Труды Карельского научного центра РАН
№ 3. 2011. С. 117–120.

УДК 581.1.

ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ИНГИБИТОРОВ ТРИПСИНА ПРИ ХОЛОДОВОЙ АДАПТАЦИИ ПШЕНИЦЫ

А. Ф. Титов, С. А. Фролова, В. В. Таланова, Ю. В. Венжик

Институт биологии Карельского научного центра РАН

Изучено влияние экзогенных фитогормонов – абсцизовой кислоты (АБК) и цитокинина (в форме его синтетического аналога 6-бензиламинопурина) на динамику активности протеолитических ферментов и ингибиторов трипсина в листьях проростков пшеницы, подвергнутых действию низкой закаливающей температуры (5°С). Показано, что повышение холодоустойчивости растений, индуцированное воздействием АБК и цитокинина, сопряжено с существенными изменениями в активности амидаз и цистеиновых протеиназ, а также ингибиторов трипсина.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., протеолитические ферменты, ингибитор трипсина, абсцизовая кислота, цитокинин.

A. F. Titov, S. A. Frolova, V. V. Talanova, Yu. V. Venzhik. EFFECT OF PLANT HORMONES ON THE ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES AND TRYPSIN INHIBITORS DURING COLD ADAPTATION OF WHEAT

We studied the effect of exogenous hormones – abscisic acid (ABA) and cytokinin (in the form of its synthetic analog 6-benzylaminopurine), on the activity of proteolytic enzymes and tripsin inhibitor in the leaves of wheat seedlings exposed to low hardening temperature (5°C). The increase in plant cold resistance induced by ABA and cytokinin exposure was closely connected with considerable changes in the activity of amidases and cysteine proteinases, as well as the inhibitor of tripsin.

Key words: *Triticum aestivum* L., proteolytic enzymes, tripsin inhibitor, abscisic acid, cytokinin.

Введение

Активность протеолитических ферментов и их ингибиторов, контролирующих процессы деградации и модификации различных белков и ферментов, может существенно изменяться в период действия на растения неблагоприятных биотических и абиотических факторов среды [Валуева, Мосолов, 2002; Домаш и др., 2008], включая низкие температуры [Фролова, Титов, 2008]. Вместе с тем хорошо известно, что под влиянием низких температур в тканях растений происходят значительные изменения в содержании таких фитогормонов, как абсцизовая кислота (АБК) [Таланова и др., 1991] и цитокинины [Веселов и др., 2002], играющих важную роль в механизмах холодовой адаптации [Титов, Таланова, 2009]. Что касается возможного участия этих гормонов в регуляции активности протеиназ при адаптации растений к низким температурам, то такие сведения отсутствуют. С учетом этого нами изучено влияние экзогенных АБК и цитокинина на динамику активности протеолитических ферментов и их ингибиторов в условиях холодового закаливания проростков пшеницы.

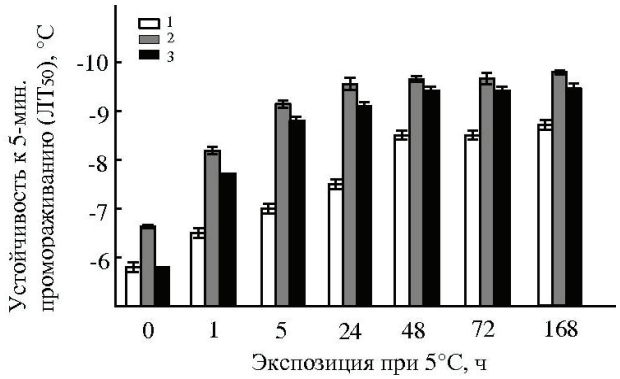

Рис. 1. Влияние АБК и БАП на холодоустойчивость листьев проростков пшеницы при действии температуры 5°С

Здесь и на рис. 2 : 1–5°С, 2–5°С + АБК, 3–5°С + БАП

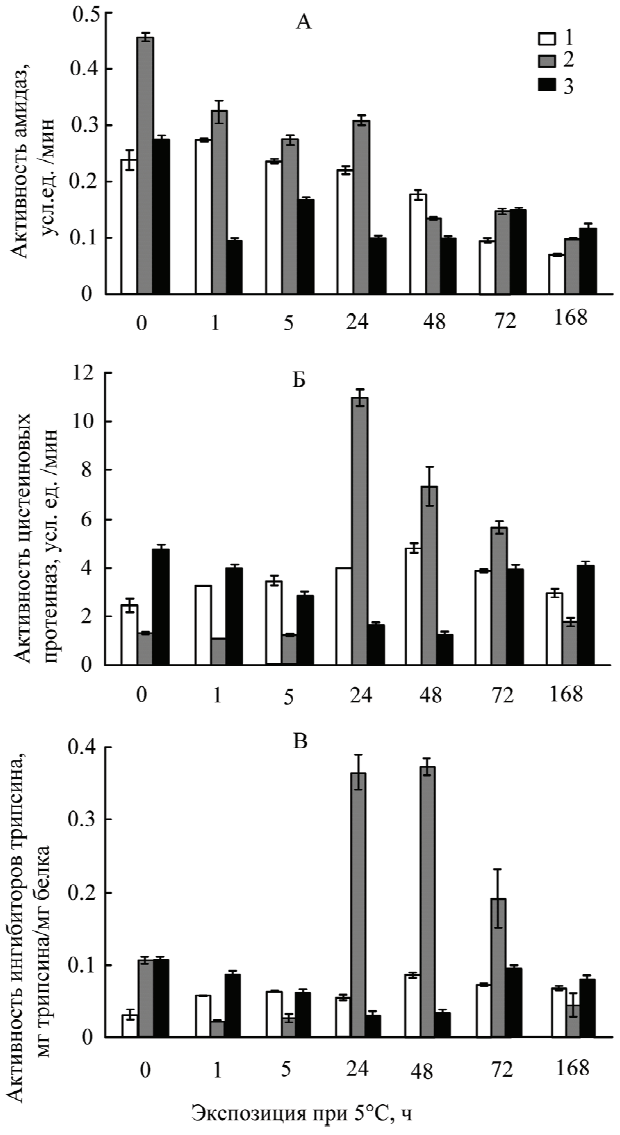

Рис. 2. Влияние АБК и БАП на активность амидаз (А), цистеиновых протеиназ (Б) и ингибиторов трипсина (В) в листьях проростков пшеницы при действии температуры 5°С

Материалы и методы

Опыты проводили на проростках озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с. Московская 39, выращенных в течение 7 сут на питательном растворе Кнопа при температуре воздуха 22°С, его относительной влажности 60–70%, освещенности около 10 клк и фотопериоде 14 ч. В дальнейшем проростки подвергали действию низкой закаливающей температуры (5°С), сохраняя неизменными прочие условия. За сутки до холодового воздействия часть проростков помещали на растворы АБК (0,1 мМ) или синтетического аналога цитокинина 6-бензиламинопурина (БАП) (0, 01 мМ).

О холодоустойчивости проростков судили по реакции клеток листа на 5-минутное тестирующее промораживание в микрохолодильнике, при этом в качестве показателя устойчивости служила температура ($ЛТ_{50}$), вызывающая гибель 50% клеток [Балагурова и др., 1982]. Активность сериновых трипсиноподобных протеиназ (амидаз) в листьях проростков определяли с использованием синтетического субстрата – N_{α}-бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорида (БАПА) [Erlanger et al., 1961], активность цистеиновых протеиназ – по модифицированному методу Кунитца [Sgarbieri et al., 1964], ингибиторную активность – по подавлению активности трипсина [Morichara et al., 1967].

Средние арифметические значения из трех независимых опытов и их стандартные ошибки приведены на рис. 1, 2. Обсуждаются величины, достоверные при $P \leq 0{,}05$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что предобработка АБК проростков пшеницы приводит к увеличению их устойчивости еще до начала холодового воздействия (см. рис. 1). При действии температуры 5°С у проростков, обработанных АБК, уже в начальный период (1–5 ч) наблюдался значительный прирост устойчивости, в результате чего она превышала уровень, характерный для проростков, закаливаемых в течение нескольких суток без АБК. В присутствии БАП скорость и величина прироста устойчивости проростков также заметно превышали таковые в варианте «закалка без гормонов».

У проростков, не подвергавшихся обработке экзогенными гормонами, в начальный период действия температуры 5°С (1–24 ч) усиливалась активность амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина (см. рис. 2). В дальнейшем активность амидаз и ингибиторов трипсина снижалась до уровня, характерного для незакаленных растений, в то время как повышенный уровень активности цистеи-

новых протеиназ сохранялся на протяжении всего процесса закаливания.

Обработка АБК проростков приводила к значительному повышению активности амидаз и ингибиторов трипсина и снижению активности цистеиновых протеиназ в листьях еще до начала действия температуры 5°С (см. рис. 2). При последующем воздействии низкой температуры в присутствии АБК на фоне роста холодоустойчивости активность амидаз в течение 7 сут постепенно снижалась, но при этом она заметно превышала таковую в варианте «закалка без гормонов». В первые часы действия низкой температуры активность цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина под влиянием АБК уменьшалась, но через 1–2 сут резко увеличивалась, а затем постепенно снижалась до исходного уровня (см. рис. 2).

Обработка БАП проростков повышала активность амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов трипсина в листьях (см. рис. 2), но уже в первые двое суток воздействия температуры 5°С в присутствии БАП активность амидаз, цистеиновых протеиназ и ингибиторов снижалась в 1,5–2 раза по сравнению с вариантом «закалка без гормонов» и лишь через 3–7 сут возвращалась к уровню, характерному для растений, не подвергавшихся действию гормона (см. рис. 2).

Изменения активности протеиназ и ингибиторов трипсина под воздействием холода на растения, когда, с одной стороны, в их клетках значительно усиливается накопление неактивных и поврежденных белков и пептидов, а с другой – возрастает необходимость в низкомолекулярных соединениях как исходного материала для синтеза стрессовых белков [Тарчевский, 2001], вероятно, направлены на формирование устойчивости растений и/или на поддержание ее повышенного уровня. В связи с этим вполне логично предположить, что АБК и цитокинин, имея несколько «каналов» воздействия на клетки [Gusta et al., 2005; Романов, 2009], могут влиять на устойчивость растений к низкой температуре, в том числе и через изменение активности протеолитических ферментов и их ингибиторов. Важно при этом отметить, что воздействие АБК и цитокинина (являющихся антагонистами в отношении ряда физиологических процессов и действующих однонаправленно на устойчивость растений) на активность протеиназ и ингибиторов трипсина в листьях пшеницы в период холодовой адаптации оказалось разнонаправленным. В частности, обработка проростков АБК приводила к значительному повышению активности протеолитических ферментов (особенно цистеиновых протеиназ) и ингибиторов трипсина, тогда как в присутствии БАП активность протеиназ и ингибиторов трипсина, наоборот, заметно снижалась. Попутно укажем, что сходное действие этих гормонов обнаружено в отделенных стареющих листьях ячменя: экзогенная АБК стимулировала повышение активности хлоропластных эндопептидаз, а кинетин, наоборот, ее ингибировал [Quiles et al., 1995].

Вероятно, увеличение активности амидаз и цистеиновых протеиназ под влиянием АБК как в начальный, так и в более поздний период действия холода усиливает удаление из клеток поврежденных макромолекул и их реутилизацию, что благоприятно для накопления свободных аминокислот, индуцированного синтеза стрессовых белков и последующего повышения холодоустойчивости. В то же время происходящее через 1–3 сут от начала действия холода повышение под влиянием АБК активности ингибиторов трипсина, выступающих в качестве регуляторов активности протеиназ, предотвращает преждевременный распад вновь синтезированных (стрессовых) белков и поддерживает тем самым процесс формирования повышенной устойчивости.

Положительное влияние экзогенного цитокинина на холодоустойчивость растений пшеницы, на наш взгляд, связано с тем, что, вызывая снижение активности амидаз и цистеиновых протеиназ, этот гормон предотвращает избыточную деградацию белков под воздействием холода.

Таким образом, повышение холодоустойчивости растений пшеницы при пониженной температуре, обусловленное влиянием экзогенных АБК или цитокинина, сопряжено с существенными изменениями в активности протеолитических ферментов и их ингибиторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 10-04-00650а).

Литература

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

Валуева Т. А., Мосолов В. В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений // Успехи биологической химии. 2002. Т. 42. С. 193–216.

Веселов Д. С., Сабиржанова И. Б., Ахиярова Г. Р. и др. Роль гормонов в быстром ответе растений пшеницы на осмотический и холодовой шок // Физиология растений. 2002. Т. 49, № 6. С. 572–576.

Домаш В. И., Шарпио Т. П., Забрейко С. А., Сосновская Т. Ф. Протеолитические ферменты и ингибиторы трипсина высших растений в условиях стресса // Биоорг. химия. 2008. Т. 34, № 3. С. 353–357.

Романов Г. А. Как цитокинины действуют на клетку // Физиология растений. 2009. Т. 56, № 2. С. 295–315.

Таланова В. В., Титов А. Ф., Боева Н. П. Изменение уровня эндогенной абсцизовой кислоты в листьях рас-

тений под влиянием холодовой и тепловой закалки // Физиология растений. 1991. Т. 38, № 5. С. 991–997.

Тарчевский И. А. Метаболизм растений при стрессе. Казань: ФЭН. 2001. 448 с.

Титов А. Ф., Таланова В. В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2009. 206 с.

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

Erlanger D. F., Kokowski N., Cohen W. Proteinases Activity in Biological Substrats // Arch. Biochem. Biophys. 1961. Vol. 95. P. 271–278.

Gusta L. V., Trischuk R., Weiser C. J. Plant Cold Acclimation: The Role of Abscisic Acid // J. Plant Growth Regul. 2005. Vol. 24. P. 308–318.

Morichara K., Oka T., Tsuzuki H. Proteases activity // Biochem. Biophys. Acta. 1967. Vol. 139. P. 382–397.

Quiles M. J., Garcia C., Cuello J. Differential Effects of Abscisic Acid and Methyl Jasmoate on Endoproteinases in Senescing Barley Leaves // Plant Growth Regul. 1995. Vol. 16, N 1. 197–204.

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* Latices // J. Biol. Chem. 1964. Vol. 239. P. 2170–2177.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Титов Александр Федорович
Председатель КарНЦ РАН, д.б.н., проф., чл.-корр. РАН
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: titov@krc.karelia.ru

Фролова Светлана Алексеевна
младший научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: frolova@krc.karelia.ru

Таланова Вера Викторовна
ведущий научный сотрудник, д.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: talanova@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762712

Венжик Юлия Валерьевна
научный сотрудник, к.б.н.
ИБ КарНЦ РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика Карелия, Россия, 185910
эл. почта: venzhik@krc.karelia.ru
тел. (8142) 762712

Titov, Aleksandr
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: titov@krc.karelia.ru

Frolova, Svetlana
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: frolova@krc.karelia.ru

Talanova, Vera
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: talanova@krc.karelia.ru
tel. (8142) 762712

Venzhik, Yulia
Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Science
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: venzhik@krc.karelia.ru
tel. (8142) 762712