

УДК: 577.112.322:633.15

**ВПЛИВ ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ НА ЗМІНИ ВМІСТУ БІЛКУ ТА
АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ ТРАНСАМІНУВАННЯ ПРИ
ПРОРОСТАННІ НАСІННЯ КУКУРУДЗИ (*ZEА MAYS L.*).**

М.О. Колесніков

Таврійський державний агротехнологічний університет

В работе показаны изменения содержания белка и активности трансаминаз в органах проростающей кукурузы при водном дефиците. Возрастание АлАТ и АсАТ активности эндосперма кукурузы зависит от величины осмотического потенциала. Отмечено, что изменения активности аминотрансфераз в органах зародышевой оси кукурузы в онтогенезе носят адаптивный к действию водного стресса характер.

Кукуруза, аминотрансферазы, водный стресс, прорастание зерна.

ВСТУП

Питання водного дефіциту при вирощуванні сільськогосподарських культур в південних регіонах України щороку набуває більшої актуальності, з огляду на аридизацію клімату. Дефіцит води викликає затримку росту і розвитку рослин, порушує низку важливих метаболічних процесів. В реалізації адаптивної відповіді значну чутливість проявляє білковий обмін рослин. При виникненні водного дефіциту в листках рослин знижується вміст білків, причому у С₃-рослин даний чинник знижував пул загального білку в більшому ступеню, ніж у С₄-рослин. Зміни в білковому обміні при водному стресі пов'язані з інгібуванням швидкості синтезу й інтенсифікацією гідролітичного розпаду білків [10].

Важливе місце в зазначених процесах займають трансферази, які приймають участь не лише у синтезі амінокислот та протеїну, а й у підтриманні енергетичного обміну. Встановлено, що у С₄-рослин особливо висока активність аминотрансфераз субстратом для яких є аланін та аспартат [12]. Аланінамінотрансфераза (АлАТ) (КФ 2.6.1.2) каталізує перенесення аміногрупи між аланіном та глутаматом за участі α-кетоглутарату та пірувату. Аспартатамінотрансфераза (АсАТ) (КФ 2.6.1.1)

каталізує переамінування аспартату та глутамату за участі α -кетоглутарату та оксалоцетату. Дані ферменти представлені в рослинних клітинах декількома ізоензимними формами та локалізуються в цитозолі, пластидах, мітохондріях та пероксисомах [9]. Якісний та кількісний склад амінокислот в проростаючому насінні залежить як від активності протеїназ, так і від включення їх до синтезу білків *de novo*.

Аспарагінова та глутамінова кислоти відіграють важливу роль в адаптації рослин до несприятливих факторів так як є резервом для синтезу нових аміно- та кетокислот. Достатньо досліджена роль амінотрансфераз в реакціях детоксикації ксенобіотиків, важких металів, пестицидів [1,7], при анаеробіозному стані [8]. Показано зміну амінотрансферазної активності за дії регуляторів росту рослин [11]. Разом з тим, онтогенетичні зміни активності амінотрансфераз в умовах водного стресу вивчені недостатньо.

Метою роботи було з'ясувати зміни активності аспартат- і аланінамінонотрансфераз та водорозчинного білку в ендоспермі насіння, коренях і колеоптилях проростків кукурудзи в умовах водного дефіциту.

УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили з використанням насіння кукурудзи (*Zea mays L.*) гібриду ДКС 5143. Насіння кукурудзи пророщували на фільтрувальному папері в чашках Петрі при контрольованих параметрах в умовах 14-годинного фотоперіоду протягом 7 діб. Схема досліду включала п'ять варіантів у п'ятикратній повторності. Насіння контрольного варіанту пророщували на дистильованій воді. Для моделювання умов водного дефіциту насіння кукурудзи дослідних варіантів пророщували 7 діб на розчинах різних концентрацій поліетиленгліколю ПЄГ-1500 (2, 5, 10, 20% водні розчини). Для проведення дослідження відбирали сухе насіння кукурудзи, ендосперм проростаючого насіння в терміни 2, 4, 6, 12, 24 години з моменту початку пророщення та органи зародкової вісі 3- та 7-добових проростків. Наважки рослинних матеріалів гомогенізували у

100мМ тріс-НСІ буфері (рН 7,8) у співвідношенні 1:9 за об'ємом при температурі 0-4 °С. Отриманий гомогенат центрифугували 10 хв при 8000 об/хв та супернатант використовували для ферментативного аналізу. Активність АЛАТ та АсАТ визначали за накопиченням відповідно пірувату та оксалоцетату з використанням 2,4-ДНФГ та спектрофотометруванням гідразонів, що утворюються при $\lambda=540$ нм [6], а вміст водорозчинної фракції білку за методом Lowry О.Н. Спектрофотометричні дослідження проводили з використанням КФК-3. Результати опрацьовували статистично в «Microsoft Excel 2010» з розрахунком t-критерію Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На ранніх етапах проростання відбувається мобілізація запасних білків ендосперму з наступним гідролізом поліпептидних ланцюгів та нагромадженням вільних амінокислот, які використовуються в реакціях переамінування та синтезу білків *de novo*.

Протягом першої доби пророщування відбувається поступове зменшення вмісту розчинного білку в ендоспермі насіння кукурудзи більш ніж в 2 рази (табл. 1). Подібна динаміка узгоджується з результатами отриманими раніше і пов'язана з мобілізацією та утилізацією білків при проростанні. Мобілізація білку в органах зародкової вісі закінчується в той час, коли розпад білка в ендоспермі продовжується. Тобто, в початковий період біосинтезу білка в зародковій вісі потреба в амінокислотах задовольняється за рахунок розпаду власних запасних білків, що відповідає гетеротрофній ембріональній стадії проростання. В подальшому, до зародкової вісі, що розвивається потрапляють амінокислоти та пептиди з ендосперму, а власні процеси протеолізу припиняються (гетеротрофна ендоспермальна стадія проростання).

За умов водного дефіциту швидкість витрачання білку невисока протягом перших 6 годин пророщення, що пов'язано зі зниженим вмістом води в насінні, як джерелом активності протеаз.

Таблиця 1 - Вміст білку в проростаючому насінні, колеоптилях та коренях кукурудзи за умов осмотичного стресу (мг/г сирої тканини, $\bar{X} \pm m$)

Час проростання, година	Варіант				
	1	2	3	4	5
Сухе насіння	31,5±0,7	30,4±0,6	31,6±1,2	30,9±0,9	31,9±1,5
2	26,8±1,1	26,1±1,2	25,7±0,9	27,3±1,2	29,5±1,3
4	21,4±1,3	21,7±1,0	23,7±1,5	25,2±0,9	25,8±1,1
6	17,6±0,8	20,4±1,1	25,2±1,3*	27,3±1,3*	27,9±1,5*
12	22,7±1,2	20,7±1,3	17,0±1,0*	10,7±0,9*	11,3±1,4*
24	14,5±1,5	11,3±1,2	13,9±1,1	12,5±0,9	11,6±1,4
72 (колеоптиль)	30,0±2,1	44,4±2,3*	63,0±4,5*	75,0±4,1*	-
72 (корень)	30,6±1,6	8,8±0,5*	15,3±1,6*	13,7±1,5*	-
168 (колеоптиль)	44,1±3,1	52,8±3,3	81,1±7,2*	80,5±7,1*	-
168 (корень)	34,0±2,8	9,4±1,4*	12,0±2,2*	10,9±1,5*	-

Примітка. * - різниця істотна порівняно з контролем при $p \leq 0,05$;

Тому, в ендоспермі насіння, що пророщувалося на розчинах ПЕГ-1500 з високоосмотичними потенціалами на цей термін вміст білку був на 58% більший, ніж у контрольному насінні. Зміна стадії проростання, імовірно, відбувається в період до 12 години пророщення кукурудзи на що вказує зміна характеру утилізації білків в ендоспермі. В цей період, за умов водного дефіциту відбувається різке зменшення вмісту білку в ендоспермі насіння кукурудзи, яке майже не змінюється до добового терміну пророщення. Причому, вміст білку в ендоспермі насіння, яке інкубувалося на розчинах ПЕГ-1500 протягом доби був незначно нижчий порівняно з контролем. Слід відмітити, що для насіння досліджуваного гібриду кукурудзи розчин ПЕГ у концентрації 20% виявив сублетальну дію, тому проростання не відбувалося, хоча спостерігалось набубнявіння насіння.

В 3- та 7-добових колеоптилях кукурудзи спостерігається осмотичнозалежне зростання вмісту білку за умов водного дефіциту. Тому, експозиція на 10% ПЕГ викликала зростання вмісту білку в 3-добових

колеоптилях в 2,5 рази, а в 7-добових – в 1,8 рази. Разом з тим, в коренях при експозиції проростків кукурудзи в умовах водного дефіциту відбувалося різке зниження вмісту розчинного білку в 2,0-3,5 рази. Подібні зміни пояснюються пригніченням біосинтезу білку в коренях, які є більш чутливими до умов водного стресу; активацією білокгідролісної системи обумовленою деградацією мембран; швидкою утилізацією білків [3]. Зниження кількості білків при водному дефіциті пояснюється й з нестачею АТФ та з порушенням експресії певних генів через сигнальні системи клітин [5].

Дія будь яких зовнішніх факторів відбивається на білковому обміні у рослин, який пов'язаний із ферментами АлАТ та АсАТ. Амінотрансферазна активність ендосперму насіння кукурудзи зростала протягом першої доби пророщування, причому АлАТ активність збільшилася в 2,65 рази, а АсАТ активність – в 1,58 рази (рис. 1). У фазу набубнявіння насіння активність амінотрансфераз за умов водного дефіциту була дещо нижчою за контрольні показники. В наступну фазу кільчення починається інтенсивний поділ та розтягування клітин зародкової вісі, що супроводжується зростанням амінотрансферазної активності ендосперму насіння, яке знаходилося в стані водного дефіциту. Причому, зростання АлАТ та АсАТ активності ендосперму кукурудзи мало пряму залежність від величини осмотичного потенціалу розчинів ПЕГ-1500 в періоди 12- та 24-годинного пророщування насіння. Між АсАТ та АлАТ активностями ендосперму насіння кукурудзи протягом першої доби пророщування існує тісний кореляційний зв'язок ($r = 0.76 \div 0.98$).

Отримані дані вказують та те, що експозиція проростків в умовах модельного водного дефіциту викликала суттєве зростання АлАТ активності (рис.2). Найбільш активне стимулювання активності АлАТ в 3-добових колеоптилях кукурудзи в 25,8 рази та коренів – в 27,4 рази

спостерігалось при інкубації в 10% розчині ПЕГ. Слід відмітити, що через 7 діб після пророщення насіння в стані водного дефіциту активність АлАТ залишається високою в коренях кукурудзи в 4,1 рази, порівняно з контрольними проростками, тоді як в колеоптилях відмічено деяке інгібування активності даного ферменту. Піровіноградна кислота, що утворюється в ході АлАТ реакції, є необхідним субстратом для глюконеогенезу, тому активація даного ферменту сприяє активації синтезу вуглеводів, які необхідні для подальшого росту коренів. Посилення активності трансаміназ завдяки накопиченню глутамату дозволяє спрямувати метаболічні перетворення в бік утворення проліну, який разом з вуглеводами є важливим осмопротектором в умовах водного стресу [13].

АсАТ активність 3- та 7-добових коренів кукурудзи, що знаходилися в розчинах ПЕГ-1500 значно перевищувала її активність у коренях проростків контрольного варіанту. Так, навіть, під впливом 2% розчину ПЕГ активність АсАТ в коренях зростала в 2,9 – 3,3 рази. Максимальна активація АсАТ в 4,0 – 4,6 рази відбувалася в коренях кукурудзи при інкубації в 10% розчині ПЕГ. Проте, стимулювання ферментативної активності АсАТ колеоптилів кукурудзи за умов водного стресу не було відмічено і вона залишалася на рівні контрольних значень. В тижневих коренях кукурудзи, встановлено існування більш тіснішого кореляційного зв'язку між АлАТ і АсАТ активностями ($r=0,97$), ніж в колеоптилях ($r=0,76$) за дії водного дефіциту різної сили.

АлАТ та АсАТ відіграють ключову роль в метаболізмі аланіну, аспартат і глутамату, з яких синтезується аспарагін та глутамін. Тому, підвищення їх активності є необхідною умовою накопичення пулу амідів як донорів NH_4^+ для синтезу білків. В насінні кукурудзи відсутній достатній запас нітратів, тому, мабуть, єдиним джерелом амонію при проростанні можуть бути аспарагін та глутамін [2]. З іншого боку, кетокислоти, що утворюються в реакціях трансамінування також необхідні

для поновлення фонду вільних амінокислот та є необхідними для росту і формування проростка [4].

ВИСНОВКИ

Отже, при пророщуванні насіння кукурудзи на розчинах поліетиленгліколю з високим осмотичним потенціалом відбувалося зниження вмісту розчинного білку в ендоспермі. Зростання вмісту білку в колеоптилях та зниження – в коренях кукурудзи під впливом водного дефіциту пов'язано з адаптивними змінами активності амінотрансфераз. Відмічено осмотичнозалежне зростання активності АлАТ та АсАТ в ендоспермі насіння кукурудзи протягом першої доби пророщування та їх активація в коренях кукурудзи за умов водного дефіциту. Стимулювання активності амінотрансфераз в тижневих колеоптилях кукурудзи за дії водного стресу не відмічено, що пов'язано з особливостями азотного обміну клітин зародкових органів при проростанні та за умов стресового навантаження.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Бездудная О.Ф. Влияние солей тяжелых металлов на активность аминотрансфераз и интенсивность перекисного окисления липидов в прорастающих семенах сои (*Glicine max* L.) // Вісник Харк. нац. ун-ту ім. В.Н. Каразіна. Серія: Біологія. – 2007. – Вип. 5 (768). – С. 10-14.
2. Винниченко А. Н. Ферменты азотного метаболизма и адаптация растений к антропогенным условиям среды / А. Н. Винниченко, Н.П. Коцюбинская, В.С. Бильчук // Вестник Днепропетр. ун-та. Биология. Экология. – 1996. – Вып. 2. – С. 138–146.
3. Зеленский Г.В. Особенности активации белокгидролизующей системы при набухании семян сои разной жизнеспособности / Г.В. Зеленский, Т.А. Зеленская // Селекция и семеноводство полевых культур. Сборник науч. трудов ВГАУ. – 2007. – Ч.1. – С. 226-232.
4. Кретович В.Л. Обмен азота в растениях. – М.: Наука, 1992. – 527 с.

5. Мусієнко М.М. Молекулярні механізми індукції захисних реакцій рослин в умовах посухи / М.М.Мусієнко, І.В. Жук // Укр. бот. журн. – 2009. – Т. 66, №4. – С. 580-595.
6. Полевой В.В. Методы биохимического анализа растений / В.В. Полевой, Г.Б. Максимов. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1978. – 192 с.
7. Россихіна Г.С. Активність ферментів переамінування в стиглому зерні рослин гібридної кукурудзи за дії гербіцидних препаратів / Г.С.Россихіна, В. Лашко // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2010. – Вип. 56. – С. 234-238.
8. Россихіна Г. С. Вплив стимуляторів росту на активність ферментів азотного метаболізму кукурудзи / Г.С. Россихіна, В.С. Більчук, В.В. Лашко, О.М. Вінниченко // Вісник Дніпропетровського ун-ту. Біологія. Екологія. – 2011. – Вип. 19, т. 1. – С. 137–142.
9. Biekmann S. Subcellular distribution, multiple forms and development of glutamate-pyruvate (glyoxylate) aminotransferase in plant tissues / S.Biekmann, J. Feierabend // Arch. Biochem. Biophys. – 1982. – V.156. – P. 207-214.
- 10.Dhindsa R.S. Water stress and protein synthesis. Differential inhibition of protein synthesis / R. S. Dhindsa, R. E. Cleland // Plant Physiol. – 1975. –V. 55. – P. 778-781.
- 11.Good A.G. Purification and characterization of an anaerobically induced alanine aminotransferase from barley roots / A.G. Good, D.G. Muench // Plant Physiol. – 1992. – V. 99. – P. 1520-1525.
- 12.Wadsworth G. J. The plant aspartate aminotransferase gene family // Physiologia Plantarum. -1997. –V. 100(4). – P. 998–1006.
- 13.Yang Ch.-W. Importance of ornithine- δ -aminotransferase to proline accumulation caused by water stress in detached rice leaves / Ch.-W. Yang, Ch.H. Kao // Plant Growth Regulation. – 1999. – V. 27. – P. 189–192.

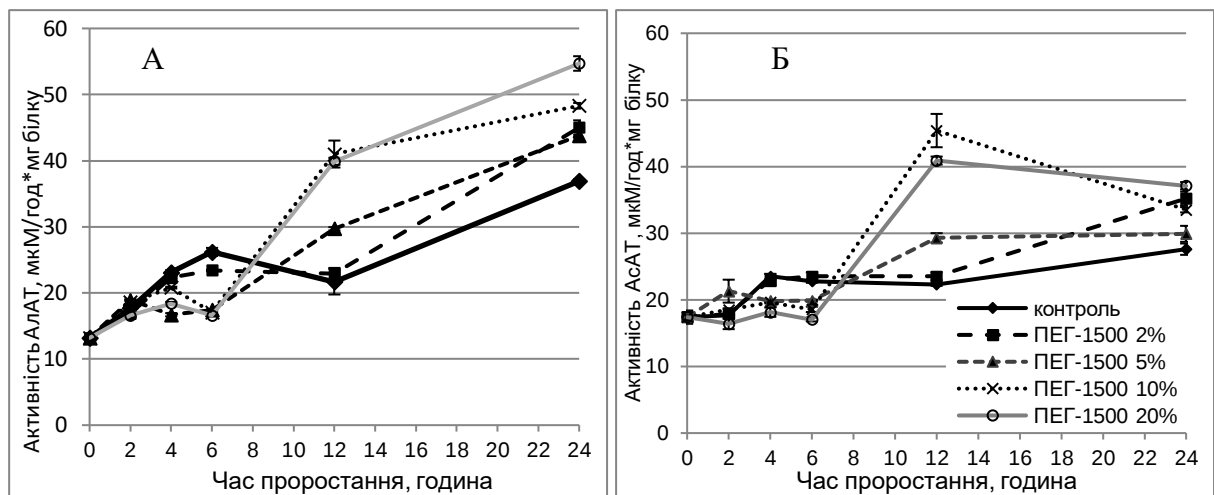


Рис.1 Зміна активності АЛАТ (А) та АсАТ (Б) в ендоспермі проростаючого насіння кукурудзи за умов водного дефіциту.

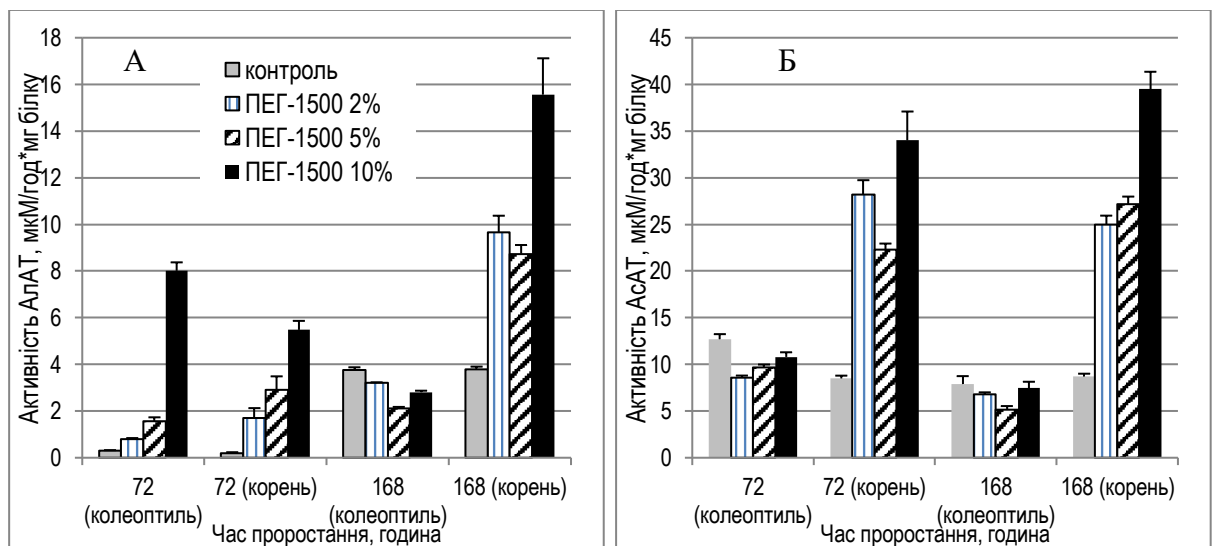


Рис. 2 Зміна активності АЛАТ (А) та АсАТ (Б) в колеоптилях та коренях 3- та 7 добових проростків кукурудзи за умов водного дефіциту.

**THE EFFECT OF WATER DEFICIT ON MODIFYING OF
PROTEIN CONTENT AND TRANSAMINATION ENZYME ACTIVITY
DURING GERMINATION OF MAIZE SEEDS (ZEA MAYS L.)**

M.O. Kolesnikov

The paper shows the changes in protein content and activity of aminotransferase in the organs of germinated maize under water deficit. The increasing of AlAT and AsAT activity of corn endosperm depends on the osmotic potential. The viewed changes of aminotransferases activity in organs of the maize embryonic axis during ontogeny have adaptive to water stress nature.