ<sup>+</sup>) или искусственный акцептор и вызывает набухание фотосинтезирующих оргanelл. При концентрации аммония, равной 5—6 мМ, фотофосфорилирование в хлоропластах полностью прекращается и токсическое действие аммония проявляется в полной мере.

Известен регуляторный эффект низких концентраций аммония на хлоропластах, когда он не ингибирует, а стимулирует синтез АТФ, катализируемый линейным переносом электронов от воды к акцепторам ФС1 (Giersch, 1981; Опанасенко и др., 1988; Pick, Weiss, 1988). Базальный и сопряженный перенос электронов ускорялся при этих концентрациях, в то время как разобщенный транспорт не изменялся. Циклическое фотофосфорилирование в ФС1, катализируемое феназинметосульфатом, ингибировалось аммонием в концентрациях 0.2—0.5 мМ на 40—50 % (Опанасенко и др., 1988). Те же концентрации аммония ингибировали светоиндуцированное поглощение протонов хлоропластами, что указывает на явное снижение протонного градиента низкими концентрациями аммония (рис. 3). Снижение градиента рН на тилакоидных мембранах сопровождается снижением рН стромы и, следовательно, должно приводить к увеличению концентрации аммония в строме и стимуляции глутаминсинтазы нативного хлоропласта.

Таким образом, синтез АТФ за счет линейного переноса электронов от воды к НАДФ<sup>+</sup> защищен от токсического действия аммония гораздо лучше, чем циклическое фотофосфорилирование в ФС1, которое вполне может катализироваться избытком восстановленного ферредоксина.

Стимуляция синтеза АТФ при линейном переносе электронов от воды к акцепторам ФС1 метилвиологену или НАДФ<sup>+</sup> наблюдалась в присутствии различных проникающих моноаминов и эндогенного диамина — путресцина (Ioannidis et al., 2006). Роль путресцина в регуляции метаболизма в животных и растительных клетках активно исследуется в настоящее время.

Механизмы стимуляции и разобщения синтеза АТФ аммонием пока неясны. Известно, что на свету аммоний накапливается в тилакоидных люменах в соответствии с величиной градиента рН. Электрический потенциал на мембране при этом увеличивается всего на 5—10 мВ (Pick, Weiss, 1988), так как положительный заряд аммония компенсируется анионами хлора, поступающими в люмен. Предполагается, что концентрационные градиенты аммония и хлора индуцируют набухание тилакоидов и утечку из люменов катионов амина или протонов. В тилакоидных мембранах хлоропластов были обнаружены каналы для калия, хлора и двухвалентных катионов (Sarkadi, Parker, 1991; Pottosin, Schonknecht, 1996). Кроме того, был найден канал, подобный поре, способный транспортировать более крупные молекулы (Hinnah, Wagner, 1998), в том числе, вероятно, и катионы различных аминов. Однако эти каналы идентифицированы пока только с помощью электрофизиологических методов (патч-кламп,

микроэлектроды), которые не дают информации о природе и локализации каналов.

Таким образом, влияние низких концентраций аммония на энергетику хлоропласта может быть отнесено к регуляторным (несубстратным) эффектам. За счет этого действия могут стимулироваться образование АТФ и НАДФН<sub>2</sub> *in vivo*, повышаться концентрация аммония в строме хлоропласта и соответственно усиливаться процессы, связанные с утилизацией углерод- и азотсодержащих соединений клетки.

По нашему мнению, пока преждевременно детально обсуждать механизм влияния иона аммония на вышеописанные процессы, происходящие в растительной клетке. Тем не менее существующие экспериментальные данные позволяют предложить к рассмотрению следующие варианты сценария возможного механизма воздействия. 1. Поступление NH<sub>4</sub><sup>+</sup> в клетку (или какой-либо ее компартмент) сопровождается транспортом H<sup>+</sup> из одного компартмента в другой (или в окружающую среду) приводит к изменению показателя рН и как следствие — к изменению активности ферментов соответствующих компартментов или продукции энергетических эквивалентов. 2. Поглощенный NH<sub>4</sub><sup>+</sup> не весь утилизируется клеткой в азотсодержащие органические соединения. Неиспользованная часть «свободного» аммония, возможно, способна участвовать в пространственной организации соответствующих высокомолекулярных компонентов отдельных структур клетки, например, белковых и (или) нуклеиновых составляющих рибосом либо их каталитических центров, а также в регуляции процессов трансформации энергии в хлоропластах.

По-видимому, не случайно, несмотря на способность растительных клеток к темновому и световому восстановлению нитрата, только при определенных сочетаниях нитратной и аммонийной форм минерального азота достигаются наилучший рост и развитие растений. Хотя исследования причин этого явления продолжаются (Ruan et al., 2007), тем не менее уже сейчас можно сказать, что широко распространенное представление о снижении энергозатрат растения при утилизации свободного аммония (по сравнению с нитратом) и, вследствие этого, увеличении продуктивности растительного организма требует некоторой корректировки.

#### Список литературы

- Демидов Э. Д., Павлова Е. А., Смолов А. П. 1986. Светозависимое восстановление нитрата клетками хлореллы. Физиол. раст. 33 (5) : 913—921.
- Измайлов С. Ф. 1986. Азотный обмен в растениях. М.: Наука. 320 с.
- Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. 1980. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка. 488 с.
- Кордюм Е. Л., Недуха Е. М., Сидоренко П. Г. 1980. Структурно-функциональная характеристика растительной клетки в процессе дифференцировки и дедифференцировки. Киев: Наукова думка. 113 с.
- Кочетков Н. К., Торгов И. В., Ботвинник М. М. 1961. Химия природных соединений. М.: Изд-во АН СССР. 559 с.
- Кретович В. Л. 1987. Усвоение и метаболизм азота у растений. М.: Наука. 486 с.
- Опанасенко В. К., Редько Т. П., Ягужинский Л. С. 1988. Влияние ионофоров на синтез АТФ и электронный транспорт в тилакоидных мембранах хлоропластов. ДАН СССР. 303 (3) : 752—756.



- Пушкин А. В., Соловьева Н. А., Акентьева Н. П., Евстигнева З. Т., Кретович В. Л. 1983. Кинетические свойства глутамин синтетазы из хлоропластов листьев гороха. Биохимия. 46 (7) : 1300—1305.
- Романова А. К. 1980. Биохимические методы изучения автотрофии у микроорганизмов. М.: Наука. 159 с.
- Смолов А. П., Кузнецова Н. Ю., Олейникова Т. А., Москаленко А. А. 1998. Пигменты и пигмент-белковые комплексы хлоропластов миксотрофного каллуса сои: влияние аммония и диурона. Физиол. раст. 45 (5) : 653—658.
- Смолов А. П., Ладыгин В. Г., Семенова Г. А. 2004. Влияние экзогенного аммония на фотосинтетическое выделение  $O_2$  и ультраструктурную организацию клеток каллуса сои. Физиол. раст. 51 (5) : 658—665.
- Смолов А. П., Олейникова Т. А. 2003. Свет и утилизация нитрата каллусными клетками сои. Изв. РАН. Сер. биол. 6 : 670—674.
- Смолов А. П., Олейникова Т. А., Полевая В. С. 1992. Об утилизации нитрата клетками гетеро- и миксотрофной культуры *Glycine max*. Физиол. раст. 39 (5) : 875—886.
- Смолов А. П., Семенова Г. А. 2008. Влияние концентрации аммония на содержание белка, хлорофилла и количество рибосом в клетках миксотрофного каллуса сои. Физиол. раст. 55 (3) : 397—403.
- Спиринов А. С., Гаврилова Л. П. 1971. Рибосома. М.: Наука. 254 с.
- Тарчевский И. А. 1993. Катаболизм и стресс у растений. М.: Наука. 80 с.
- Чайка М. Т., Савченко Г. Е. 1981. Биосинтез хлорофилла в процессе развития пластид. Минск: Наука и техника. 168 с.
- Beck E., Renner U. 1989. Ammonium triggers uptake of  $NO_3^-$  by *Chenopodium rubrum* suspension culture cells and remobilization of their vacuolar nitrate pool. Plant Cell Physiol. 30 : 487—495.
- Behrend J., Mateles R. I. 1976. Nitrogen metabolism in plant cell suspension cultures. II. Role of organic acids during growth on ammonia. Plant Physiol. 58 : 510—512.
- Bergmann L., Grosse W., Koth P. 1976. Influence of ammonium and nitrate on N-metabolism, malate accumulation and malic enzyme activity in suspension cultures *Nicotiana tabacum* var. «Samsun». Z. Pflanzenphysiol. 80 : 60—70.
- Bloom A. J., Frensch J., Taylor A. R. 2006. Influence of inorganic nitrogen and pH on the elongation of maize seminal roots. Ann. Bot. (Lond.). 97 : 867—873.
- Boukcim H., Pages L., Mousain D. 2006. Local  $NO_3^-$  or  $NH_4^+$  supply modifies the root system architecture of *Cedrus atlantica* seedlings growth in a split-root device. J. Plant Physiol. 163 : 1293—1304.
- Bradford J. A., Fletcher J. S. 1982. Influence of protein synthesis on  $NO_3^-$  reduction,  $NH_4^+$  accumulation, and amide synthesis in suspension cultures of *Paul's Scarlet Rose*. Plant Physiol. 69 : 63—66.
- Campbell W. H., Ziegler P., Beck E. 1984. Development of nitrogen assimilation enzymes during photoautotrophic growth of *Chenopodium rubrum* suspension cultures. Plant. Physiol. 74 : 947—950.
- Chagvardieff P., Pean M., Carrier P., Dimon B. 1988. Oxygen exchange during growth of photoautotrophic cell suspensions of *Euphorbia characias* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 12 : 243—251.
- Edit T., Laszlo T. 1992. Effect of  $NO_3^-/NH_4^+$  ratio on photosynthetic rate, nitrate reductase activity and chloroplast ultrastructure in three cultivars of red pepper (*Capsicum annuum* L.). J. Plant Physiol. 140 : 298—305.
- Escobar M. A., Geisler D. A., Rasmusson A. G. 2006. Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. The Plant J. 45 : 775—788.
- Giersch C. 1981. Stimulation of photophosphorylation by low concentrations of uncoupling amines. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100 : 666—674.
- Gout E., Bligny R., Douce R. 1992. Regulation of intracellular pH values in higher plant cells. J. Biol. Chem. 267 : 13 903—13 909.
- Gunter E. A., Ovodov Y. S. 2005. Effect of calcium, phosphate and nitrogen on cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture. J. Biotechnol. 117 : 385—393.
- Heldt H. W., Werdan Milovancev M., Geller G. 1973. Alkalinization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. Biochim. biophys. acta. 314 : 224—241.
- Hinnah S. C., Wagner R. 1998. Thylakoid membranes contain a high-conductance channel. Eur. J. Biochem. 253 : 606—613.
- Husted S., Hebborn C. A., Mattsson M., Schjoerring J. K. 2000. A critical experimental evaluation of methods for determination of  $NH_4^+$  in plant tissue, xylem sap and apoplastic fluid. Physiol. Plantarum. 109 : 167—179.
- Husted S., Mattsson M., Möllers C., Wallbraun M., Schjoerring J. K. 2002. Photorespiratory  $NH_4^+$  production in leaves of wild-type and Glutamine Synthetase 2 antisense oilseed rape. Plant Physiol. 130 : 989—998.
- Ioannidis N. E., Sfichi L., Kotzabasis K. 2006. Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. Biochim. biophys. acta. 1757 : 821—828.
- Jackson P. J., Lark K. G. 1982. Ribosomal RNA synthesis in soybean suspension cultures growing in different media. Plant Physiol. 69 : 234—239.
- Klerk-Kiebert Y. M., Kneppers T. J. A., Bakker P. A. H. M., Shalk H. H. 1982. Comparison of dry matter and photosynthetic characteristics of chlorophyllous and non-chlorophyllous cell suspension cultures of soybean (*Glycine max* L.). Z. Pflanzenphysiol. 105 : 445—456.
- Leleu O., Vuylstecker C. 2004. Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. J. Exp. Bot. 55 : 815—823.
- Marschner H. 1986. Mineral nutrition of higher plant. London: Acad. Press. 674 p.
- Mahmood T., Woitke M., Gimmler H., Kaiser W. M. 2002. Sugar exudation by roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth] is strongly affected by the nitrogen source. Planta. 214 : 887—894.
- Martinelli S. D., Hudson J., Bratt R. 1988. Ammonium ion sensitivity is a ribosomal phenotype associated with suppressor mutations in the *suaC* gene of *Aspergillus nidulans*. Curr. Genet. 14 : 431—436.
- Michelinaki M., Spanos A., Coutsogeorgopoulos C., Kalpaxis D. L. 1997. New aspects on the kinetics of activation of ribosomal peptidyltransferase-catalyzed peptide bond formation by monovalent ions and spermine. Biochim. biophys. acta. 1342 : 182—190.
- Mohanty B., Fletcher J. S. 1978. Influences of ammonium on the growth and development of suspension cultures of *Paul's Scarlet Rose*. Physiol. Plantarum. 42 : 221—225.
- Opanasenko V., Agafonov A., Demidova R. 2002. Effects of heterocyclic and tertiary permeate amines on the electron transfer in thylakoid membranes. Photosynth. Res. 72 : 243—253.
- Pick U., Weiss M. 1988. The mechanism of stimulation of photophosphorylation by amines and by nigericin. Biochim. biophys. acta. 934 : 22—31.
- Pottosin I. I., Schonknecht G. 1996. Ion channel permeable for divalent and monovalent cations in native spinach thylakoid membranes. J. Membr. Biol. 152 : 223—233.
- Ruan J., Gerendas J., Hardter R., Sattelmacher B. 2007. Effect of nitrogen form and root-zone pH on growth and nitrogen uptake of tea (*Camellia sinensis*) plants. Ann. Bot. (Lond.). 99 : 301—310.
- Salonen M.-L., Simola L. K. 1989. Effect of nitrate, ammonium and some amino acids on growth and nitrate reductase activity in suspension cultures of *Atropa belladonna*. Plant Cell Physiol. 30 : 1177—1181.
- Sarkadi B., Parker J. C. 1991. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. Biochem. biophys. acta. 1071 : 407—427.
- Schmitz U., Lorz H. 1990. Nutrient uptake in suspension cultures of *Gramineae*. II. Suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci. 66 : 95—111.
- Sugiharto B., Sugiyama T. 1992. Effect of nitrate and ammonium on gene expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and



nitrogen metabolism in maize leaf tissue during recovery from nitrogen stress. *Plant Physiol.* 98 : 1403—1408.

*Tikhonov A. N., Agafonov R. V., Grigor'ev I. A., Kirilyuk I. A., Ptushenko V. V., Trubitsin B. V. 2008.* Spin-probes designed for measuring the intrathylakoid pH in chloroplasts. *Biochem. biophys. acta.* 1777 : 285—294.

*Wright K. M., Givan C. V. 1988.* Regulation of nonautotrophic carbon dioxide assimilation by ammonia in cultured cell of *Aser pseudoplatanus* L. *Plant Sci.* 58 : 151—158.

*Yamaya T., Ojima K., Ohira K. 1977.* Studies of the greening of cultured soybean and ruta cells. II. Photosynthetic activities of the cultured green cells. *Soil Sci. Plant Nutr.* 23 : 59—66.

Поступила 24 VI 2008

#### AMMONIUM FACTOR IN THE LIFE OF PLANT CELLS

*A. P. Smolov,<sup>1</sup> V. K. Opanasenko*

Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Moscow region;

<sup>1</sup> e-mail: smap49@mail.ru

In the present review the role of ammonium component not connected with the synthesis of nitrogen-containing substances in plant cells is discussed. In particular, it is devoted to the influence of  $\text{NH}_4^+$  ions on the morphological changes of surface root cells, heterotrophic  $\text{CO}_2$  fixation by cells, dark and light-dependent reduction of nitrate in plant cells, formation and functioning of cytoplasmic ribosomes in plant cells and function of photosynthesizing organelle membrane systems. Our experimental data together with the results of the other researchers allow us to look at ammonium participation in the life of plant cells more widely and not to consider  $\text{NH}_4^+$  ions only as a substrate for ketoacids amination processes in plant cells.

**Key words:** ammonium, effect, plant cells, functions of cells.