

УДК 577.11

РОЛЬ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В АДАПТИВНОЙ РЕАКЦИИ КУКУРУЗЫ В УСЛОВИЯХ СОЛЕВОГО СТРЕССА

© 2003 г. А.Т. Епринцев, О.С. Солодилова, Г.Н. Хожайнова

Воронежский государственный университет

Солевой стресс, вызванный хлоридом натрия, индуцировал увеличение количества свободных аминокислот в листьях кукурузы, при этом выявлено изменение в концентрациях глутамата, глутамина, аспартата, аспарагина, валина и аланина. Установлено, что отношение содержания дикарбоновых аминокислот к ароматическим увеличивалось при кратковременной экспозиции. Делается вывод об интенсификации метаболических процессов и усилении синтеза пролина и других стрессовых аминокислот в листьях кукурузы в условиях засоления.

ВВЕДЕНИЕ

Универсальной адаптивной реакцией растительного организма на стрессы, ведущие к водному дефициту, является накопление осморепротекторов, позволяющих поддерживать водный баланс и защищать макромолекулы в клетках [1]. Известно, что в качестве осмолитов могут выступать низкомолекулярные соединения различной природы: сахара, органические кислоты, аминокислоты [1], благодаря которым при высоких концентрациях соли обмен веществ в организме остается не поврежденным.

Особая роль в протекторно-адаптивных механизмах отводится азотистым соединениям, в частности, пулу свободных аминокислот. Важность осморепротекторов данной природы объясняется их полифункциональностью: они обеспечивают регуляцию осмотического давления, детоксикацию свободного аммиака, поставку углеводородных скелетов для энергетического метаболизма и др.

Некоторые исследователи выделяют группу “особых” аминокислот, называемых “стрессовыми”, которые принимают участие в общем адаптивном ответе растительного организма на стрессоры. К ним относятся аланин, фенилаланин, γ -аминомасляная кислота и пролин [2]. Показано, что пролин в условиях солевого стресса не только снижает осмотический потенциал, но и уменьшает вредное воздействие NaCl [3].

Установлено, что способность к аккумуляции пролина обеспечивает солетолерантность растений [4]. Так было показано, что трансгенные растения табака с высоким содержанием пролина обладали повышенной устойчивостью к действию хлорида натрия, при этом пролин в клетках синтезировался *de novo* по глутамат-синтазному пути. Орнитинный путь и катаболизм пролина блокировались в стрессовых условиях [4].

Изменение концентрации аминокислот регулируется интенсивным протеканием не только азотного метаболизма, но и тесно связано с углеводным и энергетическим обменом.

В связи с этим целью данной работы являлось изучение изменения содержания свободных аминокислот в листьях кукурузы в условиях солевого стресса.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали листья 11-дневных проростков кукурузы сорта “Воронежская 76”, выращенных в почвенной культуре. Растения подвергали в течение 24 часов воздействию 1% раствора хлорида натрия, ионы которого обладают низкой физиологической активностью в растительной клетке. Контролем служили образцы, экспонированные в воде. Часть растений перед засолением инкубировали в 0,01М растворе дихлоризобутирата натрия (ДХИБ) в течение 3 часов, чтобы выяснить влияние ретарданта на характер адаптации опытных растений к засолению. Фиксацию растительного материала проводили 96% кипящим этанолом [5]. Содержание свободных аминокислот определяли через 1, 3, 6 и 24 часа экспозиции на аминокислотном анализаторе Т-339 в лаборатории масловых анализов ВГАУ им. К.Д. Глинки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суммарное содержание свободных аминокислот в листьях кукурузы возрастало максимально через 6 часов экспозиции в хлориде натрия по сравнению с контролем и составляло 50,49 мкмоль/грамм сырой массы и 40,23 мкмоль/грамм сырой массы соответственно. При этом доля стрессовых аминокислот в опытных растениях также увеличивалось (табл 1). Качественных различий в содержании свободных аминокислот в листьях кукурузы не было обнаружено.

Содержание свободных аминокислот в листьях кукурузы в условиях солевого стресса, мкмоль/грамм сырой массы

Время засоления, час	Контроль			Опыт		
	1	2	3	1	2	3
1	33,22	3,38	9,75	32,32	3,84	11,89
3	40,89	4,6	11,71	47,69	5	10,52
6	40,23	4,3	10,7	50,49	4,68	9,28
24	53,48	5,66	10,58	43,8	5,06	11,64

1 – общее содержание свободных аминокислот, 2 – количество стрессовых аминокислот, 3 – % стрессовых аминокислот от общего количества.

Отношение содержания дикарбоновых аминокислот к ароматическим в листьях кукурузы в условиях солевого стресса

Время засоления, час	Контроль			Опыт		
	1	2	3	1	2	3
0	13,7	4,1	3,34			
1	8,9	2,5	3,42	11,2	3	3,73
3	9,8	3,3	2,9	11,3	2,7	4,1
6	10,6	3,2	3,31	12,5	2,4	5,2
24	13,8	2,4	5,7	11,5	2,9	3,9

1 – количество дикарбоновых аминокислот, 2 – количество ароматических аминокислот, 3 – отношение содержания дикарбоновых аминокислот к ароматическим.

Важное значение для характеристики метаболических процессов в растительной клетке имеет отношение количества дикарбоновых аминокислот к ароматическим [6]. Данная величина для растений подвергавшихся 24 часовому солевому стрессу принимала положительные значения (табл 2). После 3 часов экспозиции это отношение составило 2,9 единиц для контроля и 4,1 – для опыта, через 24 часа – 5,7 и 3,9 единиц соответственно, первоначальное значение этой характеристики составляло 3,34.

Штеменко и Сорочан (2001г) показали, что при высоких скоростях метаболизма данное отношение изменяется в сторону накопления дикарбоновых, при низких – ароматических аминокислот [6]. Таким образом, в первые часы воздействия стрессора в листьях кукурузы наблюдалась интенсификация метаболизма и дальнейшая его стабилизация на новом энергетическом уровне к 24 часам.

Динамика изменения концентрации дикарбоновых аминокислот и их амидов представлена на рисунке 1. В первый час экспозиции содержание глутамата падало на 26,8%, причем количество глута-

мина здесь было на много ниже, чем в контроле. Возможно это обусловлено интенсивным использованием глутамата в первые часы на биосинтез пролина, являющегося важнейшей стрессовой аминокислотой. Ранее было показано, что в стрессовых условиях пролин синтезируется *de novo* по глутамат-синтазному пути [4]. Содержание глутамата увеличилось после 6 часов экспозиции. Интересно, что концентрация аспарагина по сравнению с контролем возрастала уже к 3 часам засоления, что еще раз подтверждает необходимость аминирования дикарбоновых аминокислот при солевом стрессе, установленную рядом авторов [2,7].

На рисунке 2 показано изменение содержания аланина и валина в условиях солевого стресса. Видно, что в первый час экспозиции в NaCl количество аланина в растениях, подвергавшихся действию стрессора, возрастало по сравнению с контролем на 35,8%. Это наблюдалось на фоне падения концентрации валина в первые 6 часов засоления по сравнению с контролем. Через 3-6 часов содержание аланина снижалось и к 24 часам вновь становилось

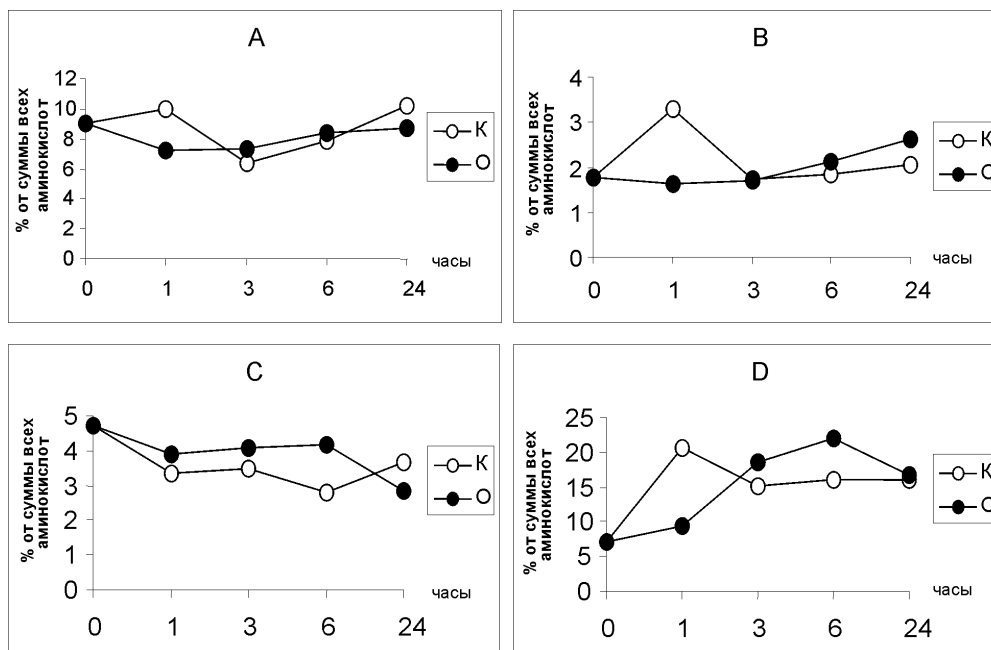


Рис. 1. Динамика содержания дикарбоновых аминокислот и их амидов в листьях кукурузы в условиях солевого стресса. А – глутамат, В – глутамин, С – аспарат, D – аспарагин

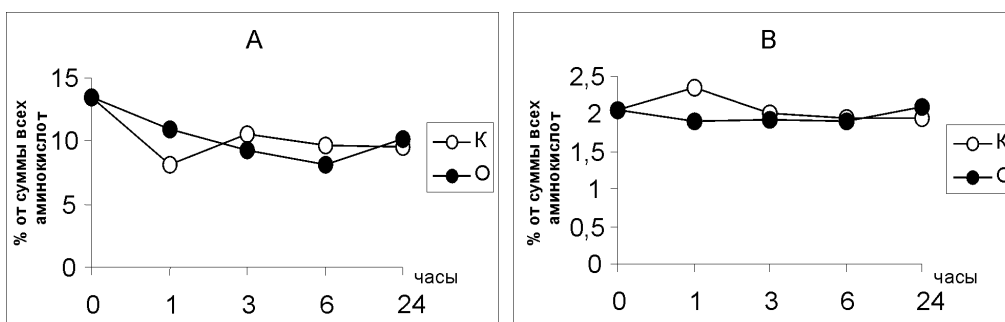


Рис. 2. Изменение количества аланина и валина в листьях кукурузы при засолении. А – аланин, В – валин

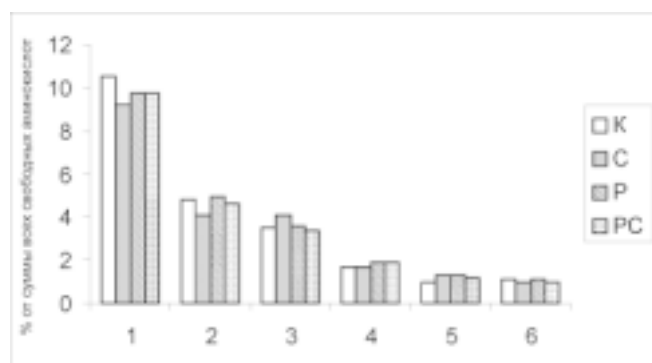


Рис. 3. Изменение содержания некоторых аминокислот в листьях кукурузы в присутствии NaCl и ДХИБ. 1 – аланин, 2 – изолейцин, 3 – аспарат, 4 – глутамин, 5 – лизин, 6 – фенилаланин. К – контроль, С – NaCl, Р – ДХИБ, РС – ДХИБ + NaCl

выше контрольной, количество валина также незначительно возросло.

Известно, что одной из адаптивных реакций растений на действие стрессоров является усиление дыхательного метаболизма, обуславливающее увели-

чение скорости функционирования ЦТК [8]. Количество ацетил-СоА, поставляемого гликолитическим путем может быть недостаточно, т.к. часть пирувата используется на синтез аланина, являющегося одной из стрессовых аминокислот. Учитывая, что для валина и лейцина ранее были показаны пути их деградации в ацетоацетат и ацетил-СоА [9], можно предположить, что в экстремальных условиях недостающий ацетил-СоА мобилизуется для цикла Кребса за счет его синтеза из валина.

Конечные значения концентраций данных аминокислот свидетельствуют о стабилизации метаболизма клетки к 24 часам действия NaCl.

Ранее было показано повышение морозо- и засухоустойчивости озимой пшеницы под влиянием ДХИБ [9]. Под действием данного ретарданта наблюдается увеличение водоудерживающей способности тканей растений [9], что играет важную роль при гиперосмотическом стрессе. Обработка ДХИБ у различных растений вызывает ряд физиологических, биохимических и морфогенетических эффектов

[9]. Однако нас, в первую очередь, интересовало влияние ретарданта на динамику количества свободных аминокислот в листьях кукурузы в условиях солевого стресса. При помещении растений в 0,01М раствор ДХИБ наблюдалось накопление γ -аминомасляной кислоты ГАМК, что свидетельствует о стрессовом действии ретарданта.

После предварительной обработки растений ретардантом содержание таких аминокислот как аланин, фенилаланин, изолейцин, глутамин, аспартат, серин, лизин и некоторых других менялось в ходе солевого стресса менее резко (рис 3). Это позволяет говорить об антидепрессивном воздействии ДХИБ на проростки кукурузы в условиях солевого стресса.

Таким образом, адаптивной реакцией кукурузы на засоление является трансформация метаболизма свободных аминокислот. Сложный многосторонний процесс приспособления включает увеличение общего количества аминокислот, обеспечивающих осмотическую компоненту адаптации. Кроме того, изменение соотношения дикарбоновых и ароматических аминокислот выявило интенсификацию метаболизма изучаемого растения, в том числе катаболических процессов, что необходимо для повышения энергизации клетки. Наконец, выявлена четкая тенденция увеличения стрессовых аминокислот, характеризующая специфическую реакцию клеточного метаболизма при адаптации к солевому стрессу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *П. Хочачка, Дж. Сомеро*. Биохимическая адаптация. М. Мир. 1988. 568с.
2. *В.В. Полевой*. Физиология растений. М. Высш.шк. 1989. 464с.
3. *Delauney A.J. Verma DPS* // Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. Plant J 1993. № 4. p.215-223.
4. *Nancy H. Roosens, Rudolph Willem, Yan Li, Ingrid Verbruggen, Monique Biesemans and Michel Jacobs* // Proline metabolism in the wild-type and in a salt-tolerant mutant of *Nicotiana glauca* studied by ^{13}C -nuclear magnetic resonance imaging. Plant physiology. 1999. vol 121. p. 1281-1290.
5. *А.А. Землянухин, Л.А. Землянухин*. Большой практикум по физиологии и биохимии растений. ВГУ 1996. 121-128 с.
6. *Н.Т. Штеменко, О.О. Сорочан*. // Вільні амінокислоти на ранніх фазах проростання зерна кукурудзи. Физиология и биохимия культурных растений. 2001. т. 33. №5 с. 441-445.
7. *Cheseman J.M.* // Mechanisms of salinity tolerance in plant. Plant physiology. 1988. vol 87. p. 547-550.
8. *Л.Х. Гордон*. Дыхание и водно-солевой обмен растительных тканей. М. Наука. 1976. 119с.
9. *Klaus Daschener, Ivan Coues, Stefan Binder*. // The mitochondrial isovaleryl-coenzyme A dehydrogenase of *Arabidopsis* oxidizes intermediates of leucine and valine catabolism/ Plant phys. 2001. vol. 126. p. 601-612.