

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭФФЕКТОРОВ НА НАКОПЛЕНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ ГОРОХА *PISUM SATIVUM L.*

А.Х. АГАДЖАНЯН, М.Б. МОЛАИ РАД, Дж.Г. ГУКАСЯН, А.А. АГАДЖАНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Показано высокое содержание аминокислот в проростках гороха, выращиваемого в растворе с хлористым натрием. Получены данные о значительно низком по сравнению с контролем содержании свободного пролина в корешках и стебельках в присутствии НАДФ, фруктозы, фруктозо-6-фосфата. Выявлена повышенная активность ферментов биосинтеза пролина в варианте с гиббереллином. При наличии в среде фруктозы наибольшее количество свободного пролина обнаружено у основания корешков (как в темноте, так и на свету), а в кончике корня, наоборот, обнаруживается минимальное содержание его.

Նատրիումի քլորիդի միջավայրում ածեցված ոլորի ծլած սերմերում հայտնաբերվել է ազատ ամինաթթուների բարձր քանակություն: Ստուգիչի համեմատությամբ ոլորի ցողունների և արմատների ազատ պրոլինի քանակությունը զգալի ցածր է ՆԱԴՖ, ֆրուկտոզի, ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի միջավայրում: Պրոլինը կենսասինթեզի ֆերմենտի ակտիվությունը բարձր հիբերելինի միջավայրում ածեցնելիս, իսկ ֆրուկտոզի միջավայրը ազատ պրոլինի բարձր քանակություն և հայտնաբերվում է արմատների հիմքում (ինչպես մթության այնպես էլ լույսի պայմանում), իսկ արմատի ծայրապատյանում ընդհակառակը, այն հայտնաբերվում է մինիմալ քանակությամբ:

High free aminoacids containing (pool) in peas stalk germinate in sodium ehloride solution. At the presence of NADP, fructose, fructoso-6-phosphate and free proline level in root and stalk in comparison with control is less. In gibberellin variant high proline biosynthesis enzymes activity is appeared. At the presence of fructose the highest amount of free proline is detected at the basal segment of root (as in the dark, so at light), in opposite at the end of root is detected the minimum content of it.

Растения гороха - эффекторы - пролин

Вопрос о связи между накоплением свободного пролина и интенсивностью ростовых процессов может быть изучен с использованием ингибиторов роста и ретардантов. Было показано [6], что хлорхолинхлорид (ССС) подавляет рост пшеницы и способствует увеличению в растениях свободного пролина.

Имеются малочисленные сведения [10] о существовании взаимосвязи между ростом растений и накоплением свободного пролина. Остановка или снижение интенсивности ростовых процессов в большинстве случаев приводит к накоплению свободного пролина и, наоборот, усиление нормального роста сопровождается снижением содержания этой аминокислоты [1].

Содержание свободных аминокислот в клетке в зависимости от внешних факторов подвергается глубоким изменениям [1, 6]. Особое место в этом отношении занимает свободный пролин, которому отводят протекторную роль в экстремальных для клеток условиях и обмен которого тесно связан с различными физиологическими состояниями организма. Для большинства растений, произрастающих в нормальных условиях,

характерно низкое содержание свободного пролина в вегетативных органах и необычайно высокая концентрация его в пыльце [1, 6], что является показателем нормальной жизнедеятельности и фертильности ее. В семенах свободный пролин либо отсутствует, либо содержится в очень малых количествах [8].

Настоящая работа посвящена изучению некоторых сторон обмена пролина в корешках гороха *Pisum sativum* L. под влиянием различных факторов среды.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена гороха *Pisum sativum* L. Экстракцию свободных аминокислот, их хроматографирование, количественное определение проводили по Лисицки и Лоран [12]. Химическое определение пролина осуществляли по Блюменкрантцу [9]. Активность фермента биосинтеза пролина определяли по описанному нами ранее методу [4].

Результаты и обсуждение. В первую очередь мы изучали содержание свободных аминокислот в проростках гороха, выращиваемого на дистиллированной воде и в 0,1%-ном растворе хлористого натрия.

Таблица 1. Влияние хлористого натрия на содержание свободных аминокислот в корешках гороха, мкМ на 1 г ткани

Аминокислоты	Варианты опыта	
	с дистиллятом	с раствором хлористого натрия
цис	3,78±0,3	4,0±0,35
лиз	17,3±1,5	13,1±1,2
арг	5,8±0,5	9,09±0,8
асп	30,9±3	67,4±6,5
гли-сер	93,2±8	118,2±10,5
глу	173,0±17	240,0±20
ала	25,0±2,2	43,9±3,8
про	9,57±0,85	87,7±8
тир	33,0±3,1	33,6±2,9
Азетидин-2-карбоновая кислота	-	66,4±6,1
вал-мет	15,1±1,3	15,0±1,3
лей-илей	12,0±1	13,0±1,1

Полученные данные, приведенные в табл.1, показали, что наибольшее накопление свободных аминокислот в основном происходит при выращивании семян в растворе с хлористым натрием, особенно пролина, аспартата, глутамата, аргинина, аланина и серин-глицина. Следует отметить, что механизм накопления пролина в стрессовых условиях окончательно не установлен. По данным некоторых исследователей [11], в условиях солевого стресса превращение меченого по углероду ^{14}C -L- про в глутамат и аргинин задерживается. Однако с этим трудно согласиться, поскольку результаты наших экспериментов свидетельствуют об обратном, т.е. при солевом стрессе, наряду с увеличением содержания пролина, наблюдается также накопление аргинина и глутамата. Примечательно, что при солевом стрессе в корешках гороха обнаруживается одно

нингидринположительное соединение, которым, по-видимому, является азетидин-2-карбоновая кислота. Это соединение нами было обнаружено в большом количестве при нагревании хроматограммы при 120°. Имеются данные [5], что эта аминокислота, в частности у ландыша, образуется из S-аденозил-метионина при внутренней перестройке.

Получены данные, согласно которым азетидин-2-карбоновая кислота конкурирует с пролином при включении последнего в структуру белка [7].

В табл.2 приводятся результаты изучения влияния различных эффекторов на содержание свободного пролина в стебельках и корешках гороха.

Таблица 2. Влияние различных эффекторов на содержание свободного пролина в стебельках и корешках гороха, мкМ про на 1г ткани

Эффекторы	Содержание свободного пролина	
	в стебельках	в корешках
Контроль	2,88 ± 0,2	0,48 ± 0,02
НАДФ	2,40 ± 0,3	0,40 ± 0,02
Фруктоза	0,96 ± 0,1	0,16 ± 0,01
Фруктозо-6-фосфат	0,76 ± 0,1	0,13 ± 0,001
Гибберелин	0,65 ± 0,1	0,10 ± 0,01
NaCl	10,08 ± 0,7	1,68 ± 0,05
KCl	2,78 ± 0,2	0,48 ± 0,03
NaHCO ₃	2,84 ± 0,2	0,48 ± 0,03
NH ₄ OH	2,70 ± 0,2	1,2 ± 0,04

Видно, что эффекторы по-разному влияют на уровень накопления пролина. Так, например, в присутствии НАДФ, фруктозы, фруктозо-6-фосфата и гибберелина содержание свободного пролина значительно ниже по сравнению с контролем как в корешках, так и в стебельках, особенно при наличии в среде последних трех эффекторов. Следует отметить также, что в варианте с гибберелином наблюдается довольно интенсивный рост корешков. Таким образом, не вызывает сомнения тот факт, что при росте и размножении клеток потребность в свободном пролине сильно возрастает для обеспечения анаболических процессов. В нашей лаборатории получены аналогичные результаты в опытах с лактирующей молочной железой и мозгом крыс, где возрастание потребности в пролине приводило к ингибированию ферментов его биосинтеза, однако содержание эндогенного пролина оставалось на очень низком уровне [2]. У жуков же фасоловой зерновки, где синтетические процессы заметно уступают гидролитическим, пролин не расходуется, что приводит к увеличению уровня эндогенного пролина [3].

Уменьшение содержания свободного пролина под действием фруктозы и фруктозо-6-фосфата можно объяснить, с одной стороны, взаимосвязью между нециклическим фотосинтетическим

фосфорилированием и биосинтезом пролина через кофактор НАДФН, а с другой - стимулирующим влиянием фруктозо-6-фосфата на фотосинтез путем усиления активности рибулозо-дифосфат карбоксилазы, одного из узловых ферментов темновой фазы фотосинтеза.

На рис.1 показано влияние различных эфффекторов на ферменты биосинтеза пролина и содержание свободного пролина в корешках гороха. Активность ферментов биосинтеза пролина высока в варианте с гиббереллином, но в остальных вариантах заметной разницы в этом показателе по сравнению с контролем не выявляется. Тем не менее в этих вариантах по сравнению с контролем содержание свободного пролина значительно ниже. Очевидно, это обусловлено высокой пролиноксидазной активностью, что приводит к включению пролина в метаболический путь через глутамат.

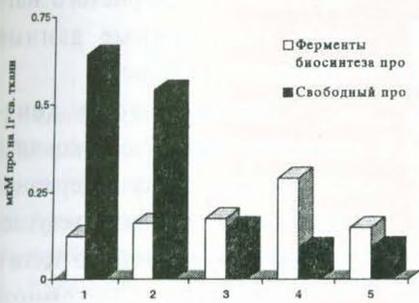


Рис. 1. Влияние различных эфффекторов на ферменты биосинтеза пролина и на содержание свободного пролина в корешках гороха.

1 - Контроль, 2 - НАДФ⁺, 3 - фруктоза, 4 - гиббереллин, 5-фр-6-ф.

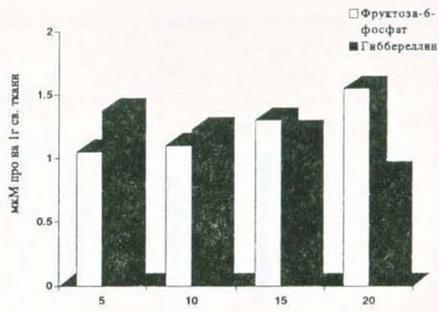


Рис. 2. Влияние различных концентраций фр-6-ф и гиббереллина на содержание свободного пролина в корешках гороха.

В одной из серий экспериментов мы изучали влияние различных концентраций фруктозо-6-фосфата и гиббереллина на накопление свободного пролина в корешках гороха.

Данные, представленные на рис.2, свидетельствуют о том, что под влиянием фруктозо-6-фосфата содержание свободного пролина уменьшается, в то время как в концентрации 20 мг %

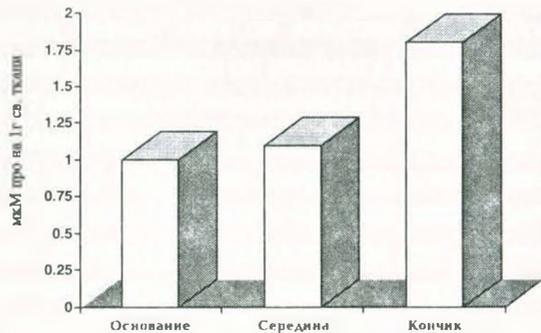


Рис. 3. Содержание свободного пролина в разных частях корня гороха.

гиббереллин, наоборот, способствует повышению этого показателя более чем в 1,5 раза, что трудно объяснить.

Далее для подтверждения высказанного выше предположения, согласно которому активные процессы роста и размножения клеток сопровождаются интенсивным расходом свободного пролина для реализации синтетических процессов в клетке, мы изучали накопление его в различных частях корешка.

Данные рис.3 показывают, что в корневом чехлике, под которым расположена зона роста и растяжения корня, содержание свободного пролина в 2 раза выше, чем у основания корня. Этим полностью подтверждается, что между ростом и размножением клеток и содержанием свободного пролина имеется четко выраженная обратная корреляция.

Мы изучали также накопление свободного пролина в разных частях корешка гороха при выращивании его на свету и в темноте в присутствии фруктозы и хлористого натрия. Полученные данные приведены на рис.4.

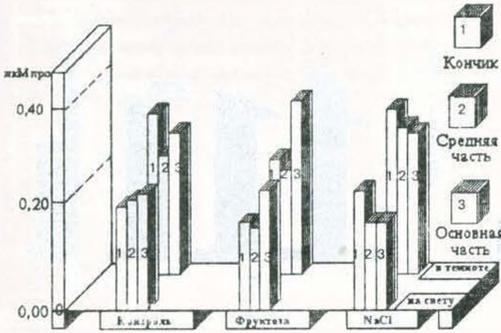


Рис. 4. Содержание свободного пролина в разных частях корешка гороха на свету и в темноте.

Видно, что в контрольном варианте в кончике корешка на свету содержание свободного пролина уступает таковому в средней его части и у основания. В темноте наименьшее количество свободного пролина обнаруживается в средней части корешка, а в кончике и у основания оно почти одинаково. В варианте с фруктозой высокое содержание свободного пролина отмечается у основания корешка как в темноте, так и на свету, а в кончике его, наоборот, количество этой аминокислоты минимальное. Тем не менее в этом варианте содержание свободного пролина во всех частях корешка довольно высокое при выращивании в темноте по сравнению с аналогичным показателем на свету.

Такая же закономерность выявлена в варианте с хлористым натрием, однако здесь содержание свободного пролина в кончике корешка гораздо выше, чем в остальных частях его (как в темноте, так и на свету). Это объясняется тем, что хлористый натрий подавляет рост и размножение клеток, что задерживает включение пролина в структуру белка и способствует накоплению его в кончике корешка, где расположена зона роста и растяжения. Следует отметить также и тот факт, что, по-видимому, под влиянием хлористого натрия стимулируется активность пирролин-5-карбоксилат редуктазы, что приводит к усилению синтеза пролина. Такое

объяснение тем более оправданно, что другими авторами [13] установлено, что в листьях галофитов в условиях солевого стресса активность пирролин-5-карбоксилат редуктазы возрастает в несколько раз. Разумеется, при стрессе усиливаются адаптивные реакции организма, проявляются тонкие регуляторные возможности ферментативных процессов, в частности, пирролин-5-карбоксилат редуктазы, одного из ферментов биосинтеза пролина.

В заключение отметим также, что во всех изученных нами вариантах, включая контрольный, в темноте во всех частях корешка обнаруживалось более высокое содержание свободного пролина, чем на свету. Это объясняется тем, что, по-видимому, ферменты окисления пролина сильнее стимулируются светом, нежели ферменты его биосинтеза, поэтому процесс окисления пролина в темноте протекает медленнее по сравнению с синтезом этой аминокислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Х. Канд. дисс., Ереван, 1966.
2. Агаджанян А.Х., Арутюнян Л.М. Биолог. журн. Армении, 27, 4, 1974.
3. Агаджанян А.Х., Арутюнян Л.М., Гукасян Дж.Г. Биолог. журн. Армении, 34, 1, 176, 1981.
4. Агаджанян А.Х., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 27, 5, 1974.
5. Кретович В.Л. Обмен азота в растениях. М., 1972.
6. Савицкая Н.Н. Научн. докл. высш. шк., Биолог. науки, 2, 1976.
7. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М., 1985.
8. Aspinall L., Singh T.N., Paleg L.G. Austrel. J. Biol. Sic., 26, 2, 1973.
9. Blumenkrantz N. Clin. Biochem., 13, 177, 1980.
10. Fowolen., Richmond M.H. Biochem. Biophys. Acta, 71, 2, 1963.
11. Goas M.C. Acad. Sci., Ser. D., 272, 414, 1971.
12. Lisitzky S., Laurent S. Bull. Soc. Chem. Biol., 1137, 1955.
13. Treichel S. Ber. Deutch. Bot. Ges., 29, 1, 1979.

Поступила 28.VII.2000