

**ФИЗИОЛОГИЯ
РАСТЕНИЙ**

УДК 58.036.5:[577.152.34:633.11]

**АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
И ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА В ЛИСТЬЯХ ПШЕНИЦЫ
В НАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД ДЕЙСТВИЯ
И В ПОСЛЕДЕЙСТВИИ НИЗКОЙ ЗАКАЛИВАЮЩЕЙ ТЕМПЕРАТУРЫ**

© 2008 г. С. А. Фролова, А. Ф. Титов

Институт биологии Карельского научного центра РАН,
185910 Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11

E-mail: frolova@bio.krc.karelia.ru

Поступила в редакцию 08.06.2007 г.

На проростках пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенных в условиях контролируемой среды (25°C, освещенность 10 клк, фотопериод 14 ч) изучена динамика активности амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина при холодовом (5°C, освещенность 10 клк, фотопериод 14 ч) закаливании. Показано, что изменение активности амидаз и цистеиновых протеиназ предшествует по времени повышению устойчивости проростков в ходе их закаливания и снижению устойчивости по окончании холодового воздействия. Изменение активности ингибиторов трипсина наблюдалось только в процессе холодового закаливания. Высказано предположение об участии амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина в адаптации растений к холоду.

Хорошо известно, что растения реагируют на действие низкой закаливающей температуры повышением холодоустойчивости (Гуманов, 1979; Дроздов и др., 1984; Трунова, 2007), а при возврате температуры к обычным значениям происходит обратный процесс – снижение их устойчивости, т.е. раззакаливание (Титов, 1989; Колесниченко, Войников, 2003; Титов и др., 2006). Важно, что как в период действия низкой температуры, так и в период ее последствия в клетках и тканях растительного организма наблюдаются многочисленные структурно-функциональные изменения, связанные с процессами формирования повышенной устойчивости и ее утраты. Однако большая часть имеющихся по этому вопросу литературных данных касается анаболических процессов и, прежде всего, синтеза стрессовых (шоковых) белков (Guo, 1990; Thomashow, 1998; Колесниченко, Войников, 2003; Титов и др., 2006). Из анализа имеющихся данных следует, что белоксинтезирующая система играет важную, если не ключевую роль в формировании холодоустойчивости растений (Титов, 1989; Кузнецов, 1992; Войников и др., 2004; Титов и др., 2006; Трунова, 2007). В отличие от этого, обратному процессу – деградации белков и возможному участию протеолитических ферментов и ингибиторов протеиназ в процессах адаптации – уделяется гораздо меньшее внимание. Вместе с тем, учитывая вклад протеиназ и их ингибиторов в регуляцию многих биологических процессов и обеспечение реакции организма на меняющиеся условия среды, логично предположить их участие в холодовой адапта-

ции растений. Проверке этого предположения была посвящена данная работа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили с проростками озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) морозостойкого сорта Московская 39, выращенными в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа в камере искусственного климата при температуре воздуха 25°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности около 10 клк и фотопериоде 14 ч. По достижению недельного возраста растения подвергали в течение 7 сут действию закаливающей температуры 5°C при тех же условиях освещенности и влажности (контрольные проростки оставались при температуре 25°C), после чего их возвращали в исходные условия.

О холодоустойчивости проростков судили по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток паренхимы листовых высечек (ЛТ₅₀) после их 5-минутного промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике ТЖР–0.2/–20 (Россия) (Балагурова и др., 1982).

Амидазную активность определяли с помощью метода Эрлангера с соавт. (Erlanger *et al.*, 1961), используя синтетический субстрат БАПА (N α -бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид), активность цистеиновых протеиназ – по модифицированному методу Кунитца (Sgarbieri *et al.*, 1964), ингибиторную активность – по подав-

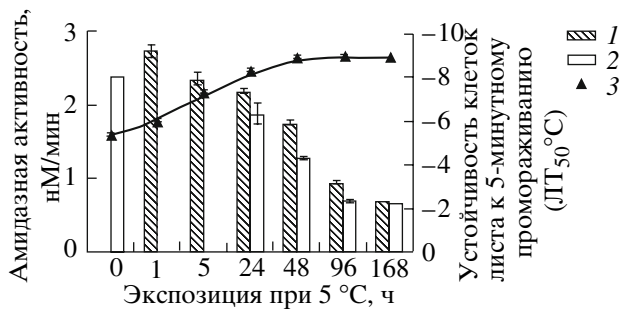


Рис. 1. Влияние температуры 5°C на холодоустойчивость и амидазную активность проростков озимой пшеницы сорта Московская 39: 1 – закалка, 2 – контроль, 3 – холодоустойчивость (для рис. 1, 3).

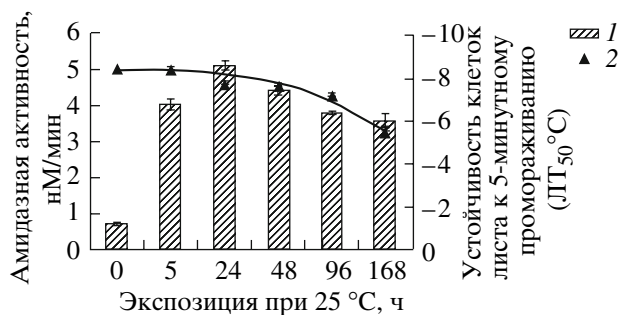


Рис. 2. Динамика холодоустойчивости (2) и амидазной активности (1) проростков озимой пшеницы сорта Московская 39 в период последействия холодового закаливания (закаливание: 5°C в течение 7 сут).

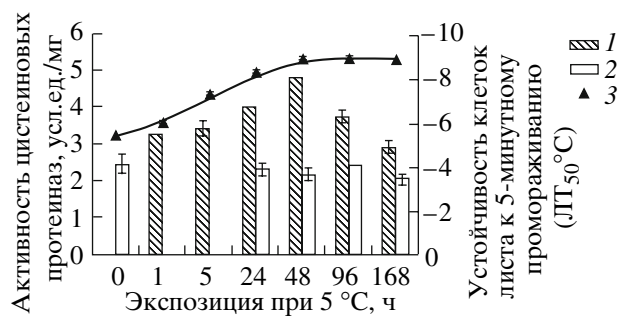


Рис. 3. Влияние температуры 5°C на холодоустойчивость и активность цистеиновых протеиназ проростков озимой пшеницы сорта Московская 39.

лению активности ферментов (Morichara *et al.*, 1967).

На рисунках приведены средние значения по 3–5 независимым опытам. Обсуждаются величины, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Воздействие закалывающей температуры на проростки пшеницы уже через 1 ч вызывало не-

большое увеличение устойчивости клеток листьев, а к концу 2-х суток она достигала своего максимального значения, сохраняясь в дальнейшем неизменной (рис. 1). Через 24 ч после возвращения проростков в обычные температурные условия (25°C) их холодоустойчивость начинала снижаться, достигая исходного уровня через 6 сут (рис. 2).

Наряду с изменениями устойчивости в процессе закаливания и раззакаливания у растений наблюдалось изменение активности амидаз, цистеиновых протеиназ и активности ингибиторов трипсина. Так, часовое воздействие температуры 5°C вызывало некоторое увеличение (на 15%) амидазной активности, которое затем сменялось снижением данного показателя (на 20% через 5 ч закалки, и на 40% через 24 ч) (рис. 1). При достижении максимального уровня устойчивости (на 2-е сут закаливания) амидазная активность проростков пшеницы составляла 70% от максимальной и в дальнейшем она снижалась, достигая значений, характерных для контрольных (не подвергавшихся низкотемпературной обработке) растений того же возраста. В процессе раззакаливания активность данного фермента снова значительно увеличивалась уже через 5 ч после возвращения проростков в исходные условия (рис. 2), в течение последующих суток достигала своего максимума и далее постепенно уменьшалась.

Активность цистеиновых протеиназ в начальный период охлаждения также увеличивалась, достигая своего максимума на 2-е сутки закаливания (рис. 3). Дальнейшее воздействие холода вызывало снижение активности данного фермента (на 20% от максимума на 4-е сут закаливания, и на 40% на 7-е сут). При возврате закаленных к холоду растений пшеницы в исходные условия (25°C) активность цистеиновых протеиназ увеличивалась в 1.5 раза в течение 1-х сут раззакаливания, сохранялась на данном уровне еще 2 сут и далее продолжала снижаться до конца эксперимента (рис. 4).

В течение первых двух суток холодового закаливания активность ингибиторов трипсина увеличивалась одновременно с ростом устойчивости (таблица), тогда как последующее действие температуры 5°C приводило к снижению остаточной протеолитической активности. При раззакаливании растений пшеницы активность ингибиторов трипсина, в отличие от активности амидаз и цистеиновых протеиназ, не изменялась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что повышение активности амидаз и цистеиновых протеиназ происходит в начальный период действия на растения пшеницы низкой закалывающей тем-

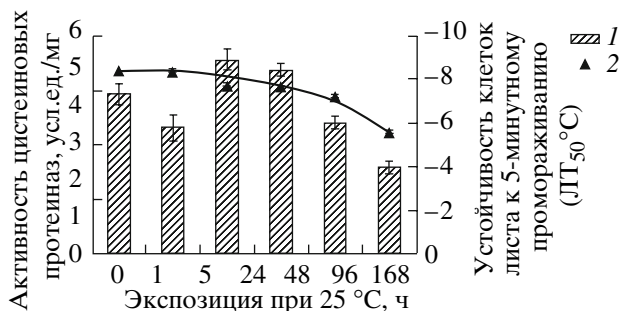


Рис. 4. Динамика холодоустойчивости (2) и активности цистеиновых протеиназ (1) проростков озимой пшеницы сорта Московская 39 в период последнего действия холододового закаливания (5°С в течение 7 сут).

пературы, и оно предшествует росту холодоустойчивости. Это соответствует представлениям о том, что изменение нормальных условий жизнедеятельности сопровождается, прежде всего, усилением протеолитических процессов (Гарчевский, 2001; Johnston *et al.*, 2006), один из механизмов которого связан с изменением проницаемости тонопласта и выходом в цитозоль протеолитических ферментов, локализованных в вакуоле (Блехман, Шеламова, 1992; Pernas *et al.*, 2000). Вероятно, контролируя концентрацию белков и пептидов, протеолитические ферменты участвуют в модификации и устранении биополимеров, уже невыполняющих (или выполняющих не в полной мере) необходимые функции, а также обеспечивают клетку мономерными субстратами для синтеза *de novo* белков, которые участвуют в формировании холодоустойчивости клеток.

Динамика остаточной протеолитической активности по отношению к трипсину при холододовом закаливании (5°С) и последующем раззакаливании проростков озимой пшеницы сорта Московская 39

Экспозиция, ч	Остаточная протеолитическая активность по отношению к трипсину, (мг трипсина/мг белка) × 10 ⁻²	
	закаливание при 5°С	раззакаливание при 25°С
1	5.60 ± 0.12	–
5	6.20 ± 0.14	6.07 ± 0.36
24	5.18 ± 0.24	6.41 ± 0.60
48	8.60 ± 0.38	–
72	7.00 ± 0.16	7.04 ± 0.68
96	6.90 ± 0.20	–
120	–	6.86 ± 0.16
168	6.75 ± 0.25	5.75 ± 0.25

Примечание. "–" – исследование не проводилось.

Отмеченное в процессе повышения холодоустойчивости усиление активности ингибиторов трипсина определяется их способностью обратимо связывать ферменты и переводить их в латентное состояние (Мосолов, Валуева, 1993; De Leo *et al.*, 2002). Таким образом, выступая в качестве регуляторов активности протеиназ, ингибиторы трипсина предотвращают преждевременный распад вновь синтезированных белков, тем самым поддерживая процесс формирования повышенной устойчивости.

Из литературы известно, что при возвращении температуры к нормальным значениям наряду со снижением холодоустойчивости в клетках и тканях растений происходят существенные изменения в синтезе белков. В частности, синтез стрессовых белков тормозится или прекращается, а синтез белков, характерных для физиологически нормальных температур, восстанавливается (Колесниченко, Войников, 2003; Титов и др., 2006). Полученные данные об увеличении активности амидаз и цистеиновых протеиназ в начальный период раззакаливания проростков пшеницы подтверждают предположение об участии протеолитических ферментов в образовании, модификации или инактивации ряда белков при возврате температуры к исходным значениям.

Вместе с тем, учитывая, что в период последнего действия низкой закаливающей температуры изменений активности ингибиторов трипсина обнаружено не было, можно предположить, что при возврате температуры к нормальным значениям, на фоне снижения активности протеолитических ферментов, регуляторная функция белков-ингибиторов отходит на второй план. И в этом случае они, скорее всего, играют роль запасных белков.

Таким образом, в данной работе показано, что в начальный период действия и в период последнего действия низкой закаливающей температуры происходит увеличение активности амидаз и цистеиновых протеиназ, очевидно, направленное на изменение спектра синтезируемых белков, необходимых растениям для осуществления жизнедеятельности в новых условиях. Изменение активности ингибиторов трипсина (как регуляторов активности протеолитических ферментов) в процессе холододового закаливания, вероятнее всего, также связано с формированием и поддержанием повышенной холодоустойчивости. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 06-04-49107а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Балагурова Н.И., Дроздов С.Н., Хилков Н.И. Метод определения устойчивости растительных тканей к промораживанию. Петрозаводск: Карельский фил. АН СССР, 1982. 6 с.

- Блехман Г.И., Шеламова Н.А. Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // Успехи соврем. биологии. 1992. Т. 112. № 2. С. 281–297.
- Войников В.К., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Рихванов Е.Г. Стрессовые белки растений. Иркутск: Ин-т географии СО РАН, 2004. 129 с.
- Дроздов С.Н., Курец В.К., Титов А.Ф. Терморезистентность активно вегетирующих растений. Л.: Наука, 1984. 167 с.
- Колесниченко А.В., Войников В.К. Белки низкотемпературного стресса у растений. Иркутск: Арт-пресс, 2003. 196 с.
- Кузнецов Вл.В. Индуцибельные системы и их роль при адаптации растений к стрессорным факторам: Автореф. дис. докт. биол. наук. Кишинев: ИФР АН Респ. Молдавия, 1992. 74 с.
- Мосолов В.В., Валуева Т.А. Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. М.: Институт биохимии РАН, 1993. 207 с.
- Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн, 2001. 448 с.
- Титов А.Ф. Устойчивость активно вегетирующих растений к низким и высоким температурам: закономерности варьирования и механизмы: Автореф. дис. докт. биол. наук. М.: ИФР им. К.А. Тимирязева АН СССР, 1989. 42 с.
- Титов А.Ф., Акимова Т.В., Таланова В.В., Тончиева Л.В. Устойчивость растений в начальный период действия неблагоприятных температур. М.: Наука, 2006. 143 с.
- Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.
- Туманов И.И. Физиология закаливания и морозостойкости растений. М.: Наука, 1979. 350 с.
- De Leo F., Volpicella M., Licciuli S. et al. Plant PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes // Nucl. Acid Res. 2002. V. 30. № 1. P. 347–348.
- Erlanger D.F., Kokowsky N., Cohen W. Proteinases activity in biological substrats // Arch. Biochem. Biophys. 1961. V. 95. № 2. P. 271–278.
- Guy C.L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism // Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 1990. V. 84. № 3. P. 872–878.
- Johnston M.K., Jacob N.P., Brodl M.R. Heat shock-induced changes in lipid and protein metabolism in the endoplasmic reticulum of barley aleurone layers // Plant Cell Physiol. 2006. V. 48. № 1. P. 31–41.
- Morichara K., Oka T., Tsuzuki H. Proteases activity // Biochim. Biophys. Acta. 1967. V. 139. № 2. P. 38–2397.
- Pernas M., Sanches-Monge R., Salcedo G. Biotic and abiotic stress induce cystatine expression in chessnut // FEBS Letters. 2000. V. 467. P. 206–210.
- Sgarbieri V.C., Gupte S.M., Kramer D.E., Whitaker J.R. Ficus enzymes. I. Separation of the proteolytic enzymes of Ficus carica and Ficus glabrata lattices // J. Biol. Chem. 1964. V. 238. P. 2170.
- Thomashow M.F. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance // Ibid. 1998. V. 118. № 1. P. 1–7.

Changes in the Activity of Proteases and Trypsin Inhibitors in Wheat Leaves in the Initial Period of Cold Hardening and Subsequent Dehardening

S. A. Frolova and A. F. Titov

*Institute of Biology, Karelian Research Center, Russian Academy of Sciences,
ul. Pushkinskaya 11, Petrozavodsk, Karelia, 185910 Russia
e-mail: frolova@bio.krc.karelia.ru*

Abstract—The dynamics of amidase, cysteine protease, and trypsin inhibitor activities were studied in the leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings grown under controlled conditions (25°C, illuminance 10 kLx, 14-h photoperiod) and subjected to cold hardening (5°C, 10 kLx, 14-h photoperiod). Changes in the activity of amidases and cysteine proteases proved to precede an increase in cold resistance during cold hardening and a decrease in cold resistance after the end of cold hardening. The activity of trypsin inhibitors changed only during cold hardening. It is suggested that amidases, cysteine proteases, and trypsin inhibitors are involved in the cold adaptation of plants.