

О. А. Чижикова, Т. О. Палладіна

## Активність ключових ферментів синтезу та розкладу проліну в проростках кукурудзи за умов засолення та обробки синтетичними регуляторами росту

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костериним)

*The activity of pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) in corn seedling roots and leaves was higher than that of proline dehydrogenase (PD). The changes of PD activity define the proline content dynamics to a great extent in roots of control and seedlings exposed to 0.1M NaCl, but it was conditioned in leaves mainly by changes of P5CR activity. The seed treatment with growth regulators — Methiur and Ivine — decreased the proline content in 8-day-old seedling tissues that occurred because its degradation was intensified in roots, and its synthesis was weakened in leaves. The proline content dynamics in corn roots was defined by changes in its degradation to a great extent and, in leaves, by changes in its synthesis under the salt stress and the preparation effect.*

Засолення ґрунтів є для рослин сильним стресовим фактором, який затримує їх ріст і знижує продуктивність через порушення осмотичного гомеостазу та токсичний вплив  $\text{Na}^+$  на метаболічні процеси [1]. Загальною ознакою стресового стану рослинних організмів, викликаного різними негативними чинниками, є значне зростання вмісту вільного проліну в їх тканинах. Це пояснюється його осморегуляторною й осмопротекторною роллю [2], а також здатністю послаблювати процеси пероксидного окиснення завдяки своїй антиоксидантній властивості [3, 4].

Накопичення проліну в цитоплазмі клітин може відбуватися шляхом посилення його синтезу [5] або послаблення деградації [6], а також меншою мірою зумовлюватися розкладом збагачених ним білків [7] і змінами його транспорту [6]. Ключовим ферментом синтезу проліну є  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилатредуктаза (П5КР) (КФ 1.5.1.2.), яка каталізує реакцію відновлення  $\Delta^1$ -піролін-5-карбоксилату (П5К). Існують відомості щодо посилення біосинтезу проліну при його накопиченні за умов засолення: так, виявлено 4-разове збільшення активності П5КР у галофільної водорості *Chlorella autotrophica* та галофіта *Mesembryanthemum nodiflorum* L. [5], а також підвищення рівня мРНК П5КР у коренях проростків квасолі, експонованих у присутності 400 мМ NaCl [2]. Проте умови засолення не впливали на активність П5КР у тканинах солечутливої рослини *Arabidopsis thaliana* [8]. Посилений синтез проліну спостерігався в адаптованих до NaCl клітинах тютюну за їх сольової експозиції [9], хоча на підставі результатів подальших досліджень був зроблений висновок, що стресіндуковане накопичення проліну може контролюватись раніше за стадію утворення П5К, і тому його синтез не обов'язково визначається активністю П5КР [10].

Вміст проліну в клітинах може залежати також від швидкості його катаболізму, який є оберненим процесом синтезу. Окиснення проліну, при якому акцептором протонів виступає  $\text{NAD}^+$ , відбувається в цитоплазмі клітин, де каталізується проліндегідрогеназою (ПД) (КФ 1.5.1.2.). Було показано, що накопичення проліну в тканинах проростків пшениці за умов водного і сольового стресу відбувається за рахунок як посилення його синтезу, так

і пригнічення деградації [11]. Збільшення вмісту проліну в тканинах листків шовковиці за умов зневоднення та машу *Phaseolus aurens* Roxb. при засоленні супроводжується посиленням активності П5КР та інгібуванням ПД [12, 13].

Раніше ми показали, що 10-добова експозиція проростків кукурудзи за присутності 0,1 М NaCl викликала накопичення проліну в тканинах коренів і ще більшою мірою листків, чому запобігала обробка насіння препаратами “метіур” та “івін”, що, разом із послабленням гальмування росту, свідчило про їх антистресовий ефект [14]. Обидві сполуки, що були синтезовані в ІБОХ НАН України й тестовані як регулятори росту (РР) стимулюючої дії, характеризуються наявністю антиоксидантних властивостей, тоді як метіур — ще й антирадикальних. Тому викликане ними менше накопичення проліну могло пояснюватися зниженням потреби в цій амінокислоті як антиоксиданті.

Дана робота присвячена з'ясуванню ролі синтетичного та катаболічного шляхів у метаболізмі проліну за умов засолення й дії зазначених препаратів на підставі визначення в тканинах активності ферментів П5КР та ПД.

Об'єктом досліджень були проростки кукурудзи (гібрид Колективний 225 МВ), умови вирощування, обробки та сольової експозиції яких наведені в [14]. Гомогенати з листків і коренів одержували згідно з [11], використовуючи супернатант. Препарат П5К виготовляли за методикою [15].

Активність П5КР визначали на підставі утворення  $\text{НАД}^+$ , кількість якого знаходили за зменшенням оптичної густини при 340 нм. Реакційна суміш у кюветі містила 0,56 мМ П5К, 0,1 мМ НАДН, 50 мМ калій-натрій фосфатний буфер (рН 7,2) та 0,1 мл супернатанту в загальному об'ємі 2,5 мл, тоді як в контрольній кюветі НАДН був відсутній. Реакцію ініціювали додаванням до кювети П5К і здійснювали впродовж 3 хв. За одиницю ферментативної активності приймали кількість ферменту, що викликала зменшення оптичної густини на 0,001 за 1 хв.

Активність ПД визначали за відновленням  $\text{НАД}^+$ , яке викликало збільшення оптичної густини впродовж 3 хв при 340 нм в реакційній суміші об'ємом 2,5 мл, що містила 15 мМ пролін, 5 мМ  $\text{НАД}^+$ , 0,1 М буфер  $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{--NaHCO}_3$  (рН 10,3) та 0,1 мл супернатанту, у той час як оптичний контроль не містив  $\text{НАД}^+$ . Реакцію ініціювали додаванням до кювети розчину проліну. За одиницю ферментативної активності приймали кількість ферменту, що змінювала оптичну густину на 0,001 за 1 хв. Усі досліді проводили 3–4 рази при 2-разовому повторенні.

Активність П5КР у коренях та листках 7-добових контрольних проростків виявилася майже однаковою (табл. 1). Обробка насіння метіуром та івіном істотно не впливала на її рівень у коренях 7-добових проростків, хоча з їх віком активність ферменту зростала, причому обидва препарати послаблювали цей процес майже однаковою мірою щодо контролю. 12-годинна сольова експозиція проростків помітно зменшувала активність П5КР, причому вплив обробки метіуром був неістотним, у той час як івін зменшував активність ферменту. При подовженні сольової експозиції проростків до 10 діб активність П5КР збільшувалась, що було подібним у всіх “сольових” варіантах.

У листках 7-добових контрольних проростків передобробка метіуром не змінювала активність П5КР, у той час як івін зменшував її майже на 20%. Мінімум активності П5КР припадав на 8-му добу, причому зменшення було найбільшим у варіанті з івіном. До 17-ї доби активність ферменту відновлювалася, але її рівень у варіантах з метіуром та івіном залишався нижчим, ніж у контрольному варіанті. Сольова експозиція впродовж 12 год істотно не впливала на активність П5КР. Метіур та івін однаково впливали на цей показник,

зменшуючи його щодо контролю за цих умов на 12%. При подовженні сольової експозиції проростків до 1 доби активність П5КР зменшувалась, що спостерігалось також у варіантах з передобробкою препаратами, причому найменше значення відмічалось у варіанті з метіуром. При збільшенні терміну експозиції проростків до 10 діб активність П5КР у листках відновлювалась, що спостерігалось також у варіанті з метіуром, у той час як при передобробці івіном відзначалось її зменшення ще на 46%.

Активність ПД у коренях та листках 7-добових контрольних проростків мала близькі значення, зростаючи з їх віком (табл. 2). Обробка насіння метіуром та івіном призводила до її посилення в коренях на 18 та 29% відповідно з поступовим збільшенням, яке було

Таблиця 1. Активність П5КР у коренях та листках проростків кукурудзи при експозиції на 0,1 М NaCl та обробці насіння синтетичними РР

Варіант дослідю	12-годинна експозиція		1-добова експозиція		10-добова експозиція	
	од./г сир. р.	%	од./г сир. р.	%	од./г сир. р.	%
Корені						
Контроль	92,00 ± 2,68	100	101,34 ± 1,67	100	147,67 ± 1,00	100
NaCl	86,33 ± 1,24	94	99,83 ± 0,50	99	131,34 ± 5,34	89
Метіур	95,33 ± 2,67	104	103,50 ± 4,17	102	127,00 ± 4,33	86
Метіур; NaCl	85,33 ± 1,88	93	97,84 ± 1,84	97	128,17 ± 2,50	87
Івін	90,00 ± 2,25	98	100,33 ± 1,00	99	122,50 ± 0,17	83
Івін; NaCl	73,00 ± 1,17	79	93,67 ± 4,24	92	123,84 ± 3,17	84
Листки						
Контроль	100,67 ± 3,42	100	53,67 ± 0,67	100	94,42 ± 1,58	100
NaCl	94,33 ± 2,55	94	44,33 ± 2,83	83	59,58 ± 1,66	63
Метіур	97,67 ± 2,05	97	40,25 ± 1,67	75	72,27 ± 1,13	77
Метіур; NaCl	88,33 ± 1,41	88	17,27 ± 0,87	32	53,33 ± 2,09	56
Івін	80,00 ± 1,04	79	15,40 ± 0,78	29	62,84 ± 3,02	67
Івін; NaCl	88,33 ± 1,59	88	55,34 ± 2,34	103	30,00 ± 1,41	32

Таблиця 2. Активність ПД у коренях та листках проростків кукурудзи при експозиції на 0,1 М NaCl та обробці насіння синтетичними РР

Варіант дослідю	12-годинна експозиція		1-добова експозиція		10-добова експозиція	
	од./г сир. р.	%	од./г сир. р.	%	од./г сир. р.	%
Корені						
Контроль	5,28 ± 0,24	100	6,67 ± 0,26	100	13,00 ± 0,68	100
NaCl	7,54 ± 0,32	143	6,17 ± 0,31	93	11,33 ± 0,57	87
Метіур	6,24 ± 0,29	118	8,00 ± 0,41	120	8,67 ± 0,42	67
Метіур; NaCl	6,54 ± 0,27	124	6,17 ± 0,28	93	9,67 ± 0,41	74
Івін	6,82 ± 0,28	129	7,33 ± 0,35	110	10,33 ± 0,48	79
Івін; NaCl	7,00 ± 0,35	133	5,33 ± 0,25	80	11,67 ± 0,50	90
Листки						
Контроль	5,33 ± 0,22	100	9,83 ± 0,50	100	12,00 ± 0,52	100
NaCl	6,33 ± 0,32	119	6,17 ± 0,29	63	13,33 ± 0,68	111
Метіур	5,00 ± 0,23	94	7,17 ± 0,37	73	15,34 ± 0,47	128
Метіур; NaCl	6,00 ± 0,23	113	4,17 ± 0,23	42	17,50 ± 0,24	146
Івін	4,00 ± 0,20	75	8,00 ± 0,30	81	14,00 ± 0,70	117
Івін; NaCl	3,67 ± 0,17	69	6,67 ± 0,35	68	13,33 ± 0,64	111

слабшим, ніж у контролі, особливо у варіанті з метіуром. 12-годинна сольова експозиція проростків посилювала активність ПД на 43% щодо контролю, у той час як обробка РР, особливо метіуром, зменшувала активність ферменту порівняно з “сольовим” контролем за цих самих умов. Добова експозиція проростків на 0,1 М NaCl, навпаки, гальмувала активність ПД у коренях, найбільшою мірою при обробці івіном, у той час як активність ферменту у варіанті з метіуром досягала такого ж значення, як у “сольовому” контролі. Подовження сольової експозиції до 10 діб посилювало активність ПД, причому вплив івіну на цей процес був сильнішим за вплив метіуру.

Метіур та івін зменшували активність ПД у листках 7-добових проростків на 6 та 25% відповідно. З віком активність ПД зростала, причому у варіанті з метіуром це відбувалося інтенсивніше, ніж у варіанті з івіном та контролі. Сольова експозиція впродовж 12 год призводила до збільшення активності ПД на 19% порівняно з контролем, тоді як обробка насіння РР по-різному впливала на цей показник за даних умов. Так, при дії метіуру активність ПД за своїм значенням наближалась до її рівня у “сольовому” контролі, у той час як івін зменшував її майже на 30%. Подовження сольової експозиції проростків до однієї доби практично не змінювало активність ПД у листках. У той же час у варіанті з метіуром вона зменшувалась на 30%, а у варіанті з івіном збільшувалась в 1,8 раза. При подальшій експозиції проростків до 10 діб активність ПД зростала, особливо у варіанті з метіуром, а у варіанті з івіном її значення було як у “сольовому” контролі.

За нашими даними, активність П5КР у коренях і листках проростків була вищою за активність ПД. Зіставлення результатів щодо активності ключових ферментів синтезу і розкладу проліну з одержаними раніше даними стосовно його динаміки у тих самих варіантах [14] дозволило виявити причинно-наслідкові зв'язки між цими процесами. Накопичення проліну в коренях проростків за першу добу сольової експозиції та зменшення його вмісту при її подовженні до 10 діб спричинялося послабленням активності ПД при 1-добовій дії NaCl з подальшим підвищенням її до кінця цього терміну. Внесок П5КР у динаміку вмісту проліну прослідковувався лише протягом першої доби дії стресора. У листках, навпаки, вміст проліну впродовж добової сольової експозиції зменшувався, а з її подовженням до 10 діб зростав у результаті змін у процесі його синтезу, про що свідчить наявність прямої залежності між вмістом проліну та активністю П5КР. Динаміка проліну в коренях проростків за умов експозиції на NaCl та обробки насіння РР зумовлена, як і в “сольовому” контролі, переважно змінами його деградації. Додаткове накопичення його у “сольовому” варіанті при дії метіуру та івіну пояснюється більшим зниженням активності ПД. У листках за цих самих умов динаміка проліну була зумовлена змінами як його синтезу, так і деградації, причому узгодження між ними чіткіше виявлялося при обробці івіном.

Визначення активності ключових ферментів утворення і розкладу проліну дозволило зробити такі висновки щодо причин динаміки його вмісту за умов сольового стресу та при дії регуляторів росту:

- динаміка вмісту проліну в коренях контрольних та експонованих на солі проростків кукурудзи зумовлена переважно змінами активності ПД, у той час як у листках — П5КР;
- зменшення вмісту проліну у тканинах 8-добових проростків під впливом РР відбувається в коренях завдяки посиленню його катаболізму, а в листках — ще й через послаблення його синтезу;
- динаміка вмісту проліну в коренях за умов сольової експозиції проростків на NaCl та дії препаратів зумовлена переважно змінами швидкості його деградації, а у листках, крім того, змінами синтезу цієї амінокислоти.

1. Boyer J. S. Plant Productivity and Environment // Science. – 1982. – **218**. – P. 443–448.
2. Delauney A. J., Verma D. P. S. A Soybean Gene Encoding  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Was Isolated by Functional Complementation in *Escherichia coli* and Is Found To Be Osmoregulated // Mol. and Gen. Genet. – 1990. – **221**. – P. 299–305.
3. Bellinger Y., Larher F. Proline Accumulation in Higher Plants: A Redox Buffer? // Plant Physiol. (Life Sci. Adv.). – 1987. – **6**. – P. 23–27.
4. Smirnov N., Cumbes Q. J. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes // Phytochemistry. – 1989. – **28**. – P. 1057–1060.
5. Laliberte G., Hellebust J. A. Pyrroline-5-Carboxylate Reductase in *Chlorella autotrophica* and *Chlorella saccharophila* in Relation to Osmoregulation // Plant Physiol. – 1989. – **91**. – P. 917–923.
6. Raymond M. J., Smirnov N. Proline Metabolism and Transport in Maize Seedlings at Low Water Potential // Ann. Bot. – 2002. – **89**. – P. 813–823.
7. Charest C., Phan C. T. Cold Acclimation of Wheat (*Triticum aestivum*): Properties of Enzymes Involved in Proline Metabolism // Physiol. plant. – 1990. – **80**. – P. 159–168.
8. Verbruggen N., Villarroel R., Van Montagu M. Osmoregulation of a Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Gene in *Arabidopsis thaliana* // Plant Physiol. – 1993. – **103**. – P. 771–778.
9. Binzel M. L., Hasegawa P. M., Rhodes D. et al. Solute Accumulation in Tobacco Cells Adapted to NaCl // Plant Physiol. – 1987. – **84**. – P. 1408–1415.
10. LaRosa P. C., Rhodes D., Rhodes J. C. et al. Elevated Accumulation of Proline in NaCl-Adapted Tobacco Cells Is Not Due To Altered  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Reductase // Plant Physiol. – 1991. – **96**. – P. 245–250.
11. Mattioni C., Lacerenza N. G., Troccoli A. et al. Water and Salt Stress-Induced Alterations in Proline Metabolism of *Triticum durum* Seedlings // Physiol. plant. – 1997. – **101**. – P. 787–792.
12. Veeranjanyulu K., Kumari R. B. D. Proline Metabolism During Water Stress in Mulberry // J. Exp. Bot. – 1989. – **40**. – P. 581–583.
13. Sudhakar C., Reddy P. S., Veeranjanyulu K. Effect of Salt Stress on Enzymes of Proline Synthesis and Oxidation in Greengram (*Phaseolus aurens* Roxb.) Seedlings // J. Plant Physiol. – 1993. – **141**. – P. 621–623.
14. Чижикова О. А., Палладіна Т. О. Вплив хлориду натрію та синтетичних регуляторів росту на вміст проліну в проростках кукурудзи // Доп. НАН України. – 2003. – № 9. – С. 192–196.
15. Williams I., Frank L. Improved Chemical Synthesis and Enzymatic Assay of  $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylic Acid // Anal. Biochem. – 1975. – **64**. – P. 85–97.

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного  
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 05.07.2006