

На правах рукописи



ФРОЛОВА
Светлана Анатольевна

**ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ
НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНАЗНО-ИНГИБИТОРНОЙ
СИСТЕМЫ РАСТЕНИЙ**

03.00.04 – биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

1 3 4 9 1 2 0 0 8

Петрозаводск
2008

Работа выполнена в лаборатории экологической физиологии растений
Института биологии Карельского научного центра РАН

Научный руководитель: чл.-корр. РАН, доктор биологических наук,
профессор ТИТОВ Александр Федорович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
СМИРНОВ Лев Павлович

кандидат биологических наук, доцент
СУДАКОВА Надежда Михайловна

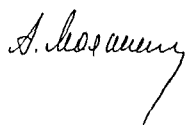
Ведущая организация: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится «26» ноября 2008 г. в 12.00 часов на заседании Диссертационного совета ДМ 212.087.02 при Карельском государственном педагогическом университете по адресу: 185035 Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 17.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Карельского государственного педагогического университета.

Автореферат разослан «24» октября 2008 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат медицинских наук, доцент



А.И. Малкиель

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Хорошо известно, что в период действия неблагоприятной температуры в клетках и тканях растительного организма происходят многочисленные структурно-функциональные изменения, часть из которых вовлечена в процесс формирования повышенной устойчивости (Туманов, 1979; Дроздов и др., 1984; Титов и др., 2006; Трунова, 2007). Однако имеющиеся по этому вопросу литературные данные касаются главным образом анаболических процессов и, прежде всего, синтеза стрессовых (шоковых) белков (Колесниченко, Войников, 2003; Титов и др., 2006; Guy, 1990; Antikainen, Griffith, 1997; Griffith et al., 1997; Tomashow, 1999, 2001), в то время как роль катаболических процессов почти не изучена. Между тем одна из наиболее важных современных тенденций в выяснении тонких механизмов устойчивости растений к изменениям в окружающей среде, и действию неблагоприятных температур в частности, заключается в установлении характера взаимодействия между процессами синтеза и распада белков (Тарчевский, 2001). В условиях стресса уровень «неправильно синтезированных» или поврежденных белков может достичь критических значений и вызвать гибель клетки (Колесниченко, Войников, 2003). Поэтому важную роль в обмене веществ живого организма и защите его от повреждения играют протеолитические ферменты, участвуя не только в деградации белковых молекул, но и в регуляции различных физиолого-биохимических процессов посредством реакций ограниченного протеолиза (Мосолов, 1993). Основными регуляторами активности протеиназ являются белки-ингибиторы, способные образовывать с ними стабильные комплексы и приводить к обратимому подавлению активности протеолитических ферментов. В настоящее время установлено, что в процессах защиты растений от действия различного рода неблагоприятных факторов значительная роль принадлежит системе протеиназа-ингибитор (Мосолов, Валуева, 2008; Johnston et al., 2006). Однако роль протеиназно-ингибиторной системы в адаптации растений и формировании повышенной холодоустойчивости почти не изучена.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы – изучение активности протеиназно-ингибиторной системы растений в условиях действия низких закаливающих и повреждающих температур и определение ее возможной роли в механизмах устойчивости растений.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- изучить динамику активности амидаз, цистеиновых протеиназ, а также ингибиторов сериновых протеиназ (ингибиторов трипсина) у растений при действии на них низких температур;

- провести сравнительный анализ активности протеиназ и ингибиторов протеолитических ферментов в начальный период действия на растения низких закаливающих и повреждающих температур;
- изучить динамику активности протеолитических ферментов и ингибиторов протеиназ в последствии низкой закаливающей температуры;
- исследовать влияние экзогенных гормонов (АБК, цитокинина) на активность протеиназно-ингибиторной системы растений при действии низких закаливающих температур;
- исследовать экспрессию генов протеолитических ферментов и их ингибиторов в процессе формирования повышенной холодоустойчивости растений.

Научная новизна работы. Впервые изучена динамика активности амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина в период действия и в последствии низкой закаливающей температуры, а также показана их роль в механизмах формирования повышенной холодоустойчивости растений. Установлены различия в динамике активности протеиназ и ингибиторов трипсина в начальный период действия на растения низких закаливающих и повреждающих температур. Показано влияние экзогенных фитогормонов (АБК, цитокинина) на изменение активности протеиназно-ингибиторной системы и формирование повышенной холодоустойчивости растений. Получены новые данные об экспрессии генов *clpP* и *lon1*, а также генов цистеиновых протеиназ (*cp*) и их ингибиторов в процессе холодого закаливания растений.

Практическая значимость работы. Полученные экспериментальные данные дополняют и расширяют современные представления о роли протеолитических ферментов, ингибиторов протеиназ и их генов в адаптации растений к действию неблагоприятных факторов внешней среды и, в частности, низкой температуры. Данная информация может найти применение в физиолого-биохимических и селекционно-генетических исследованиях, направленных на повышение устойчивости растений и разработку методов ее диагностики. Основные положения работы могут быть использованы при чтении спецкурсов по экологической биохимии, частной энзимологии, а также физиологии устойчивости растений.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены и обсуждались на конференции «Структурные особенности биосистем Севера (особи, популяции, сообщества) (Петрозаводск, 2005), Международной научной конференции «Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы», посвященной 200-летию Казанской ботанической школы (Казань, 2006), Шко-

ле для студентов и молодых ученых «Физиология растений – фундаментальная основа современной агробиотехнологии» (Ростов на Дону, 2006), Международной конференции, посвященной 60-летию КарНЦ РАН «Сверная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика» (Петрозаводск, 2006), VI Симпозиуме «Химия протеолитических ферментов» (Москва, 2007), VI Съезде Общества физиологов растений (Сыктывкар, 2007), Молодежной научной конференции «Геоферно-биосферные взаимодействия, биоразнообразие и состояние биосистем в высоких широтах» (Апатиты, 2007), Всероссийской конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века» (Петрозаводск, 2008).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах, содержит 2 таблицы, 31 рисунок. Работа состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 302 наименования, в том числе 224 на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую и искреннюю признательность своим учителям и наставникам: научному руководителю чл.-корр. РАН, д.б.н. А.Ф. Титову, чл.-корр. РАН, д.б.н. Н.Н. Немовой, а также сотрудникам лаборатории экологической физиологии растений Института биологии КарНЦ РАН. Самые теплые слова благодарности к.б.н. Е.В. Иевлевой за всестороннюю помощь, ценные советы и рекомендации, а также сотрудникам группы молескулярной биологии Института биологии КарНЦ РАН к.б.н. Л.В. Топчиевой и к.б.н. И.Е. Малышевой за помощь в постановке экспериментов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 7-дневных проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Московская 39 и огурца (*Cucumis sativus* L.) сорта Зозуля. Выбранные виды растений характеризуются разным отношением к температурному фактору: пшеница относится к группе холодостойких видов, а огурец – к группе теплолюбивых.

Растения выращивали в рулонах фильтровальной бумаги на питательном растворе Кнопа (рН 6.2–6.4) с добавлением микроэлементов в камере искусственного климата при температуре воздуха 22–25°C, его относительной влажности 60–70%, освещенности около 10 клк и 14-часовом фотопериоде. При

достижении недельного возраста проростки пшеницы подвергали действию температур 5, 10 или 15°C, а проростки огурца – 5 и 10°C (при неизменных прочих условиях).

О холодоустойчивости проростков судили по реакции клеток высечек из листьев на 5-мин промораживание в термоэлектрическом микрохолодильнике (Балагурова и др., 1982). В качестве критерия холодоустойчивости использовали температуру гибели 50% паренхимных клеток (JT_{50}), определяемую по деструкции хлоропластов и коагуляции цитоплазмы.

В ряде опытов использовали фитогормоны: цитокинин в форме 6-безиламинопурина (БАП) и абсцизовую кислоту (АБК), концентрации которых были выбраны на основании предыдущих исследований, проведенных в лаборатории (Титов и др., 1981, 1985, 1986). Растения помещали на растворы БАП и АБК за сутки до начала холодового воздействия.

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 определяли по модифицированному методу Кунитца (Sgarbieri et al., 1964).

Ингибиторную активность оценивали по подавлению активности ферментов (Morichara et al., 1967).

Уровень экспрессии генов *clpP*, *lon1*, а также генов цистеиновых протеиназ (*cp*) и их ингибиторов анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию проводили в приборе iQ5 (Био-Рад).

Биологическая повторность в пределах одного варианта опыта при анализе холодоустойчивости и активности ферментов – 6-кратная (каждый опыт повторяли 3–5 раз), а при анализе экспрессии генов – 2-кратная. Математическую обработку данных проводили с помощью общепринятых методов вариационной статистики (расчет средних арифметических значений и их стандартных ошибок, оценка достоверности различий – на основании критерия Стьюдента), используя программу Microsoft Excel. На рисунках приведены средние значения по 2–5 независимым опытам и средние квадратичные ошибки. В работе обсуждаются величины, достоверные при $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Влияние низкой закаливающей температуры на холодоустойчивость и активность протеиназно-ингибиторной системы растений

Проведенные нами опыты, в которых проростки озимой пшеницы морозостойкого сорта Московская 39 подвергали действию различных закалива-

щих температур (5, 10 и 15°C), показали, что под их влиянием холодоустойчивость пшеницы возрастает с неодинаковой скоростью (табл. 1). Так, при действии температуры 5°C устойчивость проростков начинала увеличиваться уже через 1 ч от начала холодого воздействия, а к концу 3-х сут достигала своего максимального значения, сохраняясь в дальнейшем неизменной. Температуры 10 и 15°C не вызывали изменений холодоустойчивости в первые двое суток закаливания, а через 4 сут она достигала при 10°C примерно 80% от максимального уровня, а при 15°C – около 60%. Таким образом, наибольшая скорость холодого закаливания, как и ожидалось, отмечена при действии на проростки пшеницы температуры 5°C.

Таблица 1

Динамика повышения устойчивости при холодом закаливании проростков пшеницы

Температура	Холодоустойчивость, % от максимального прироста					
	продолжительность закаливания, сут					
	1	2	3	4	5	7
5°C	81	97	100	100	100	100
10°C	0	0	70	83	95	100
15°C	0	0	0	60	72	100

Наряду с этим установлено, что в листьях проростков пшеницы, подвергнутых действию низких закаливающих температур (5, 10 и 15°C), происходят определенные изменения активности амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина, зависящие от интенсивности низкотемпературного воздействия.

В целом, изменения активности амидаз и цистеиновых протеиназ имели сходную динамику. В частности, в начальный период холодого воздействия их активность увеличивалась в первые часы – при 5°C, и в первые сутки – при 10°C (рис. 1, 2). Последующее действие закаливающей температуры приводило к некоторому снижению активности ферментов. При достижении максимального уровня холодоустойчивости амидазная активность продолжала уменьшаться, достигая значений, характерных для контрольных растений того же возраста (рис. 1), тогда как активность цистеиновых протеиназ сохранялась на уровне в 1.5–2 раза превышающем таковой у растений контрольного варианта (рис. 2).

Под влиянием закаливающей температуры 15°C (для пшеницы она близка к границе между зонами холодого закаливания и фоновой) происходило синхронное снижение амидазной активности как у контрольных, так и у опытных растений (рис. 1). Однако закаленные проростки по сравнению с контрольными того же возраста характеризовались более высокими значениями

амидазной активности (до момента выхода холодоустойчивости на постоянный уровень). Следует отметить, что достоверные различия в уровне активности амидаз у опытных растений по сравнению с контрольными наблюдались через 24 ч закаливания (т.е. за 2 сут до появления статистически достоверного прироста холодоустойчивости в данных условиях). В этих же условиях активность цистеиновых протеиназ лишь незначительно увеличивалась через 72 ч закаливания (рис. 2), а затем плавно снижалась, достигая к концу эксперимента значений на 10-15% превышающих таковые у контрольных проростков пшеницы.

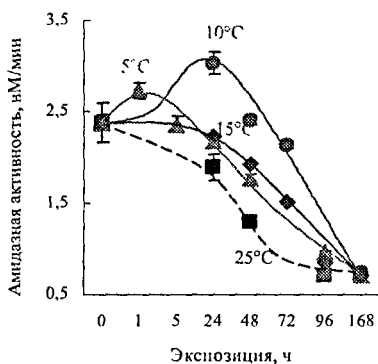


Рис. 1. Влияние температуры 5, 10, 15 и 25°C на амидазную активность проростков пшеницы

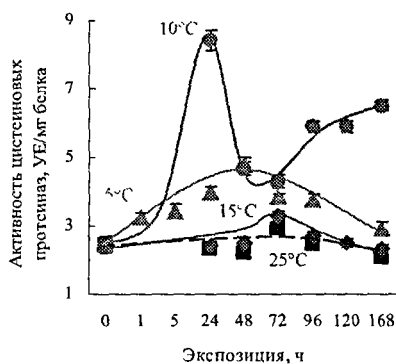


Рис. 2. Влияние температуры 5, 10, 15 и 25°C на активность цистеиновых протеиназ проростков пшеницы

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что повышение активности амидаз и цистеиновых протеиназ происходит в начальный период действия на растения пшеницы низкой закалывающей температуры (независимо от ее интенсивности), и оно предшествует росту холодоустойчивости. Полученные результаты соответствуют представлениям о том, что изменение нормальных условий жизнедеятельности сопровождается, прежде всего, усилением протеолитических процессов (Локшина, 1993; Тарчевский, 2001; Lensch et al., 2001; Zakharov et al., 2004; Johnston et al., 2006). Вероятно, контролируя концентрацию белков и пептидов, амидазы и цистеиновые протеиназы участвуют в модификации и устранении биополимеров, уже невыполняющих (или выполняющих не в полной мере) необходимые организму функции, а также обеспечивают клетку мономерными субстратами для синтеза стрессовых (шоковых) белков, которые, как показано многими авторами

(Титов, 1989; Кузнецов, 1992; Войников и др., 2004; Титов и др., 2006; Трунова, 2007), участвуют в формировании повышенной устойчивости клеток.

Активность ингибиторов трипсина в течение первых двух суток холодового закаливания увеличивалась одновременно с ростом устойчивости, тогда как последующее действие температуры 5°C приводило к снижению остаточной протеолитической активности (рис. 3).

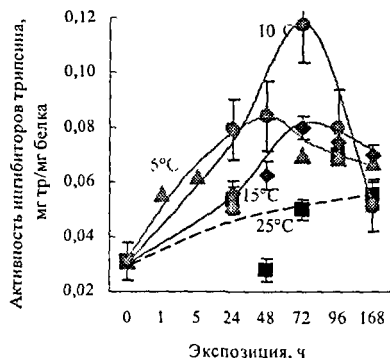


Рис. 3. Влияние температуры 5, 10, 15 и 25°C на активность ингибиторов трипсина проростков пшеницы

увеличение активности ингибиторов трипсина определяется их способностью обратимо связывать ферменты и переводить их в неактивное состояние (Мосолов, Валуева, 1993). Таким образом, выступая в качестве регуляторов активности протеиназ, ингибиторы трипсина предотвращают преждевременный распад вновь синтезированных белков, тем самым, поддерживая процесс формирования повышенной устойчивости.

Опыты, в которых проростки огурца подвергались действию низкой закаливающей температуры (10°C), показали, что повышение холодоустойчивости клеток листа происходит не сразу, а по истечении некоторого времени (рис. 4). Указанный лаг-период, т.е. период времени, в течение которого устойчивость растений достоверно не увеличивалась, составил примерно 8 ч. Последующее воздействие температуры 10°C вызывало увеличение устойчивости, которая достигала своего максимального уровня на 4-е сут закаливания.

В процессе повышения холодоустойчивости в листьях огурца активность цистеиновых протеиназ сохранялась на уровне, характерном для 7-дневных

Под влиянием температуры 10°C увеличение активности ингибиторов трипсина происходило уже в течение первых суток закаливания и предшествовало росту холодоустойчивости. При достижении устойчивости максимума активность ингибиторов снижалась, достигая уровня контрольных (не подвергавшихся закаливанию) растений того же возраста. При действии температуры 15°C остаточная протеолитическая активность по отношению к трипсину увеличивалась на 3-и сут закаливания проростков пшеницы, оставаясь в дальнейшем на достигнутом уровне. Отмеченное в процессе повышения устойчивости

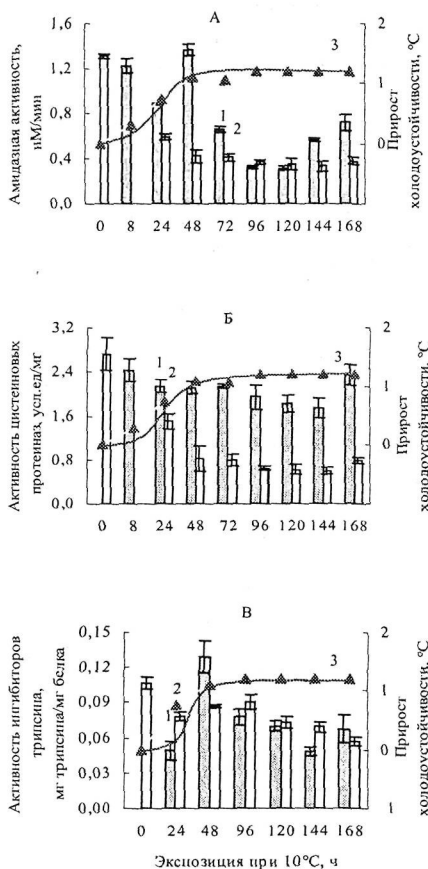


Рис. 4. Влияние температуры 10°C на активность амидаз (А), цистеиновых протеиназ (Б) и ингибиторов трипсина (В) проростков огурца (1 – закалика, 2 – контроль, 3 – холодоустойчивость)

увеличение амилазной активности, в то время как при выходе устойчивости на плато активность указанных ферментов снижалась, достигая в большинстве случаев величин, характерных для контрольных (не подвергавшихся температурному воздействию) растений. Вместе с тем, повышенный уровень активности цистеиновых протеиназ можно было наблюдать на протяжении всего

проростков (рис. 4Б), который, однако, превышал таковой у контрольных растений того же возраста.

Важно, что изменения активности амидаз и ингибиторов трипсина в целом имели сходную динамику: в течение первых суток холодового закаливания их активность резко снижалась в 1.5 раза – для амидаз (рис. 4А) и в 2 раза – для ингибиторов трипсина (рис. 4В). Еще через сутки активность вышеуказанных показателей возвращалась к исходным значениям (до начала холодового закаливания), а к моменту выхода холодоустойчивости на постоянный уровень активность ингибиторов трипсина снижалась, достигая значений, характерных для контрольных растений того же возраста, тогда как активность амидаз к концу эксперимента была несколько выше, чем в контроле.

Необходимо отметить некоторые особенности изменения активности протеолитических ферментов в процессе низкотемпературной адаптации холодоустойчивых (пшеница) и теплолюбивых (огурец) растений. В частности, в начальный период роста холодоустойчивости было отмечено увеличение

процесса закаливания, что, вероятнее всего, свидетельствует об их участии в процессах, связанных не только с ростом холодоустойчивости, но и поддержанием ее на повышенном уровне как у холодостойких, так и у теплолюбивых растений.

Таким образом, в процессе формирования повышенной холодоустойчивости как холодостойких (пшеница), так и теплолюбивых (огурец) растений увеличение активности амидаз, цистеиновых протеиназ, и ингибиторов трипсина предшествует по времени росту их холодоустойчивости. Возрастающая активность протеолитических ферментов в начальный период воздействия низкой температуры вызывает распад белков в растениях и, вероятно, протеиназы, участвуя в модификации белков и пептидов, контролируют концентрацию биополимеров, необходимых для жизнедеятельности растений в новых температурных условиях. Усиление активности ингибиторов протеиназ, регулирующих активность ферментов, в свою очередь, предотвращает преждевременный распад белков, синтезированных *de novo*, обеспечивая тем самым поддержание повышенного уровня холодоустойчивости.

2. Активность протеиназно-ингибиторной системы растений в начальный период действия закаливающих и повреждающих температур

В начальный период действия на растения не только закаливающих, но и повреждающих температур устойчивость некоторых клеточных функций может увеличиваться, по крайней мере, до тех пор, пока доза температурного воздействия не достигнет определенного порогового уровня, вызывающего появления серьезных структурно-функциональных нарушений (Alexandrov et al., 1990). С другой стороны, достаточно продолжительное действие повреждающих температур на растения вызывает снижение их устойчивости, нарушение многих функций и повреждение различных внутриклеточных структур, что в конечном итоге приводит к гибели клеток, тканей и организма (Титов и др., 2006).

Результаты наших опытов показали, что под влиянием низкой повреждающей температуры (5°C) холодоустойчивость проростков огурца снижалась на протяжении всего периода ее действия. Одновременно с этим происходило увеличение активности цистеиновых протеиназ, отмечаемое уже через 15 мин (рис. 5Б) от начала холодового воздействия. Амидазная активность также увеличивалась (рис. 5А), однако рост ее наблюдался несколько позже – через 3 ч. Активность ингибиторов трипсина уже через 15 мин экспонирования проростков огурца при 5°C увеличивалась в 2.5 раза, а затем на протяжении всего эксперимента постепенно снижалась (рис. 5В).

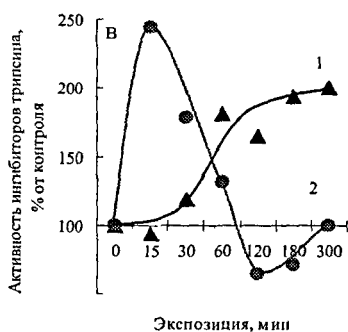
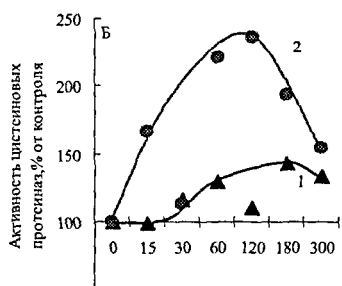
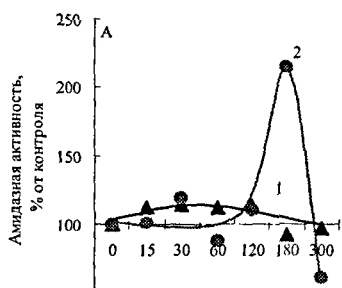


Рис. 5. Динамика активности амидаз (А), цистеиновых протеиназ (Б) и ингибиторов трипсина (В) проростков огурца при действии низкой закаливающей (1) и повреждающей (2) температур

Очевидно, что увеличение активности амидаз и цистеиновых протеиназ свидетельствует о начавшихся уже в первые часы действия низкой повреждающей температуры деструктивных процессах, которые необходимо блокировать и обеспечить восстановление нарушенных или поврежденных структур и функций. Вероятно, именно на это и направлено наблюдаемое в первые минуты повреждения увеличение активности ингибиторов протеиназ. Последующее увеличение активности протеиназ и снижение активности ингибиторов трипсина, уже не справляющихся в данных условиях с нарастающим влиянием протеолиза, сопровождается снижением холодоустойчивости растений, разрушением различных клеточных структур, которое в конечном итоге приводит к гибели клеток, тканей и организма в целом.

В результате сравнительного анализа изменений, возникающих в клетках огурца под влиянием низкой закаливающей (10°C) и повреждающей (5°C) температур, было установлено, что активность амидаз у растений в первые 2 ч охлаждения практически не отличалась, тогда как дальнейшее действие температуры 5°C вызывало значительное (в 2 раза) ее увеличение (рис. 5А). С другой стороны, в начальный период действия закалывающих и

повреждающих температур были выявлены существенные различия в активности цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина. В частности, уже через 15 мин воздействия повреждающей температуры активность цистеиновых протеиназ значительно превышала таковую в условиях закаливания (рис. 5Б), а активность ингибиторов трипсина была в 2.5 раза выше при действии закаливающей температуры (рис. 5В). Таким образом, амплитуда изменений активности протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина при холодовом повреждении растений гораздо выше, чем в условиях низкотемпературного закаливания.

3. Динамика активности протеиназно-ингибиторной системы растений в последствии низкой закаливающей температуры

Как известно, при благоприятных условиях в последствии низких закаливающих температур происходит снижение устойчивости – раззакаливание растений (Титов и др., 2006).

В наших экспериментах при возврате проростков пшеницы закаленных в течение 7 сут при температуре 5°C в исходные условия (25°C) наблюдалось снижение их устойчивости. Так, через 24 ч после прекращения воздействия на растения низкой закаливающей температуры их холодоустойчивость начала снижаться, достигая исходного уровня на 7-е сут (рис. 6).

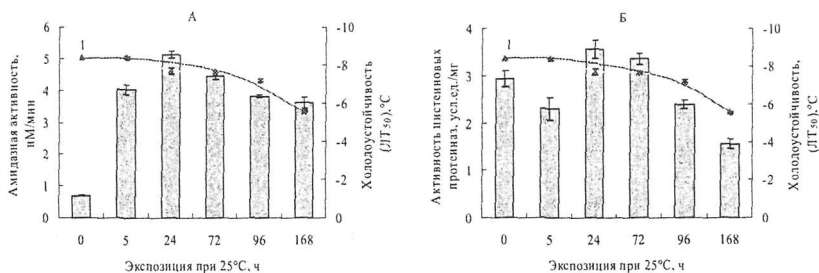


Рис. 6. Динамика активности амидаз (А) и цистеиновых протеиназ (Б) проростков пшеницы после их холодового закаливания (5°C x 7 сут) (1- холодоустойчивость)

Наряду с этим у проростков пшеницы наблюдались определенные изменения активности протеолитических ферментов и ингибиторов протеиназ. Например, амидазная активность уже через 5 ч после возвращения проростков в исходные условия увеличивалась (рис. 6А), в течение последующих суток достигала своего максимума и далее постепенно снижалась. При возврате

закаленных растений пшеницы в обычные условия (25°C) активность цистеиновых протеиназ в течение первых суток раззакаливания возрастала в 1.5 раза, сохраняясь на данном уровне еще 2 сут и далее продолжала до конца эксперимента снижаться (рис. 6Б).

При раззакаливании растений пшеницы активность ингибиторов трипсина, в отличие от активности амидаз и цистеиновых протеиназ, не изменялась.

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

Вместе с тем, учитывая, что в последствии низкой закаливающей температуры изменений активности ингибиторов трипсина обнаружено не было, логично думать, что при возвращении растений в условия физиологически нормальной температуры 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.

4. Влияние экзогенных гормонов на активность протеиназно-ингибиторной системы растений при действии низкой закаливающей температуры

Абсцизовая кислота В результате проведенных экспериментов с применением экзогенной АБК установлено, что она способствует увеличению холодоустойчивости клеток листа. Так, предобработка проростков пшеницы АБК перед началом воздействия низкой закаливающей температуры приводила к дополнительному увеличению холодоустойчивости: уже к концу первых суток от начала температурного воздействия она достигала уровня, превосходящего значения, характерные для варианта «закаливание без АБК».

Следует отметить, что через 24 ч после обработки растений раствором АБК активность цистеиновых протеиназ была в 2 раза меньше, чем у контрольных растений, а активность амидаз и ингибиторов трипсина превышала таковые в контроле в 2-3 раза.

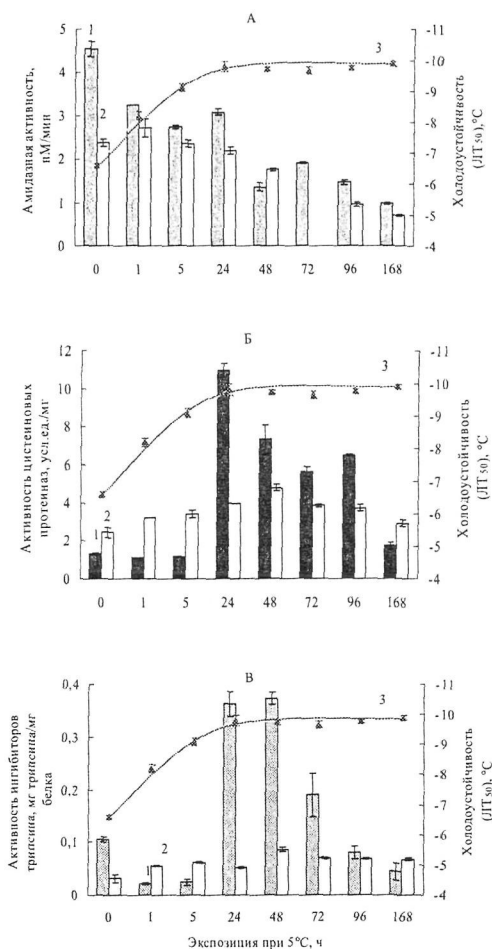


Рис. 7. Влияние экзогенной АБК (10^{-4} М) на активность амидаз (А), цистеиновых протеиназ (Б) и ингибиторов трипсина (В) проростков пшеницы при низкотемпературном закаливании (1 - закаливание+АБК, 2 - закаливание без АБК, 3 - устойчивость)

через 1-8 ч воздействия низкой закаливающей температуры в листьях пшеницы содержание эндогенной АБК возрастает, несколько снижается к концу

В процессе холодого закаливания у растений, подвергшихся предварительной обработке АБК, изменения амидазной активности имели сходную динамику, что и у растений закаленных без АБК (рис. 7А). Важно, что уже через 1 ч после начала низкотемпературного воздействия у предобработанных АБК проростков пшеницы активность амидаз снижалась в 1.5 раза и сохранялась на достигнутом уровне в течение последующих суток. В первые часы воздействия низкой закаливающей температуры активность цистеиновых протеиназ у проростков, обработанных АБК, практически не менялась, через 1 сут резко увеличивалась, а к концу эксперимента снижалась (рис. 7Б). Активность ингибиторов трипсина в начальный период закаливания несколько уменьшалась, в течение следующих суток на порядок увеличивалась, а к концу эксперимента снова снижалась, достигая значений, характерных для контрольных растений того же возраста (рис. 7В).

Литературные данные свидетельствуют, что уже

первых суток, затем продолжает увеличиваться (в течение 3–4 сут), и далее постепенно возвращается к исходной величине, в то время как устойчивость сохраняется на достигнутом уровне (Таланова и др., 1991). Вероятно, увеличение активности цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина в более поздние периоды адаптации связано с накоплением в растениях АБК, индуцирующей синтез стрессовых белков.

В наших экспериментах показано, что на начальном этапе действия низкой закалывающей температуры на фоне постепенного роста холодоустойчивости у проростков пшеницы, предобработанных АБК, по сравнению с контрольными растениями того же возраста отмечается повышенное содержание амидаз и пониженное – цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина. В дальнейшем, при достижении устойчивости максимальных значений активность амидаз постепенно снижается, а активность цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина повышается. Вероятно, указанные изменения связаны с комплексом событий, связанных с синтезом и распадом белка в клетках растений при действии неблагоприятных температур, часть из которых направлена на формирование устойчивости, а другая – на поддержание ее повышенного уровня. Поэтому, вполне логично, что АБК может влиять на холодоустойчивость растений к низкой температуре посредством изменения активности протеолитических ферментов и главных регуляторов их деятельности – белковых ингибиторов.

Цитокинин. Природные цитокинины и их синтетические аналоги оказывают значительное влияние не только на деление, рост и дифференцировку клеток (Полевой, 1982; Кулаева, Кузнецов, 2002), но и на физиологические реакции растений, связанные с воздействием на них неблагоприятных факторов среды, включая экстремальные температуры (Nage et al., 1997).

В наших опытах показано, что спустя 24 ч после обработки растений озимой пшеницы БАП (2 мг/л) в их листьях активность амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина была в 1,2, 2 и 4 раза, соответственно, выше по сравнению с контролем.

При последующем холододовом закаливании (5°C) в присутствии БАП скорость и величина прироста холодоустойчивости проростков пшеницы заметно превышали таковые в контрольном варианте (закаливание без БАП). Кроме того, в первые двое суток холододового закаливания активность амидаз у растений была в 1,5–2 раза меньше, чем у растений закаленных без БАП, а спустя трое суток действия низкой температуры активность изучаемых ферментов увеличивалась и сохранялась на достигнутом уровне до конца эксперимента (рис. 8А).

Уже в первые часы закаливания в листьях пшеницы наблюдались значительные изменения в активности цистеиновых протеиназ. В частности, через

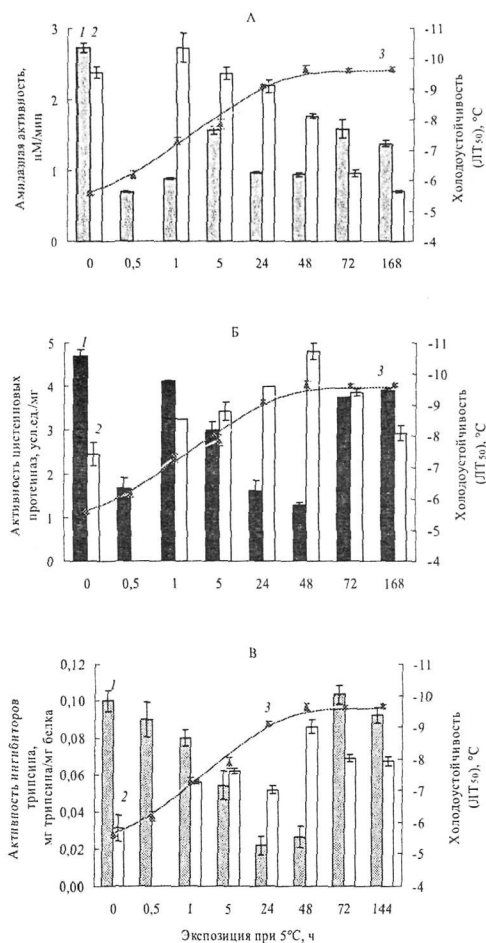


Рис. 8. Влияние БАП (2 мг/л) на активность аминдаз (А), цистеиновых протеиназ (Б) и ингибиторов трипсина (В) проростков пшеницы при низкотемпературном закаливании (1 - закалывание+БАП, 2 - закалывание без БАП, 3 - устойчивость)

объяснить стимулирующим влиянием цитокининов на биосинтез белков (в том числе стрессовых) и, соответственно, на ряд физиолого-биохимических процессов прямо или опосредованно участвующих в поддержании структур-

30 мин она снижалась в 2.5 раза, в течение последующих 30 мин увеличивалась в 2 раза, через 48 ч постепенно снижалась, и далее увеличивалась, достигая к 3-м сут закалывания значений, характерных для проростков, закаленных без БАП (рис. 8Б).

Активность ингибиторов трипсина у проростков, закаленных в присутствии БАП, постепенно снижалась в первые 2 сут, еще через 1 сут увеличивалась в 5 раз, оставаясь до конца эксперимента на уровне, превышающем таковой у контрольных растений (рис. 8В).

Интересно отметить, что через 3-е сут холодого закалывания после непродолжительного снижения активность как ингибиторов трипсина, так и протеолитических ферментов увеличивалась, достигая значений, характерных или несколько превышающих таковые у контрольных растений того же возраста.

Из литературы известно, что увеличение устойчивости растений к действию неблагоприятных температур под влиянием БАП можно

но-функциональной целостности клеток в процессе адаптации (Шакирова, 2001; Титов и др., 2006).

В наших экспериментах показано, что действие цитокинина на растения вызывало увеличение активности амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина до начала холодового воздействия, тогда как в процессе закаливания цитокинины ингибировали распад белков (посредством снижения активности протеиназ и увеличения активности ингибиторов протеолитических ферментов).

Таким образом, цитокинины создают благоприятную обстановку для биосинтеза белков, запуск которого является следствием изменения температуры окружающей среды с физиологически нормальной на закалывающую. В отличие от этого, в начальный период действия на растения низкой закалывающей температуры цитокинины, вызывая снижение активности амидаз и цистеиновых протеиназ и увеличение активности ингибиторов трипсина (по сравнению с контролем), вероятно, оказывают защитный эффект на белоксинтезирующий аппарат клеток, который проявляется в предотвращении его деградации в условиях воздействия неблагоприятных факторов.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что наиболее существенные изменения в активности протеиназно-ингибиторной системы под влиянием АБК и цитокининов происходят сразу после обработки гормонами проростков пшеницы, т.е. до начала холодового воздействия. Поскольку экзогенные АБК и цитокинины способны в отсутствии стресс-факторов вызывать экспрессию генов шоковых (стрессовых) белков (Robertson et al., 1994; Jackson, 1997; Pareek et al., 1997; Шакирова, 2001), то можно предположить, что обнаруженное в данной работе увеличение активности амидаз направлено на изменение спектра белков, синтезируемых в этот период, и способствующих дальнейшему повышению устойчивости. Ингибиторы трипсина, выступая в данном случае в качестве регуляторов активности протеиназ, предотвращают преждевременный распад вновь синтезированных белков и поддерживают тем самым процесс формирования повышенной устойчивости.

5. Экспрессия генов протеолитических ферментов и ингибиторов протеиназ при холодовом закаливании растений

Адаптация растений к неблагоприятной температуре сопровождается экспрессией большого числа генов (Колесниченко, Войников, 2003). В наших опытах по определению экспрессии генов протеиназ и их ингибиторов уже в начальный период холодового закаливания одновременно с ростом холодоустойчивости в листьях проростков пшеницы происходило достаточно быстрое (через 0.5 ч) увеличение уровня экспрессии гена *ср*, кодирующего цис-

теиновую протеиназу (рис. 9А). При более продолжительном низкотемпературном воздействии (1–3 сут) содержание мРНК гена *cp* постепенно снижалось, а через 4 сут (при достижении холодоустойчивости своего максимума) возвращалось к исходному уровню (25°C).

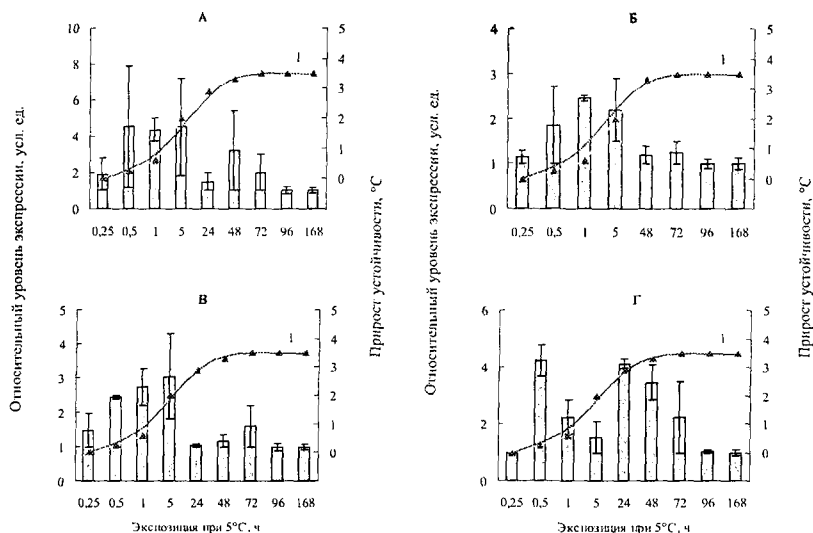


Рис. 9. Влияние температуры 5°C на холодоустойчивость (1) и экспрессию генов *cp* (А), генов ингибиторов цистеиновых протеиназ (В), *lon1* (Б) и *clpP* (Г) генов проростков пшеницы (уровень экспрессии у растений контрольного варианта (25°C) принят за единицу)

Аналогичные изменения наблюдались и в экспрессии гена *lon1* (рис. 9Б), кодирующего *Lon* протеиназы, которые локализованы, главным образом, в митохондриях и тилакоидах хлоропластов и участвуют в деградации белков с участием АТФ. Вероятно, наблюдавшееся в наших опытах снижение экспрессии *lon1* гена до исходного уровня уже на 2-е сут закаливания можно рассматривать как свидетельство начавшихся процессов стабилизации белковых комплексов в клеточных органеллах и адаптации растений к низкой температуре, в целом.

В наших опытах также установлено, что действие низкой закаливающей температуры сопровождается быстрой (через 30 мин) экспрессией *clpP* гена, которая предшествует росту холодоустойчивости растений (рис. 9Г). Вместе с тем, полученные данные показывают, что экспрессия гена *clpP*, кодирующего *ClpP* протеиназу хлоропластов, носит транзитный характер: ее уровень

значительно снижается, когда устойчивость начинает расти, затем на 2 сут закаливания вновь увеличивается и далее достигает своего исходного уровня одновременно с выходом холодоустойчивости на плато. Характер изменений экспрессии данного гена подтверждает его возможное участие в регуляции протеолиза белков хлоропластов не только на самых ранних этапах холодовой адаптации, но и при пролонгированном действии низкой температуры.

Таким образом, в наших экспериментах установлено, что в процессе холодового закаливания происходит достаточно быстрое и значительное (в 2–4 раза) увеличение уровня экспрессии генов АТФ-зависимых (*lon1* и *clpP*) и цистеиновых протеиназ, которое предшествует росту холодоустойчивости проростков пшеницы. Поэтому можно предположить, что повышение устойчивости в первые минуты и часы охлаждения связано с активацией экспрессии этих генов, которая, вероятнее всего, направлена на увеличение активности протеолитических ферментов, участвующих в деградации и модификации белков, утративших в изменившихся условиях свои функции. В результате протеиназы обеспечивают клетку мономерными субстратами для синтеза *de novo* белков, необходимых для формирования повышенной холодоустойчивости клеток.

В то же время содержание транскриптов гена, кодирующего ингибитор цистеиновой протеиназы, увеличивалось через 0.5 ч закаливания (рис. 9В), достигая своего максимального значения через 5 ч холодового воздействия, а через 1 сут снижалось и в дальнейшем практически не изменялось. Полученные нами и имеющиеся в литературе данные об усилении экспрессии генов ингибиторов цистеиновых протеиназ приводят к мысли об их возможном участии в регуляции активности протеолитических ферментов и предотвращении распада вновь синтезированных белков на начальных этапах действия на растения низкой закаливающей температуры.

Следует также отметить, что по мере роста холодоустойчивости (через 2 сут охлаждения) изменения в экспрессии генов *clpP*, *lon1*, *cp* и генов, кодирующих фитоцистатины, становятся менее значительными, а при достижении устойчивости своих максимальных значений, уровень экспрессии изучаемых генов возвращается к исходным значениям. Отсюда следует, что наиболее важные изменения в экспрессии генов протеолитических ферментов и их ингибиторов происходят именно в первые часы воздействия холода и, по-видимому, являются частью тех изменений, которые и приводят, в конечном счете, к повышению устойчивости растений.

ВЫВОДЫ

1. Холодовое закаливание холодостойких (пшеница) и теплолюбивых (огурец) растений сопровождается увеличением активности амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина в тканях листа, которое предшествует росту их холодоустойчивости. Важно, что увеличение амидазной активности наиболее выражено на начальном этапе (часы) охлаждения и способствует повышению устойчивости, тогда как активность цистеиновых протеиназ увеличивается и в более поздние (сутки) периоды адаптации, участвуя в поддержании холодоустойчивости на повышенном уровне.

2. Действие низкой повреждающей температуры вызывает увеличение активности протеиназ и уменьшение активности ингибиторов трипсина и приводит к снижению холодоустойчивости и последующей гибели растений. В условиях температурного повреждения протеиназы играют первостепенную роль в необратимых (деструктивных) процессах катаболизма, тогда как в начальный период холодого закаливания протеолитические ферменты и их ингибиторы выполняют, главным образом, регуляторную функцию, тесно связанную с адаптацией растений.

3. В последствии низкой закаливающей температуры увеличение активности амидаз и цистеиновых протеиназ, участвующих в деградации и модификации неактивных белков, предшествует снижению холодоустойчивости растений. Существенных изменений в активности ингибиторов трипсина в процессе раззакаливания не обнаружено.

4. Обработка растений экзогенными фитогормонами оказывает заметное влияние на динамику активности протеиназ и ингибиторов, как до охлаждения, так и в процессе холодого закаливания. При этом изменения активности амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина зависят от типа гормона и способствуют повышению исходного уровня устойчивости, а также скорости ее прироста (при действии АБК) или дополнительному ее увеличению (при действии цитокинина) при холодом закаливании растений.

5. В процессе холодого закаливания происходит усиление экспрессии генов АТФ-зависимых протеиназ (*clpP* и *lon1*), а также генов, кодирующих цистеиновую протеиназу (*cp*) и ингибитор цистеиновой протеиназы, которое предшествует росту холодоустойчивости проростков пшеницы. При достижении растениями максимальной устойчивости содержание в клетках их листьев транскриптов указанных генов возвращается к исходному уровню.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Венжик Ю.В., Фролова С.А., Титов А.Ф. Взаимосвязь функциональных и структурных изменений клетки в процессе адаптации растений к низким температурам // Структурно-функциональные особенности биосистем Севера (особи, популяции, сообщества): Материалы конференции. Ч. 1. Петрозаводск, 2005. С. 74–78.
2. Фролова С.А., Венжик Ю.В., Титов А.Ф. Особенности формирования устойчивости при холодовом закаливании разных сортов озимой пшеницы // Вопросы общей ботаники: традиции и перспективы. Материалы международной конференции. Казань, 2006. С. 164–165.
3. Фролова С.А. Амидазная активность проростков пшеницы при низкотемпературном закаливании // Физиология растений – фундаментальная основа современной агробиотехнологии. Школа для студентов и молодых ученых. Ростов-на-Дону, 2006. С. 163.
4. Венжик Ю.В., Фролова С.А., Титов А.Ф. Функциональные и структурные изменения клеток листа при низкотемпературном закаливании пшеницы // Материалы международной конференции молодых ботаников. Санкт-Петербург, 2006. С. 139.
5. Венжик Ю.В., Фролова С.А., Титов А.Ф. Изменение функциональных и структурных изменений в клетках листа пшеницы при холодовом закаливании // Тезисы докладов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Уомоносов-2006», Москва, 2006. С. 42–43.
6. Венжик Ю.В., Фролова С.А., Титов А.Ф. Некоторые физиологические особенности адаптации холодостойких растений к низким температурам // Материалы международной конференции «Северная Европа в XXI веке: природа, культура, экономика». Секция биологические науки. Науки о Земле». Петрозаводск, 2006. С. 62–63.
7. Фролова С.А., Титов А.Ф. Динамика активности амидаз и цистеиновых протеиназ при холодовом закаливании пшеницы // Тезисы докладов и стендовых сообщений VI Симпозиума «Химия протеолитических ферментов». Москва, 2007. С. 118.
8. Фролова С.А., Титов А.Ф. Амидазная активность проростков пшеницы при холодовом закаливании // Материалы докладов международной конференции "Современная физиология растений. от молекул до экосистем". Сыктывкар, 2007. С. 410.
9. S Frolova, Yu. Venzhik. Effects of abscisic acid on activity of amidase, cysteine proteases and trypsin's inhibitors of wheat seedlings in cold hardening // Abstracts of 2nd International Symposium «Plant growth substances: intracellular hormonal signaling and applying in agriculture». Kyiv, Ukraine, 2007. С. 102.
10. Фролова С.А., Ю.В Венжик, А.Ф. Титов Влияние абсцизовой кислоты на протеиназно-ингибиторную систему проростков пшеницы при низкотемпературном закаливании // V-я Международная научная конференция «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2007. С. 209.
11. Фролова С.А. Влияние пониженной температуры на активность амидаз и цистеиновых протеиназ проростков пшеницы и огурца // Сборник докладов молодежной научной конференции «Геосферно-биосферный взаимодействия, биоразнообразие и состояние биосистем в высоких широтах». Апатиты, 2007. С. 54–56.
12. Фролова С.А., Венжик Ю.В., Титов А.Ф. Влияние низкотемпературного закаливания на протеолитическую активность и содержание фотосинтетических пигментов в

листьях проростков озимой пшеницы // Труды Карельского научного центра РАН «Экология. Экспериментальная генетика и физиология». Петрозаводск, 2007. Вып. 11. С. 127–130.

13. Фролова С.А., Титов А.Ф. Активность протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина в листьях пшеницы в начальный период действия и в последствии низкой закалывающей температуры // Известия РАН. Сер. биол. 2008. Т. 35, № 5. С. 549–552.

14. Венжик Ю.В., Фролова С.А., Котеева Н.К., Мирославов Е.А., Титов А.Ф. Структурно-функциональные особенности растений *Triticum aestivum* L. (Poaceae) на начальном этапе холодовой адаптации // Ботанический журнал. 2008. Т. 93, № 9. С. 39–49.

15. Венжик Ю.В., Котеева Н.К., Фролова С.А., Мирославов Е.А., Титов А.Ф. Структурно-функциональные изменения клеток листа *Triticum aestivum* L. (Poaceae) на начальном этапе холодовой адаптации // Материалы всероссийской конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века». Петрозаводск, 2008. С. 24–26.

Сдано в печать 22.10.2008 г.
Формат 60x84/16. Гарнитура Times. Печать офсетная.
Уч.-изд. л. 1,5. Усл. печ. л. 1,4.
Тираж 100 экз. Изд. № 122. Заказ № 751.

Карельский научный центр РАН
Редакционно-издательский отдел
185000, Петрозаводск, пр. А. Невского, 50