

А. А. ПЕШКОВА, член-корреспондент АН СССР Ф. Э. РЕЙМЕРС, Э. Е. ХАВКИН

### АКТИВНОСТЬ КИСЛЫХ И НЕЙТРАЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ В ЭНДОСПЕРМЕ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ ПРИ ПОВРЕЖДЕНИИ АПИКАЛЬНОЙ МЕРИСТЕМЫ КОРНЯ

Основным материалом для синтетических процессов в растущей осевой части прорастающих семян являются продукты гидролитического распада запасов семени. Прорастание сопровождается уменьшением сухого веса эндосперма и увеличением веса осевой части и соответствующим перераспределением азота. В отсутствие экзогенного азота основным источником его для растущей осевой части является распад белков семени при участии протеолитических ферментов эндосперма. Хорошо известно, что удаление осевой части резко замедляет синтез протеолитических ферментов в эндосперме ячменя и семядолях тыквы (1-5). Гораздо слабее изучена взаимосвязь между скоростью роста осевой части интактного проростка, скоростью мобилизации азота и активностью протеолитических процессов в эндосперме или семядолях.

Нами было показано, что приостановка роста корня замедляет рост надземной части проростка кукурузы, расходование запасов семени и накопление сухого вещества и азота в осевой части проростка (6). Если скорость мобилизации азота зависит от уровня протеолитических ферментов, то можно предполагать, что торможение роста осевой части скажется не только на перераспределении азота, но и на активности протеолитических ферментов в эндосперме. Проверка этого предположения показала, что увеличение активности протеолитических ферментов в эндосперме кукурузы действительно замедляется при остановке роста корня двумя описанными ранее способами.

Семена кукурузы гибрид Буковинский-3 выращивали в термостате на влажной фильтровальной бумаге при 27°, ежедневно отбирая для анализа. В опытах с торможением роста двухдневные проростки переносили в чашки Петри. Остановку роста осуществляли двумя путями: механическим — отрезали кончик корня (0—3 мм) и химическим — переносили на раствор  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты ( $10^{-5}$  мол/л). Растения проращивали еще трое суток, пробы брали каждые сутки.

Замороженные сухой уголекислотой эндоспермы растирали в соотношении 1 : 2 в 0,2 М трис-НСl-буфере рН 7,3 с добавлением 0,01 М меркаптоэтанол, центрифугировали 20 мин. при 18 000 об/мин, и надосадочную жидкость использовали для определения протеолитической активности методом Кунитца (7) в нейтральной (рН 7,1) и кислой (рН 5,5) среде. К 1 мл 2% раствора казеина приливали 0,1 мл ферментного экстракта, содержащего 600—400  $\mu$ г белка, смесь инкубировали 30 мин. при 37°, реакцию прекращали добавлением 2 мл 5% ТХУК. Через полчаса пробы

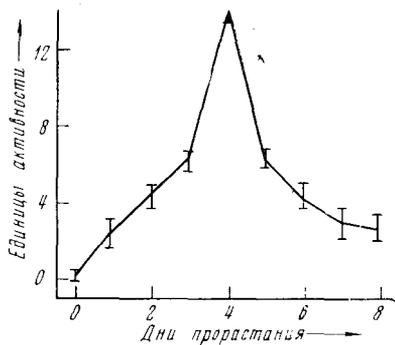


Рис. 1. Изменение активности нейтральных протеаз в эндосперме проростков кукурузы (указана квадратичная ошибка среднего)

центрифугировали 20 мин. при 4000 об/мин и измеряли прирост оптической плотности надосадочной жидкости при 280 мμ против контроля, в котором ТХУК приливали одновременно с ферментом. Скорость расщепления субстрата линейно зависела от количества белка в интервале от 200 до 1000 μг и от времени в интервале от 10 до 50 мин. За относительную единицу активности фермента принимали изменение оптической плотности на единицу за 1 мин. на 1 мг белка экстракта. Содержание белка в экстрактах определяли по методу Лоури и др. (8).

Изменения активности нейтральных протеаз в покоящихся семенах и по мере их прорастания представлены на рис. 1, активность кислых протеаз была выше по сравнению с нейтральными, но подчинялась такой же закономерности. Протеолитическая активность быстро увеличивалась

Таблица 1

Активность протеолитических ферментов в эндосперме кукурузы при остановленном росте корня (указана квадратичная ошибка среднего)

Вариант	Активность протеаз по дням прорастания			
	2	3	4	5
Контроль	$3,2 \pm 0,4$ $6,4 \pm 0,2$	$5,4 \pm 0,6$ $14,8 \pm 2,6$	$14,7 \pm 0,7$ $23,4 \pm 2,4$	$6,2 \pm 0,5$ $18,1 \pm 1,7$
Остановка роста				
механическая	—	$4,0 \pm 0,5$ $10,9 \pm 0,8$	$12,3 \pm 0,05^*$ $19,0 \pm 1,8$	$5,9 \pm 0,4$ $13,6 \pm 1,2^*$
химическая	—	$4,0 \pm 0,8$ $12,0 \pm 1,6$	$10,9 \pm 1,8^*$ $14,5 \pm 2,8^*$	$5,6 \pm 0,5$ $12,6 \pm 2,6^*$

Примечание. Над чертой — протеазы нейтральные, под чертой — кислые.

\* Значимо отличаются от контроля при  $P = 0,95$ .

при прорастании, достигала максимума к четвертому дню развития и затем так же быстро снижалась.

Остановка роста корня снижала активность протеолитических процессов в эндосперме семени (табл. 1). Активность нейтральных протеаз снижалась к пятому дню прорастания в контроле на 8 единиц, при химически остановленном росте корня — на 5 единиц и при механической остановке роста — на 6 единиц и к концу опыта во всех вариантах оказывалась почти на одном уровне, приблизительно в два раза превосходящем активность в эндосперме исходных двухсуточных растений. Активность кислых протеаз уже у двухдневных растений была в два раза выше по сравнению с нейтральными протеазами, дальнейшее увеличение активности кислых протеаз шло значительно быстрее, и к концу опыта она оставалась на более высоком уровне, так что различия между контролем и вариантами с заторможенным ростом корня достигали 6—8 единиц. Остановка роста корня сразу же сказывалась на реальной скорости протеолитических процессов в эндосперме: количество белка, экстрагируемого буфером со сравнительно низкой ионной силой, всегда было больше в контрольных вариантах. Химическая остановка роста сильнее подавляла увеличение активности протеолиза, особенно в случае кислых протеаз.

Таким образом, остановка роста корня, задерживающая рост надземной части и мобилизацию запасов семени, тормозит увеличение активности протеолитических ферментов в эндосперме. Это свидетельствует, на наш взгляд, об определенной взаимосвязи между скоростью роста осевой части и гидролитическими процессами в семени, скорость которых, очевидно, зависит от уровня протеолитических ферментов. Изменения активности гидролитических ферментов в связи со скоростью роста осевой части наблюдали и другие исследователи. Отмечен параллелизм между

удлинением осевой части проростков фасоли, гороха и кукурузы под воздействием гиббереллина и активностью  $\alpha$ -амилазы (9). При воздействии на семена гороха повышенной температурой происходило замедление скорости роста осевой части и снижение активности амилаз и протеаз, хотя оба фермента являются термостабильными (10). В наших опытах увеличение скорости роста осевой части, вызванное экзогенным азотом, сопровождается возрастанием активности протеолитических ферментов в эндосперме кукурузы (неопубликованные данные).

Судя по литературным данным, активность гидролитических процессов в семядолях и эндоспермах семян при увлажнении начинает увеличиваться через определенный промежуток времени после набухания. Предполагается, что за это время гормональные стимулы, активирующие гидролитические процессы, перемещаются из осевой части в эндосперм или семядоли (11-13). Вещество, поступающее из осевой части в эндосперм проростков злаков, является гиббереллиноподобным, так как добавление экзогенного гиббереллина к семенам, лишенным осевой части, восстанавливает активность амилаз и протеаз до исходного уровня (12). Увеличение активности протеаз в семядолях тывки связывают с синтезом клиншинов в кончике корня, поскольку бензшладенин восстанавливает протеолитическую активность (3, 4). Синтез гиббереллинов и клиншинов происходит в кончике корня (14, 15). Естественно, что остановка роста корня приводит к снижению синтеза гормонов и не только замедляет скорость роста надземной части, но и тормозит синтез протеолитических ферментов. Таким образом, замедление мобилизации запасов семени при остановленном росте корня связано с недостаточной активностью протеолитических ферментов, которая, в свою очередь, зависит от скорости синтеза гормонов в кончике корня и их транспорта из осевой части проростка в эндосперм.

Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений  
Сибирского отделения Академии наук СССР  
Иркутск

Поступило  
15 XII 1971

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> L. G. Paleg, *Plant Physiol.*, **36**, 829 (1961). <sup>2</sup> D. Cohen, L. G. Paleg, *Plant Physiol.*, **42**, 1288 (1967). <sup>3</sup> D. Penner, F. M. Ashton, *Nature*, **212**, 935 (1966). <sup>4</sup> D. Penner, F. M. Ashton, *Plant Physiol.*, **42**, 791 (1967). <sup>5</sup> A. M. MacLeod, G. H. Palmer, *Nature*, **216**, 1342 (1967). <sup>6</sup> А. А. Петкова, Ф. Э. Реймерс, Э. Е. Хавкин, *ДАН*, **200**, 1476 (1967). <sup>7</sup> M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947). <sup>8</sup> O. H. Lowry, N. J. Rosebrough et al., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951). <sup>9</sup> M. Katsumi, M. Fukuhara, *Physiol. plantarum*, **22**, 68 (1969). <sup>10</sup> A. Rameshwar, P. L. Steponkus, *Physiol. plantarum*, **24**, 347 (1971). <sup>11</sup> E. W. Simon, A. Meaney, *Plant Physiol.*, **40**, 1136 (1965). <sup>12</sup> M. J. Chrispeels, J. E. Varner, *Plant Physiol.*, **42**, 398 (1967). <sup>13</sup> W. Lorraine, M. F. Floyd, *Physiol. plantarum*, **20**, 688 (1967). <sup>14</sup> A. Crozier, D. M. Reid, *Canad. J. Bot.*, **49**, 967 (1971). <sup>15</sup> C. Weiss, Y. Vaadia, *Life Sci.*, **4**, 1323 (1965).