

## **ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗАКАЛИВАНИЯ НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ В ЛИСТЯХ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ**

**С. А. ФРОЛОВА, Ю. В. ВЕНЖИК, А. Ф. ТИТОВ**

*Институт биологии Карельского научного центра РАН*

На проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) изучена динамика активности амидаз, цистеиновых протеиназ, а также содержания фотосинтетических пигментов при холодовом (4°C) закаливании. Показано, что увеличение активности амидаз и цистеиновых протеиназ предшествует повышению холодоустойчивости проростков и сопровождается снижением количества хлорофиллов в их листьях. Повышение устойчивости в процессе закаливания происходило на фоне постепенного снижения активности протеиназ и увеличения содержания фотосинтетических пигментов. Предполагается, что отмеченные выше изменения носят адаптивный характер.

### **S. A. FROLOVA, Yu. V. VENZHIK, A. F. TITOV. INFLUENCE OF COLD HARDENING ON THE PROTEINASE ACTIVITY AND CONTENTS OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN WINTER WHEAT SEEDLINGS**

The dynamics of the activity of amidases, cysteine proteinases and contents of photosynthetic pigments under effect of cold hardening (4°C) has been studied in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Changes in the activity of amidases and cysteine proteinases preceded the increase of cold-resistance, and were accompanied by the decrease in chlorophyll content in leaves. The increment of cold-resistance during hardening was accompanied by gradual decrease in the activity of proteinases and restoration of chlorophyll content. It is suggested that these changes are involved in the cold adaptation of plants.

Известно, что пигменты образуют с белками достаточно стабильные комплексы, которые в мембранах тилакоидов хлоропластов объединяются в «светособирающие антенны» и принимают участие в процессе фотосинтеза (Мокроносков и др., 2006). Метаболизм белков хлоропластов, в свою очередь, подобно всем клеточным белкам, слагается из двух одновременно протекающих процессов синтеза и распада, одним из главных способов регуляции которых является протеолиз. Однако вопрос о возможном влиянии протеиназ на пигмент-белковые комплексы хлоропластов до сих пор остается недостаточно изученным.

В связи с этим целью данной работы явилось исследование холодового закаливания на

активность амидаз и цистеиновых протеиназ и содержание фотосинтетических пигментов.

#### **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 постоянных условиях. По достижении недельного возраста их подвергали в течение 7 сут. воздействию закалывающей температуры 4°C (рис. 1).

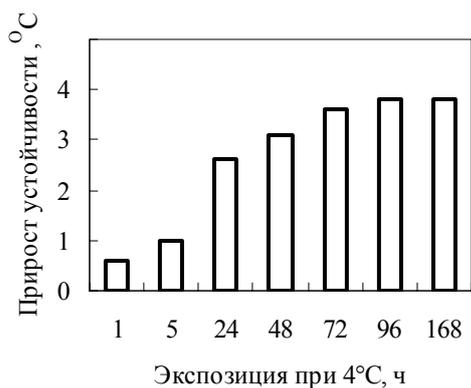


Рис. 1. Влияние низкой закалывающей температуры (4°C) на холодоустойчивость клеток листьев проростков озимой пшеницы с. Московская 39

О холодоустойчивости проростков судили по температуре, вызывающей гибель 50% палисадных клеток паренхимы листовых высечек (ЛТ<sub>50</sub>) после их 5-минутного промораживания в термоэлектрическом микрохолодильнике (Балагурова и др., 1982).

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

Содержание хлорофиллов и каротиноидов определяли спектрофотометрически (Гавриленко, Жигалова, 2003). Расчет доли хлорофиллов в ССК от их суммы производили с учетом того, что, во-первых, весь хлорофилл *b* находится в ССК и, во-вторых, отношение хлорофиллов *a/b* в ССК равно 1,2 (Lichtenthaler, 1987).

На рисунках приведены средние значения по 3-5 независимым опытам. Обсуждаются величины, достоверные при  $P \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Исследования показали, что воздействие температуры 4°C на проростки пшеницы уже через 1 час вызывало небольшое, но достоверное увеличение устойчивости клеток листьев, а к концу четвертых суток она достигала своего максимального значения, сохраняясь в дальнейшем на достигнутом уровне (рис. 1).

Наряду с этим в процессе закаливания у растений наблюдали определенные изменения в активности амидаз и цистеиновых протеиназ. Так, часовое воздействие температуры 4°C вызывало небольшое увеличение амидазной ак-

тивности, которое затем сменялось ее снижением (на 20% через 5 ч закалки и на 40% – через 24 ч) (рис. 2а). При достижении максимального уровня устойчивости (на 4-е сут. закаливания) амидазная активность проростков пшеницы составляла 40% от максимальной и в дальнейшем она понижалась, достигая значений, характерных для контрольных (не подвергавшихся воздействию холода) растений того же возраста.

Активность цистеиновых протеиназ в начальный период охлаждения также увеличивалась, достигая максимума на вторые сутки закаливания (рис. 2б). Дальнейшее воздействие холода вызывало снижение активности данного фермента: на 20% от максимума на 4-е сут. закаливания и на 40% – на 7-е сут.

Анализ содержания в листьях фотосинтетических пигментов показал, что холодное закаливание проростков сопровождается изменением содержания как хлорофиллов, так и каротиноидов. Причем изменения общего содержания хлорофиллов и количества хлорофиллов в светособирающем комплексе (ССК) в целом имели сходную динамику: в течение первых суток закаливания оно снижалось, а затем при достижении максимальной холодоустойчивости постепенно возрастало (рис. 2в, г). Содержание хлорофиллов в фотосистемах (I+II) снижалось через 48 ч от начала закаливания, а затем оно также увеличивалось (рис. 2д). В отличие от этого содержание каротиноидов в течение первых 48 ч действия температуры 4°C сохранялось на одном уровне, после чего несколько возрастало (рис. 2е).

Таким образом, исследования показали, что повышение активности амидаз и цистеиновых протеиназ происходит в начальный период действия на растения пшеницы низкой закалывающей температуры, и оно предшествует росту холодоустойчивости. Это соответствует представлениям о том, что изменение нормальных условий жизнедеятельности сопровождается прежде всего усилением протеолитических процессов (Тарчевский, 2001). Вероятно, протеолитические ферменты, контролируя концентрацию белков и пептидов, участвуют в модификации и устранении биополимеров, уже не выполняющих (или выполняющих не в полной мере) в изменившихся температурных условиях присущие им функции, а также обеспечивают клетку (в той или иной степени) мономерными субстратами для синтеза *de novo* белков, которые участвуют в формировании и поддержании холодоустойчивости клеток.

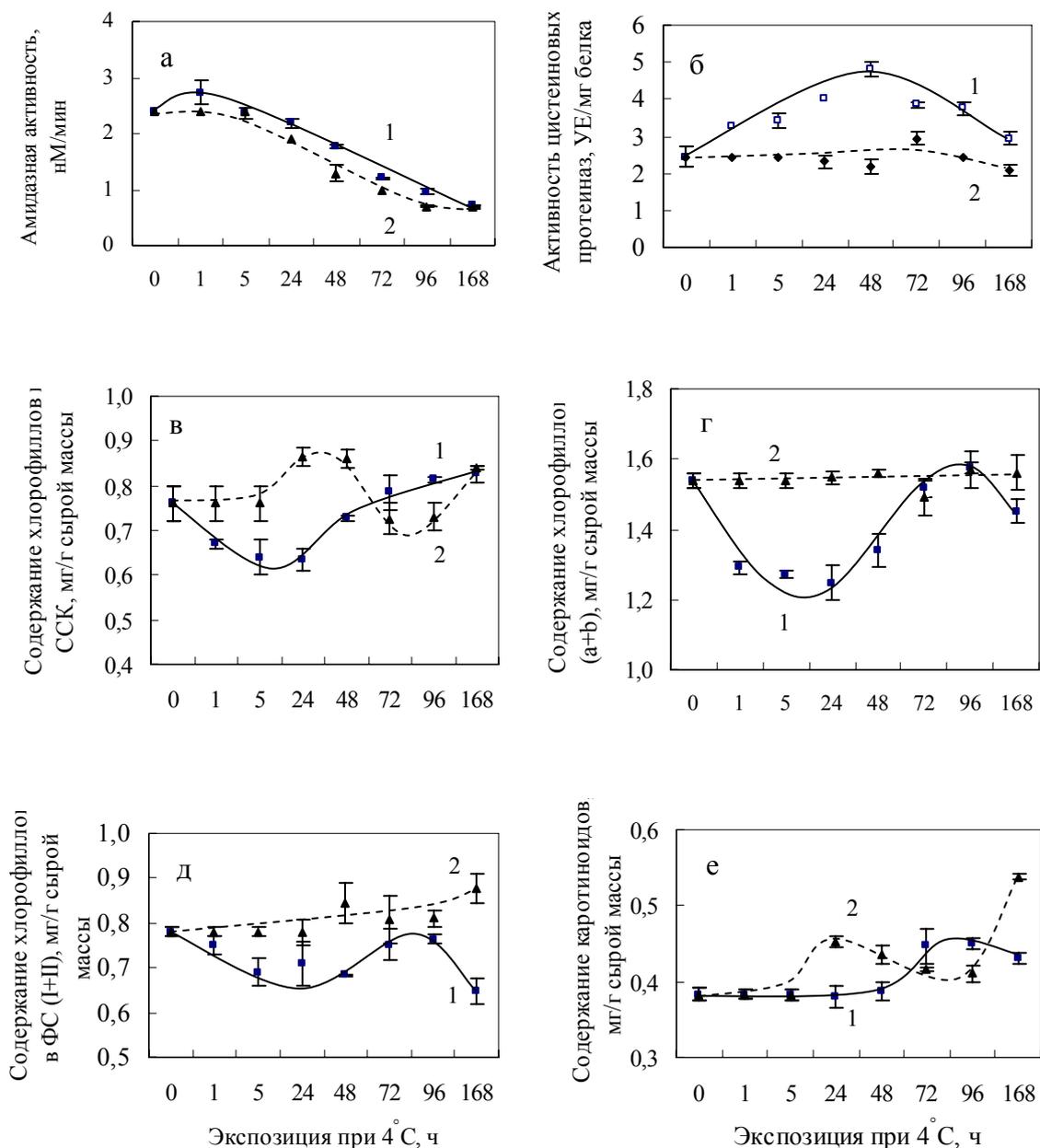


Рис. 2. Влияние холодного закаливания на активность протеиназ и содержание фотосинтетических пигментов в листьях проростков озимой пшеницы с. Московская 39 (1 – закаливание при 4°С, 2 – контроль)

Помимо этого, в процессе формирования холодоустойчивости по мере увеличения активности амидаз и цистеиновых протеиназ снижается общее содержание хлорофиллов, количество пигментов ССК, а также хлорофиллов в составе фотосистем (I+II). Из литературы известно, что биосинтез хлорофиллов тесно связан с общим метаболизмом клетки (Литвин, 2000). В частности, метаболиты, образующиеся в ходе обмена белков с участием протеиназ, могут контролировать отдельные звенья синтеза тетрапирролов в клетке (а именно этапа фототрансформации протохлорофиллида в хлорофиллид) (Мокроносов и др., 2006). Поэтому увеличение ак-

тивности протеиназ в начальный период действия низкой температуры, по-видимому, может способствовать некоторым изменениям (замедлению или полному прекращению) в синтезе пигментов и, как следствие, снижению содержания хлорофиллов. Кроме того, протеиназы хлоропластов, воздействуя на мембранные белки, а также на белки, непосредственно входящие в состав пигмент-белковых комплексов, вызывают целый ряд изменений в составе и конформации белковых молекул, что приводит к нарушению стабильности микроокружения пигментов (Мокроносов и др., 2006).

Интересно также отметить, что наблюдаемое (через 1-2 сут.) под влиянием закаливания постепенное снижение активности протеиназ происходит на фоне увеличения содержания хлорофиллов и каротиноидов. Повышение содержания пигментов в ССК, а также каротиноидов, способных сдерживать развитие фотодеструктивных процессов (Haldimann, 1996; Маслова и др., 1996), можно рассматривать в качестве адаптивной реакции фотосинтетического аппарата растений на действие пониженных температур (Maslova, Popova, 1993). Помимо этого, при достижении максимальной холодоустойчивости, скорее всего, стабилизируется структура пигмент-белковых комплексов хлоропластов.

Резюмируя итоги исследования, следует сказать, что полученные нами данные позволяют предполагать наличие определенной взаимосвязи между изменением активности протеолитических ферментов и содержанием фотосинтетических пигментов в начальный период действия низкой закаливающей температуры, что, вероятнее всего, имеет адаптивный характер и связано с формированием и поддержанием повышенной холодоустойчивости растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 06-04-49107а).

## **Литература**

- Балагурова Н. И., Дроздов С. Н., Хилков Н. И. 1982. Метод определения устойчивости растительных тканей к замораживанию. Петрозаводск. 6 с.
- Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В. 2003. Большой практикум по фотосинтезу. М.: Издательский центр «Академия». 241 с.
- Литвин Ф. Ф. 2000. Биосинтез хлорофилла и формирование реакционных центров фотохимических систем фотосинтеза // Успехи биологической химии. Т. 40. С. 3-42.
- Маслова Т. Г., Попова И. А., Корнюшенко Г. А., Королева О. Я. 1996. Развитие представлений о функциях виолоксантинового цикла в фотосинтезе // Физиология растений. Т. 43. № 3. С. 437-439.
- Мокронос А. Т., Гавриленко В. Ф., Жигалова Т. В. 2006. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты: учебник для студ. вузов. М.: Издательский центр «Академия». 448 с.
- Тарчевский И. А., 2001. Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн. 448 с.
- Erlanger D. F., Kokowsky N., Cohen W. 1961. Proteinases activity in biological substrats // Arch. Biochem. Biophys. V. 95. N 2. P. 271-278.
- Haldimann P. 1996. Effects of changes in grow temperature on photosynthesis and carotenoids composition in Zea mays leaves // Physiol. Plant. V. 97. P. 554-562.
- Lichtenthaler H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids – pigments of photosynthetic biomembranes // Methods in enzymology. New York. V. 148. P. 350-382.
- Maslova T. G., Popava I. A. 1993. Adaptive properties of plant pigment systems // Photosynthetica. V. 29. P. 195-203.
- Sgarbieri V. C., Gupte S. M., Kramer D. E., Whitaker J. R. 1964. Ficus enzymes. I. Separation of the proteolytic enzymes of Ficus carica and Ficus glabrata lattices // J. Biol. Chem. V. 238. P. 2170.