

УДК: 581.19:577.156

Активность гексокиназы и транскетолазы в зерне кукурузы при его прорастании в условиях водного дефицита

О.В.Тихонова¹, О.О.Молодченкова², С.А.Петров¹

¹Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова (Одесса, Украина)

²Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения УААН (Одесса, Украина)

Изучено влияние водного дефицита на активность гексокиназы и транскетолазы – ферментов гликолитического и пентозофосфатного путей в прорастающих зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы (*Zea mays* L.). Показано, что активность обоих ферментов зависит от устойчивости линии и изменяется в течение времени действия фактора.

Ключевые слова: кукуруза, гексокиназа, транскетолаза, водный дефицит.

Введение

Изучение биохимических механизмов устойчивости растений к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе и к водному дефициту, является одной из актуальных задач современной биохимии.

Одним из наиболее чувствительных звеньев метаболизма является дыхание, так как от его характера в значительной степени зависит общее направление обмена веществ.

Ряд работ был посвящен вопросу об энергетической эффективности дыхания, в том числе в неблагоприятных условиях (Семихатова, 1970, 1972), а также взаимосвязи дыхания с продуктивностью растений (Головко, 1985). Было высказано предположение, что мнение об энергетически неэффективном дыхании в условиях стресса не корректно, так как изменения энергетического потенциала клеток, наблюдаемые в неблагоприятных условиях, обусловлены не прекращением генерации макроэргов, а усиленной тратой их в процессах репарации повреждения. То есть, если подавить в этих условиях дыхание растений, то репарации не происходит. Были выделены фототрофный (в зеленых органах на свету) и гетеротрофный (в незеленых, клетках и в темноте) типы обмена. В случае гетеротрофного типа основное количество энергетических затрат связано с ростом растения, а остальные затраты – с поддержанием в активном, жизнедеятельном состоянии. Характерная особенность этих энергетических затрат – то, что источником энергии служат те же вещества, которые являются и строительным материалом, то есть ассимиляты. Таким образом, в интенсивно растущем растительном организме при синтезе новой биомассы дыхание имеет максимальную эффективность (Семихатова, 1980).

В условиях водного дефицита в дыхательном метаболизме растений происходят серьезные изменения, которые касаются не только соединений, используемых в качестве дыхательного субстрата (Приходько, 1968; Пшибытко и др., 2003), но также и степени участия в дыхании отдельных ферментных систем (Петинов, Размаев, 1961; Рахмануилова и др., 2003). Согласно литературным данным, стресс может приводить как к снижению (Buleon et al., 1998; Jiao, Grodzinski, 1996; Yordanov et al., 2000; Zayed, Zeid, 1997), так и к повышению (Bukhov, Mohanty, 1999; Gill et al., 2001; Jiao, Grodzinski, 1996; Yordanov et al., 2000; Zayed, Zeid, 1997) содержания растворимых сахаров. Это, в свою очередь, обусловлено соотношением их образования и утилизации. Показано, что при стрессе происходит, как правило, повышение активности амилазы (Zayed, Zeid, 1997; Ляшок та ін., 2003), отсутствуют изменения в активности инвертазы (Пшибытко и др., 2003).

Разные пути дыхания отличаются друг от друга по количеству освобождаемой при окислении глюкозы энергии и по набору промежуточных метаболитов, используемых в разнообразных синтетических процессах. Это свойство дыхания может иметь важное значение в приспособлении растений к неблагоприятным условиям среды, так как изменение соотношения этих путей в дыхании может способствовать изменению направления обмена веществ в целом, приводящему к «целесообразному» повышению устойчивости растений (Петинов, Аббаров, 1966). В этом случае вскрывается важное значение мультипотенциальности дыхания, т.е. возможности идти разными путями биохимических превращений для приспособления растений кукурузы к неблагоприятным условиям существования (Удовенко, 1979). Так, существует мнение о повышении роли пентозофосфатного пути окисления глюкозы в формировании устойчивости растения к стрессу (Петинов, Аббаров, 1966; Семихатова, Юдина, 1964). При этом в отношении одного из ключевых

ферментов гликолиза, гексокиназы, высказано предположение о его роли в качестве первичного сенсора сигнала, передаваемого сахарами (Jang, Sheen, 1997).

Большинство работ по данному вопросу выполнено на вегетирующих растениях. В селекционной практике при отборе материала важно учитывать устойчивость, проявляющуюся на ранних стадиях онтогенеза. В этой связи весьма важным представляется рассмотрение взаимосвязи между активностью ферментов углеводного метаболизма и устойчивостью к водному дефициту при прорастании. Ранее нами было исследовано влияние водного дефицита на содержание растворимых сахаров и активность амилазы в прорастающих зерновках контрастных по признаку засухоустойчивости линиях кукурузы (Тихонова та ін., 2005).

Целью данного исследования было изучить активность ферментов, регулирующих процесс окисления углеводов – гексокиназы и транскетолазы, ферментов гликолитического (ГП) и пентозофосфатного (ПФП) метаболических путей в зерне контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурузы при прорастании в условиях водного дефицита, выявить зависимость активности ферментов от уровня чувствительности изучаемых линий к действию неблагоприятного фактора.

Материалы и методы

Исследования проводили на зерновках линий кукурузы (*Zea mays* L.), контрастных по признаку засухоустойчивости (устойчивая линия – Од329зМ, неустойчивая – См7SL зМ).

В опытах использовали неповрежденные зерновки кукурузы после их 12-часового набухания (условно 0 часов проращивания), которые в дальнейшем проращивали на фильтровальной бумаге в термостате при температуре 25°C. Для создания водного дефицита набухшие зерновки проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной 10% ПЭГ-12000 (Ли и др., 2004, Handa et al., 1983). Зерновки контрольного варианта в течение эксперимента проращивали на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой. По окончании экспозиции зерновки замораживали при –70°C.

Активность гексокиназы (КФ 2.7.1.1) определяли по стандартной методике (Кочетов, 1980). Для этого навеску растительного материала гомогенизировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 7,0, в соотношении 1:5 (масса:объем), и центрифугировали при 6 тыс.об./мин при 5°C в течение 20 минут. О гексокиназной активности судили по изменению окраски кислотно-основного индикатора (крезоловый красный) при 560 нм в течение 5 минут с 30-секундными интервалами. Реакционная среда содержала 2,5 мл основного раствора (7 мл 0,006% крезолового красного в 1,6% MgCl₂, 1,5 мл 0,1 М АТФ, 3 мл 0,1 М глицил-глицинового буфера рН 9,0 и дистиллированной воды до 30 мл), 0,4 мл 0,2 М глюкозы, 0,1 мл экстракта. Удельную активность фермента выражали в мкМоль глюкозо-6-Ф на мг белка за минуту инкубации при 25°C.

Для определения активности транскетолазы (КФ 2.2.1.1) по стандартной методике (Кочетов, 1980) навеску растительного материала гомогенизировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере, рН 7,6, в соотношении 1:5 (масса:объем), и центрифугировали при 6 тыс.об./мин при 5°C в течение 20 минут. Инкубационная среда содержала 0,5 мл 0,5 М глицил-глицинового буфера, рН 7,6, 0,1 мл экстракта, 0,05 мл 0,06 М MgCl₂, 0,05 мл 0,1% тиаминпирофосфата, 0,1 мл 2% раствора пентозофосфатов. Реакцию ставили на 20 минут. Активность фермента определяли по количеству образующегося продукта реакции (седогептулозо-7-фосфат), который, в свою очередь, определяли по цветной реакции с цистеином. Удельную активность фермента выражали в нМоль седогептулозо-7-Ф на мг белка за минуту инкубации при 40°C.

Содержание белка определяли по методу Lowry (Lowry et al., 1951).

Статистическую обработку данных, полученных на основании 4-х серий опыта, проводили с использованием критерия Стьюдента (Рокицкий, 1967). На рисунках приведены средние величины и их погрешности ($M \pm m$).

Результаты и обсуждение

Основная активность гексокиназы приходилась на долю эндосперма в зерновках обеих исследуемых линий, и лишь следы активности были обнаружены в зародыше, что подтверждается литературными данными (Douglas et al., 1988). Как видно из представленных данных (рис. 1), максимальную активность наблюдали в первые сутки прорастания, что согласуется с полученными ранее данными по изучению амилазной активности в прорастающем зерне кукурузы (Тихонова та ін., 2005). В условиях опыта активность гексокиназы в эндосперме устойчивой линии оставалась близка к контролю либо незначительно отклонялась от контрольного значения (рис. 1). У восприимчивой линии активность гексокиназы начинает падать уже через 4 часа прорастания в условиях опыта и продолжает постепенно снижаться до 48 часов.

Исследования активности транскетолазы (рис. 2) показали, что в процессе прорастания семян в контрольных условиях ее активность постепенно повышается у обеих линий, что вполне объяснимо с

точки зрения роли ПФП в обмене веществ, а именно его связи с синтезом НАДФН₂ и фосфорилированных углеводных остатков – субстратов для синтеза нуклеиновых кислот.

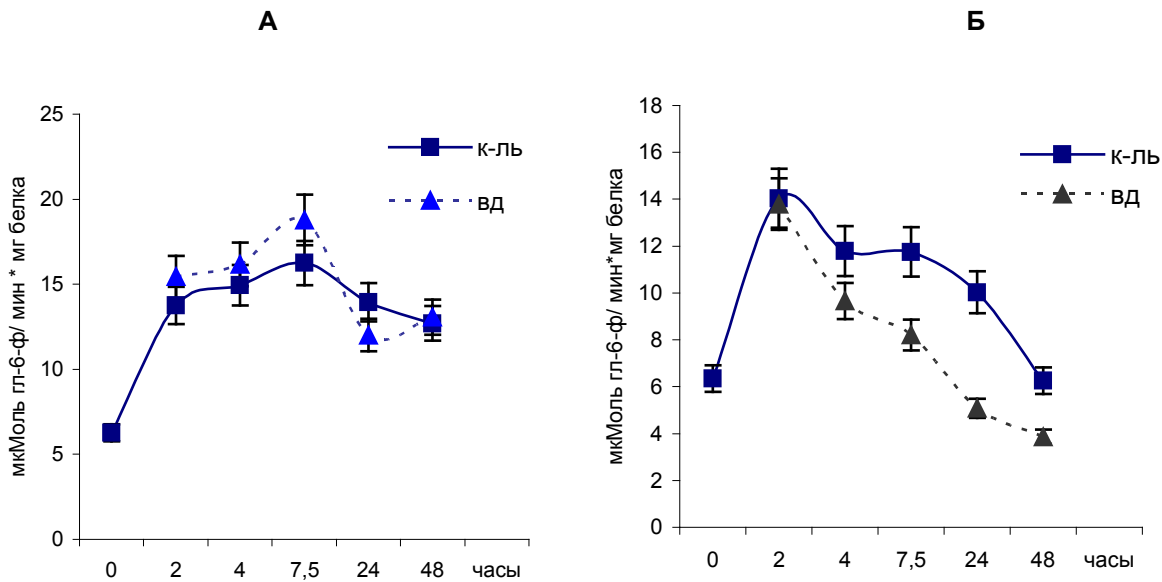


Рис. 1. Активность гексокиназы в семенах контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурудзы (А – устойчивая, Б – неустойчивая) при прорастании (к-ль – контрольные условия, вд – водный дефицит)

В условиях водного дефицита реакция устойчивой и восприимчивой линии в течение первых суток отличается (рис. 2). У устойчивой линии наблюдали повышение активности транскетолазы, по сравнению с контролем на 80–90 %, в то время как у восприимчивой линии активность транскетолазы относительно контроля падает уже с первых часов опыта.

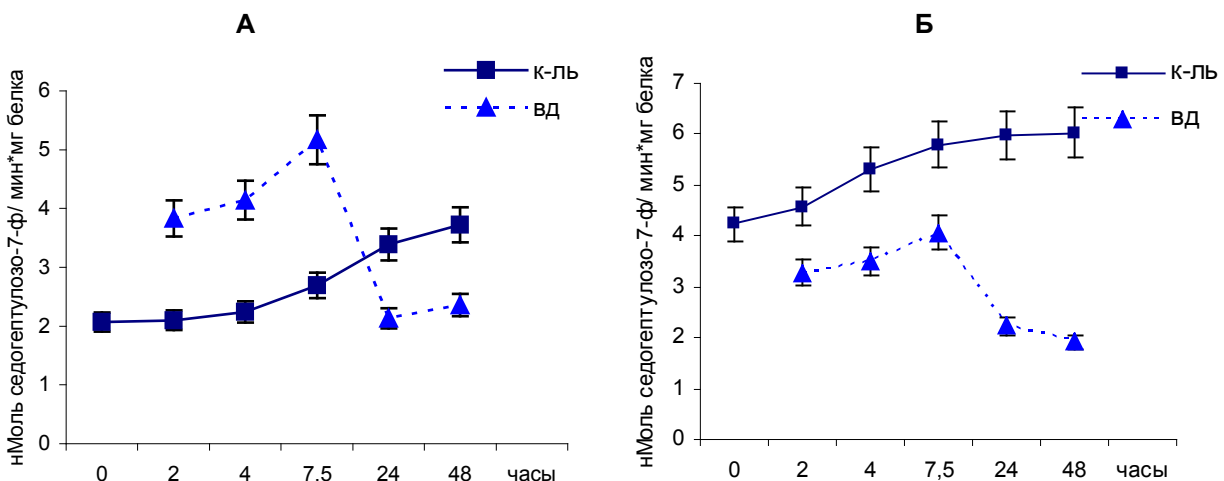


Рис. 2. Активность транскетолазы в семенах контрастных по признаку засухоустойчивости линий кукурудзы (А – устойчивая, Б – неустойчивая) при прорастании (к-ль – контрольные условия, вд – водный дефицит)

Возможно, клетки тканей устойчивой линии характеризуются возрастанием функциональной роли ГМФ-пути (гексозомонофосфатного) окисления глюкозы. В аналогичных клетках тканей неустойчивой линии подобный механизм адаптации отсутствует (Маричева, Родченко, 1985). Образование в пентозофосфатном цикле веществ, отличных от веществ, образуемых при гликолитическом распаде, вероятно, также может быть одной из причин необходимости этого пути окисления в растении при экстремальных условиях существования (Петинов, Аббаров, 1966).

К 24 часам действие водного дефицита приводит к значительному снижению активности транскетолазы у обеих линий. Однако следует отметить, что у устойчивой линии на фоне начального повышения активность фермента составила 63% от контроля и далее не снижалась, тогда как у неустойчивой к 48 часам активность опытного варианта составила 32% от контроля.

Заключение

У устойчивой линии в условиях водного дефицита активность ферментов на начальном этапе его действия повышалась, а в зерновках неустойчивой линии происходило достоверное и стабильное снижение активности ферментов на протяжении всего опыта. Таким образом, активность гексокиназы и транскетолазы зависит от устойчивости линии кукурузы к водному дефициту. Ее динамика различна у линий с разным уровнем устойчивости.

Список литературы

- Головко Т.К. Система показателей в исследованиях роли дыхания в продукционном процессе растений // Физиология растений. – 1985. – Т.32, №5. – С. 1004–1013.
- Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высш. школа, 1980. – 272с.
- Ли М., Ван Г., Лин Ц. Кальций способствует адаптации культивируемых клеток солодки к водному стрессу, индуцированному полиэтиленгликолем // Физиология растений. – 2004. – Т.51, №4. – С. 575–581.
- Ляшок А.К., Григорюк І.П., Нижник Т.П., Феоктістов П.О. Амілолітична і лектинова активність у проростаючих зернівках озимої пшениці за дії високотемпературного стресу // Физиология и биохимия культ. растений. – 2003. – Т.35, №2. – С. 172–177.
- Маричева Э.А., Родченко О.П. Пути окисления глюкозы в клетках корней проростков кукурузы при пониженной температуре // Физиология и биохимия культурных растений. – 1985. – Т.17, №5. – С. 459–463.
- Петинов Н.С., Абларов А.А. Изменение соотношения альтернативных путей дыхания в растениях при засухе // Физиология растений. – 1966. – Т.13, №3. – С. 479–486.
- Петинов Н.С., Размаев И.И. Влияние высоких температур на интенсивность дыхания и углеводный обмен в растениях // Физиология растений. – 1961. – Т.8, №4. – С. 417–424.
- Приходько Л.С. Обмен окси- и кетокислот у проростков гороха и кукурузы в условиях засоления субстрата // Физиология растений. – 1968. – Т.15, №5. – С. 806–812.
- Пшибытко Н.Л., Калитуха Л.Н., Волкова Е.В., Кабашникова Л.Ф. Роль сахаров в адаптации фотосинтетического аппарата к стрессовым факторам // Физиология и биохимия культ. растений. – 2003. – Т.35, №4. – С. 330–341.
- Рахмануилова З.Ф., Федяев В.В., Подашева О.А. и др. Альтернативные пути дыхания и вторичный метаболизм у растений с разными типами адаптивных «стратегий» при дефиците элементов минерального питания // Физиология растений. – 2003. – Т.50, №2. – С. 231–237.
- Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высш. школа, 1967. – 326с.
- Семихатова О.А., Юдина О.С. О роли пентозофосфатного пути окисления глюкозы в дыхании листьев растений в условиях разной температуры // Физиология растений. – 1964. – Т.11, №2. – С. 257–261.
- Семихатова О.А. Об энергетической эффективности дыхания в неблагоприятных условиях // Ботанический журнал. – 1970. – Т.55, №11. – С. 1605–1610.
- Семихатова О.А. О показателях энергетического обмена при дыхании растений // Физиология растений. – 1972. – Т.19, №4. – С. 852–859.
- Семихатова О.А. Энергетические аспекты интеграции физиологических процессов в растении // Физиология растений. – 1980. – Т.27, №5. – С. 1005–1017.
- Тихонова О.В., Молодченкова О.О., Адамовська В.Г., Петров С.А. Метаболізм вуглеводів у зерні кукурудзи при його проростанні за умов водяного дефіциту // Вісник ОНУ. – 2005. – Т.10, №5. – С. 51–57.
- Удовенко Г.В. Физиологические механизмы адаптации растений к различным экстремальным условиям // Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. – 1979. – Т.64, №3. – С. 5–22.
- Bukhov N.G., Mohanty P. Elevated temperature stress effects on photosystems: Characterization and evaluation of the nature of heat induced impairments // In: Concepts in photobiology: Photosynthesis and photomorphogenesis / Ed. G.S.Singhal, G.Renger, S.K.Sopory et al. – New Delhi: Narosa Publ. House, 1999. – P. 617–648.
- Buleon A., Colonna P., Planchot V., Ball S. Starch granules: structure and biosynthesis // Handbook of plant and crop stress / Ed. M.Pessarakli. – New York, 1999. – P. 337–348.
- Douglas C.D., Tsung M.K., Frederick C.F. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize // Plant Physiol. – 1988. – Vol.86. – P. 1013–1019.

Gill P.K., Sharma A.D., Singh P., Bhullar S.S. Effect of various abiotic stresses on the growth, soluble sugars and water relations of sorghum seedlings grown in light and darkness // Bulg. J. Plant Physiol. – 2001. – Vol.27, №1/2. – P. 72–84.

Handa A.K., Bressan R.A., Handa S. et al. Clonal variation for tolerance to polyethylene glycol-induced water stress in cultured tomato cells // Plant Physiol. – 1983. – Vol.72. – P. 645–653.

Jang J.C., Sheen J. Sugar sensing in higher plants // Trends Plant Sci. – 1997. – Vol.2, №2. – P. 208–213.

Jiao J., Grodzinski B. The effect of leaf temperature and photorespiratory conditions on export of sugars during steady-state photosynthesis in *Salvia splendens* // Plant Physiol. – 1996. – Vol.111, №1. – P. 169–178.

Lowry O.H., Rosenbrough N.I., Fan A.Z., Randol R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol.193. – P. 265–275.

Yordanov I., Velikova V., Tsonev T. Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance // Photosynthetica. – 2000. – Vol.38, №1. – P. 171–186.

Zayed M.A., Zeid I.M. Effect of water and salt stresses on growth, chlorophyll, mineral ions and organic solutes contents, and enzymes activity in mung bean seedlings // Biol. plant. – 1997. – Vol.40, №3. – P. 351–356.

Активність гексокінази та транскетолази у зерні кукурудзи при його проростанні в умовах водного дефіциту

О.В.Тихонова, О.О.Молодченкова, С.А.Петров

Вивчено вплив водного дефіциту на активність гексокінази і транскетолази – ферментів гліколітичного і пентозофосфатного шляхів в проростаючих зернівках контрастних за ознакою посухостійкості ліній кукурудзи (*Zea mays* L.). Показано, що активність обох ферментів залежить від стійкості лінії та змінюється впродовж часу дії чинника.

Ключові слова: *кукурудза, гексокіназа, транскетолаза, водний дефіцит.*

Activity of hexokinase and transketolase in germination seeds of maize in the conditions of water deficit

O.V.Tichonova, O.O.Molodchencova, S.A.Petrov

The influence of water deficit on activity of hexokinase and transketolase – enzymes of glycolic and pentosephosphatic ways in seeds of maize lines (*Zea mays* L.) contrasting by the trait of drought-resistance has been studied. It was shown that activity of both enzymes depends on stability of the line and changes during the factor action.

Keywords: *maize, hexokinase, transketolase, water deficit.*

Представлено В.Г.Адамовською

Рекомендовано до друку В.В.Жмурком