

УДК 581.19:581.142:[633.356+631.811.1

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА АКТИВНОСТЬ И СОСТАВ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В СЕМЯДОЛЯХ ГОРОХА ПРИ ПРОРАСТАНИИ

ВАРИЦЕВ Ю. А.

(Кафедра агрономической и биологической химии)

Интенсивность распада запасных веществ семян при прорастании зависит от многих факторов, в частности от уровня минерального питания. Отмечено стимулирующее действие низких доз удобрений на прорастание семян и активность гидролитических ферментов в них [2, 5]. В то же время высокие дозы удобрений могут отрицательно влиять на начальный рост и развитие растений [1].

Одним из основных запасных веществ в семенах гороха являются белки. Доказано, что распад их при прорастании семян происходит под действием протеолитических ферментов, среди которых основную роль играют протеиназы — ферменты, гидролизующие внутренние пептидные связи в белках и пептидах. Активность протеиназ в семядолях гороха определялась по гидролизу некоторых экзогенных (главным образом казеина) и эндогенных белков при прорастании рядом исследователей [10, 11, 12, 14, 15]. В зависимости от условий проращивания и способа выражения активности либо наблюдалось значительное повышение активности [10, 11, 12], либо (в одном опыте) рост не обнаруживался [15].

Применение современных методов при изучении протеаз позволило установить, что в семенах многих растений имеется сложный комплекс пептидаз и протеиназ [3, 13], позволяющий разлагать запасные белки до простых конечных продуктов. Высказано предположение [3], что отдельные ферменты включаются в процесс гидролиза запасных белков на разных этапах прорастания.

Целью наших исследований¹ было изучение процесса распада белков, активности и компонентного состава протеолитических ферментов в зависимости от условий азотного питания проростков гороха.

Материал и методы исследований

Суперэлитные, калиброванные семена гороха сорта Московский 73 проращивали на влажном прокаленном песке в термостате при 22—23°, в темноте, в течение 12 сут с момента замачивания.

В качестве питательного раствора за основу брали смесь Гельригеля, из которой исключали FeCl_3 .

Схема опыта включала три варианта: 1 — РК — смесь Гельригеля без $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ с добавлением $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ по норме Ca в смеси; 2 — N_2PK — смесь Гельригеля с двумя дозами $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 3 — $\text{N}_{0,25}\text{PK}$ — смесь Гельригеля с четвертью дозы $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ с добавлением $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ до нормы Ca в смеси. Через каждые 48 ч, считая с момента

¹ Работа выполнена под руководством профессора Б. П. Плешкова.

замачивания, брали пробы растительного материала. Для анализов использовали отделенные от проростков семядоли.

Содержание сухого вещества определяли после высушивания навески при 105° до постоянной массы; белковый азот — по Барнштейну [4]. Для определения активности протеолитических ферментов за основу брали метод Ансона [9], используя казеин в качестве субстрата. Для этого семядоли растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком и 0,2 М NaCl в 1/15 М фосфатном буфере (рН 6,0), содержащем 0,005 М ЭДТА. Полученный гомогенат доводили до 50 мл и настаивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем переносили суспензию в центрифужные пробирки и центрифугировали 10 мин при 5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость использовали в качестве ферментного раствора. Предварительные исследования показали, что при использовании казеина в качестве субстрата оптимум рН находится в интервале 5,5—7,0, а прирост активности линейно зависит от времени инкубации в течение 2 ч минимум.

Суммарную активность и активность в хроматографических фракциях определяли в фосфатном (рН 6,0) буфере при 30° в течение 1 и 2 ч соответственно. За единицу активности (Е) принимали такое количество фермента, которое в описанных условиях переводит в ТХУ-растворимую форму 1 мкг тирозина за 1 мин. Количество тирозина рассчитывали по калибровочной кривой, построенной на препарате тирозина фирмы «Реанал».

Для изучения компонентного состава протеолитических ферментов проводили хроматографическое разделение ферментных экстрактов на ДЭАЭ-целлюлозе [6] фирмы «Серва» (ФРГ). Для этого ферментные экстракты диализовали на холоду в течение 18 ч против 0,005 М фосфатного буфера (рН 7,4) и после центрифугирования наносили на колонку 1,5×10 см, заполненную активированной ДЭАЭ-целлюлозой, 60—80 мг белка.

Элюция белков достигалась наложением линейного градиента концентрации NaCl (0—0,5 М) в 0,005 М фосфатном буфере (рН 7,4) в объеме 350 мл. Разделение проводили при температуре 5°, со скоростью 30—35 мл/ч. Фракции объемом по 5 мл отбирали с помощью автоматического коллектора со счетчиком капель. Содержание белка определяли по Лоури или спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

Результаты исследований

Относительное содержание белка в семядолях гороха при прорастании постоянно снижалось, особенно быстро с 5-х суток прораста-

Т а б л и ц а 1

Содержание белкового азота в семядолях гороха при прорастании

Вариант	Время прорастания, сут					
	1	3	5	7	9	12
РК	4,14	3,89	3,58	3,14	2,67	2,03
	11,39	10,50	9,06	7,15	4,62	1,64
N ₂ РК	4,15	4,08	3,78	3,55	3,21	2,13
	11,45	11,10	9,87	8,38	6,23	2,49
N _{0,25} РК	4,14	4,01	3,54	3,08	2,72	1,92
	11,45	10,87	8,53	6,75	4,60	1,54

П р и м е ч а н и е. В числителе — % на сухое вещество; в знаменателе — мг на 2 семядоли.

ния, и к концу опыта составляло примерно половину его содержания в покоящихся семенах (табл. 1).

Абсолютное количество белкового азота (в расчете на 2 семядоли) за первые 5 сут прорастания уменьшилось только на 14—26%. Через 7 сут в семядолях было 59—73% исходного количества белка. В последующие 5 сут наблюдался более энергичный распад белков, что согласуется с данными других исследователей [12], наблюдавших максимальное разрушение запасных белков гороха на 8—10-е сутки прорастания. В конце опыта в семядолях оставалось только 13—22% исходного белка.

Т а б л и ц а 2

Протеиназная активность в семядолях гороха при прорастании

Варианты	Время прорастания, сут					
	1	3	5	7	9	12
РК	3,8 <u>13,8</u>	4,2 <u>15,5</u>	5,1 <u>20,2</u>	8,8 <u>38,6</u>	10,7 <u>61,8</u>	8,0 <u>99,3</u>
N ₂ РК	3,9 <u>14,1</u>	3,9 <u>14,3</u>	5,2 <u>19,9</u>	7,4 <u>31,3</u>	8,7 <u>44,9</u>	6,2 <u>52,9</u>
N _{0,25} РК	3,9 <u>14,1</u>	4,0 <u>14,7</u>	5,6 <u>23,2</u>	8,7 <u>39,7</u>	10,9 <u>64,4</u>	8,5 <u>105,6</u>

П р и м е ч а н и е. В числителе — Е на 2 семядоли; в знаменателе — Е на 1 г сухого вещества.

Между вариантами РК и N_{0,25}РК различия как по абсолютному, так и по относительному содержанию белка были незначительны на всем протяжении периода прорастания. Между названными вариантами и вариантом N₂РК разница по этим показателям была значительной, особенно во вторую половину периода прорастания, что указывает на снижение скорости протеолиза белков в варианте N₂РК по сравнению с другими. Так, на 9-е сутки прорастания различия по количеству распавшегося белка между вариантом N₂РК, с одной стороны, и N_{0,25}РК и РК, с другой, достигали 31%.

Активность покоящихся семян гороха равнялась 3,1Е в расчете на 1 семя и 11,2Е — в расчете на 1 г сухого вещества.

Характер изменения активности при разных способах ее выражения несколько различался. Поскольку при прорастании количество сухих веществ и белков постоянно снижается, создается впечатление, что активность возрастает. Более правильно, по мнению исследователей [3] (и с этим трудно не согласиться), выражать активность на 1 семя или на исходную массу семян. Однако при сравнительных исследованиях может быть полезным выражение активности на сухую массу или на белок.

Активность в расчете на 1 семя возрастала до 9-х суток прорастания, а затем несколько снижалась, что отмечалось в работах других исследователей [12]. По сравнению с активностью покоящихся семян она увеличивалась в 3,5 раза в вариантах РК и N_{0,25}РК и в 2,8 раза в варианте N₂РК. Различия по активности между вариантами РК и N_{0,25}РК были невелики и, по-видимому, несущественны; между этими вариантами и вариантом N₂РК в период максимальной активности на 9-е сутки они составляли 23—25%, а на 12-е — 29—37%, что согласуется с данными о замедлении темпов распада белков в семядолях варианта N₂РК при прорастании. При выражении активности на сухую массу наблюдалось повышение ее до конца опыта, причем наиболее быстрое с 7-х по 12-е сутки прорастания, что связано с быстрым

расходом сухих веществ в этот период. Различия между вариантами N_{0,25}РК и РК и вариантом N₂РК были более значительны, чем при выражении на 1 семя, и достигали 38—43% на 9-е сутки и 88—100% — на 12-е. Таким образом, высокие концентрации азота в питательном растворе замедляли распад белков и снижали активность протеолитических ферментов в семядолях прорастающего гороха. Тормозящее действие высоких концентраций азотных солей, вероятно, связано с адаптацией ферментативных процессов к потребностям развивающегося растения [7] при наличии двух источников азотного питания — азота семян и удобрений.

Т а б л и ц а 3

Разделение протеолитических ферментов прорастающего зерна гороха градиентной элюцией на ДЭАЭ-целлюлозе

Компоненты	Ионная сила элюирующего раствора, М	Максимальная УА, Е на мг белка			Максимальная степень очистки			Активность, Е на 100 мг белка				
								РК			N ₂ РК	
		0	3	9	0	3	9	0	3	9	3	9
А	0,12	—	—	0,75	—	—	27,4	—	—	6,03	—	7,20
В	0,20	0,36	0,22	0,36	1,1	3,0	11,5	5,34	6,24	7,71	4,74	5,13
С	0,35	0,60	1,14	1,96	1,8	16,1	60,0	4,83	6,60	7,26	3,84	5,28
Д	0,46	1,38	0,96	1,74	4,1	13,5	61,8	11,67	8,31	7,56	2,04	5,28

Примечание. УА — удельная активность; 0 — покоящиеся семена; 3 — прораставшие 3-е сут; 9 — прораставшие 9 сут.

Разделение протеолитических ферментов гороха на ДЭАЭ-целлюлозе (табл. 3) показало, что в процессе прорастания их компонентный состав изменяется — появляются новые компоненты (А) и, кроме того, происходят количественные изменения в соотношении отдельных компонентов. Так, содержание компонентов В и С (в расчете на 100 мг белка) несколько возрастало, а Д снижалось. Компонентный состав протеолитических ферментов не изменялся в зависимости от условий минерального питания. Что касается количественных изменений, то определенные выводы сделать трудно. Несмотря на то что отмечалось некоторое снижение активности, связанной с компонентом Д в варианте N₂РК, в целом существенных изменений в составе активных компонентов не происходило.

Выводы

1. При проращивании в темноте семян гороха максимальные темпы распада белков наблюдались в период между 7-ми и 12-ми сутками прорастания.

2. При высоких концентрациях азота в питательном растворе снижались темпы распада белков в семядолях.

3. Характер изменения протеиназной активности и распада белков в семядолях был аналогичным. Максимум активности наблюдался на 9-е сутки прорастания.

4. В семядолях, проращиваемых на питательной смеси с высоким содержанием азота, наблюдалось снижение протеиназной активности в период максимального распада белков.

5. Хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе в протеазном комплексе гороха обнаружено четыре компонента, количественное содержание и качественный состав которых изменялись в процессе прорастания.

6. Условия азотного питания не оказали влияния на компонентный состав протеолитических ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдонин Н. С. Подкормка с.-х. растений. М., Сельхозгиз, 1954. — 2. Богданова М. Х. О роли азота в гетеротрофный период развития хлопчатника. «Докл. АН УзССР», 1970, № 2, с. 55—57. — 3. Земчик Е. И., Нгуен Тьен Тханг, Шутов А. Д., Вайнтрауб И. А. О протеолитических ферментах в покоящихся и прорастающих семенах вики. В сб.: Растительные белки, 1972, вып. 10, с. 49—53. — 4. Петербургский А. В. Практикум по агрономической химии. М., «Колос», 1968. — 5. Пешкова А. А. Мобилизация запасных веществ в связи с темпами роста корней прорастающих семян кукурузы. В сб.: Физиолого-биохимические проблемы семеноведения и семеноводства. Ч. 2, Иркутск, 1973, с. 68—73. — 6. Сокольская Т. И., Плешков Б. П. О составе белков семян фасоли. «Изв. ТСХА», 1972, вып. 6, с. 105—115. — 7. Хавкин Э. Е. Ферментные системы

прорастающих семян. В сб.: Физиолого-биохимические проблемы семеноведения и семеноводства. Ч. 2, Иркутск, 1973, с. 103—112. — 8. Шутов А. Д., Вайнтрауб И. А. О разложении белков семян сои и вики при прорастании. В сб.: Растительные белки, 1972, вып. 10, с. 38—41. — 9. Anson M. "J. Gen. Physiology", 1938, vol. 22, N 1, p. 79—86. — 10. Bevers L. "Phytochem.", 1968, vol. 7, p. 1837—1844. — 11. Guardiola J. L., Sutcliffe J. F. "Ann. Bot.", 1971, vol. 35, p. 791—807. — 12. Danielson C. E. "Acta Chem. Scand.", 1951, vol. 5, N 4, p. 541—554. — 13. Kaminski J. K., Bushuk W. "Cer. Chem.", 1969, vol. 46, N 3, p. 317—324. — 14. Yomo J. J., Varner J. E. "Plant Physiology", 1973, vol. 51, p. 708—711. — 15. Young H., Varner J. E. "Arch. Biochem. Biophys.", 1959, vol. 84, p. 71—75.

Статья поступила 8 декабря 1977 г.

SUMMARY

It has been found in the laboratory experiments that high concentrations of nitrogen in the nutrient solution reduce the rate of protein breakdown and the activity of proteolytic enzymes in cotyledons. By means of chromatography on DEAE cellulose, four components of germinating seeds have been found in the protease complex, the quantitative and qualitative composition of these components was changing during the process of germination. The composition and the ratio of the active components were not influenced by the conditions of nitrogenous nutrition.