

Г. А. ШАЛАХМЕТОВА¹, З. А. АЛИКУЛОВ²

ПРОТЕКТОРНАЯ РОЛЬ МОЛИБДЕНА ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ И ДЕЙСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ МОЛИБДОФЕРМЕНТОВ ПШЕНИЦЫ

¹Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина, г. Алматы,

²Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева, г. Астана

Изучена протекторная роль молибдена и молибденсодержащих ферментов в устойчивости пшеницы к холоду, эффект предпосевного прайминга зерна, а также возможные условия, усиливающие ингибирующее действие неблагоприятных факторов окружающей среды.

Было неоспоримо доказано, что при предпосевной обработке семян озимой пшеницы молибденом, у проростков этого растения резко возрастает устойчивость к холоду (Vankova-Radeva et.al., 1989). Однако до сих пор такой эффект молибдена оставался невыясненным. Поскольку молибден является основным компонентом активного центра молибденсодержащих ферментов (Мо-ферменты), можно предположить, что эти ферменты могут играть важную роль в проявлении устойчивости пшеницы к низкой температуре.

В настоящее время в растениях обнаружены Мо-ферменты – нитратредуктаза (НР), альдегидоксидаза (АО), ксантиндегидрогеназа (КДГ), и сульфитоксидаза (СО). Самой подробно изученной среди этих ферментов является НР, которая играет ключевую роль в ассимиляции нитрата. Многочисленные результаты показывают, что нитратное питание не только улучшает рост, развитие и урожайность растений (Hageman and Lambert, 1988), но и повышает устойчивость растений к засолению (Speer and Kaiser, 1994). Установлено, что в корнях бобовых растений КДГ участвует в катаболизме пуринов. Главным источником азота, входящего в состав пуринов, является аммоний, полученный азотфиксацией атмосферного молекулярного азота симбиотическими клубеньковыми бактериями. Пурины в корневых клетках катаболизируются с образованием уреидов, которые являются энергетически выгодной транспортной и запасной формой азота у растений. С другой стороны, листья бобовых растений, корни и листья высших растений также содержат высокоактивную КДГ, т.е. значение этого фермента для растений не до конца выяснено. В последнее десятилетие установлено, что молибдофермент АО участвует в биосинтезе важного фитогормона адаптации-абсцисовой кислоты (АБК) (Marin and Marion-Poll, 1997), т.е. именно этот фермент может играть центральную роль в устойчивости растений к холоду.

В данной работе представлены результаты по изучению протекторной роли молибдена и молибденсодержащих ферментов в устойчивости пшеницы к холоду, об эффекте предпосевного прайминга зерна, а также о возможных условиях, усиливающих ингибирующее действие неблагоприятных факторах окружающей среды.

Материалы и методы

В наших исследованиях использовали семена пшеницы, которые стерилизовали в течение 5 мин. в 1% NaClO, затем тщательно промывали дистиллированной водой. В чашки Петри помещали по 30 семян на 3-х слойной фильтровальной бумаге Whatman № 1. Семена пшеницы проращивали отдельно, на средах, содержащих различные источники азота в концентрации 4,5 mM, также источником азота служил 5 mM раствор NH_4NO_3 .

Ежедневно в чашки Петри добавляли по 2 мл бидистиллированной воды. Семена проращивали в течение 10 дней при температуре 25 °C в термостате.

Прайминг проводили с 50 mM раствором молибдата натрия, семена пшеницы находились в течение 30 часов в растворе молибдата натрия при комнатной температуре в темноте. Затем семена высушивали в течение 25-30 часов, также при комнатной температуре. Для изучения влияния вольфрама (W) на активность молибдоферментов корней пшеницы, семена инкубировали в течение 24 ч в растворе 1 mM молибдата или вольфрамата. Такая концентрация этих солей не влияла на рост проростков.

Приготовление экстрактов органов растения, определение активности молибоферментов НР, КДГ и АО проводили по методу Саги и др. [15].

Молибденовый кофактор (Mo-со). Активность Mo-со определялась, модифицированный нами, высокочувствительным методом с использованием мутанта по НР *nit-1 Neurospora crassa* [Savidov et al/ 1998].

Результаты и обсуждение

В вышеуказанных исследованиях молибдат был добавлен в почву осенью на стадии второго листа пшеницы (Vankova-Radeva et.al., 1989). В наших экспериментах мы обрабатывали сухие покоящиеся семена озимой пшеницы с использованием метода прайминг. Было установлено, что предпосевное замачивание семян до насыщения водой и их последующее высушивание приводит к повышению всхожести семян, улучшению темпа и синхронности роста проростков (Koehler et.al. 1997). Наши эксперименты показали, что семена пшеницы полностью насыщаются водой в течение 30 часов, и затем полностью обезвоживаются при высушивании также через 30 часов при комнатной температуре. Такую обработку пере проращиванием мы использовали для насыщения семян важными элементами, в частности с молибденом.

Так, при прайминге семян пшеницы в присутствии до 50 мМ молибдата, семена не только насыщались этим металлом, но и улучшилась их всхожесть и темп роста проростков.

Прорастание семян пшеницы ингибировалось на 50%, в присутствии 25 мМ соли кадмия в среде роста. А когда семена замачивали в течение 24-30 часов в растворе 25 мМ молибдата, а затем высушивали, их рост на среде, содержащей ту же концентрацию тяжелых металлов, такого ингибирования роста не наблюдалось, и наоборот, когда семена сначала замачивались в той же концентрации тяжелых металлов и пророщивались на среде с молибдатом, тяжелые металлы ингибировали рост на 70%. Такой эффект с вольфраматом не наблюдался, даже 50 мМ соль вольфрамата не защищала проростки от ингибирующего действия тяжелых металлов (рис. 1).

Прорастание семян и рост проростков испытывали на устойчивость к низким температурам при температуре 2 °C.

Проростки, выращенные в среде, содержащей 25 мМ соли кадмия, сильно отставали в росте и через 5-7 дней увядали. Семена, предварительно замоченные в растворе молибдата (прайминг в Mo), проростки росли нормально и были устойчивы к холода.



Рис. 1. Влияние прайминга семян пшеницы в растворах молибдата, вольфрамата и кадмия на устойчивость проростков к низким температурам:

1 – контроль-прайминг семян в H_2O ; 2 – прайминг в растворе Mo; 3 – в растворе W; 4 – в растворе Cd; 5 – в растворе Cd+Mo; 6 – в растворе Cd+W; 7 – прайминг в H_2O , рост на среде с Cd; 8 – прайминг в H_2O , рост на среде Cd+Mo; 9 – прайминг в H_2O , рост на среде Cd+W; 10 – прайминг с Mo, рост на среде с Cd

Поскольку Mo входит в состав молибденсодержащих ферментов растений, нами были сделаны попытки выяснить биохимические механизмы действия этого металла на рост и развитие проростков. Мы определяли активность НР, КДГ и АО в семенах и корнях проростков после вышеупомянутых обработок.

Как видно из рис. 2, прайминг семян в присутствии кадмия сильно ингибирировал активность молибоферментов зародыша зерна пшеницы. Активность НР ингибирировалась полностью. Это объясняется тем, что в зародыше сухого покоящегося зерна этот фермент не содержится. В покоящемся зерне НР синтезируется после замачивания зерна в течение 20 часов и только в присутствии нитрата.

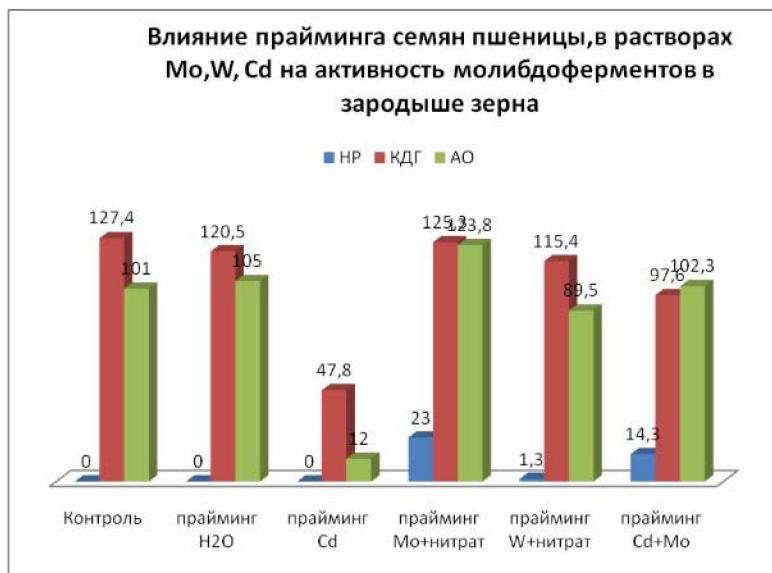


Рис. 2. Влияние прайминга семян пшеницы в растворах молибдата, вольфрамата и кадмия на активность молибоферментов (НР, КДГ и АО) в зародыше зерна.

Поскольку при совместном присутствии в среде кадмия с молибдатом, ферменты сохраняли свою активность, можно предположить, что кадмий атакует место связывания Mo в активном центре НР, а присутствие молибдена защищает это место от атаки тяжелого металла. Известно, что искусственный донор электронов восстановленный метилвиологен (MVH) непосредственно передает электроны в молибденовый центр НР. Кадмий также ингибирировал активность MVH + НР, т.е. именно молибден-связывающий центр НР подвергается действию тяжелого металла. Химический аналог молибдена – вольфрам не способен к защите активного центра НР.

Аналогичные результаты получены и в отношении других молибоферментов зародыша зерна КДГ и АО (рис. 2). Однако КДГ меньше поддается ингибирированию тяжелым металлом, и, по-видимому, это связано с большим периодом полужизни этого фермента.

После прайминга с кадмием зерно пшеницы вообще не прорастало (рис. 3), даже в среде, содержащей различные концентрации Mo. В то же время, семена после прайминга в H₂O, при одновременном присутствии молибдена с кадмием, росли нормально. Проростки, выросшие из зерен, которые предварительно были замочены в 25 мМ растворе молибдата, также росли в среде содержащей 25 мМ кадмий (рис. 1).

Таким образом, тяжелый металл кадмий *in vivo* ингибирирует активность молибоферментов, а предварительное насыщение зерен молибденом защищает их активность.

Анализируя накопленные литературные данные, мы пришли к выводу, что а) в кислой почве тяжелые металлы очень подвижны и легко поглощаются корнями растений; б) относительно высокое содержание в почве тяжелых металлов, имеющие высокое сродство к дитиолам, могут ингибирировать активность молибдокофактора (Mo-со); в) в результате ингибирирования Мосо, теряют активность и Мо-ферменты – нитратредуктаза (НР), альдегид-оксидаза (АО) и ксантидегидрогеназа (КДГ). АО является ключевым ферментом в биосинтезе АБК, которая включает все процессы адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды, в том числе и к низким

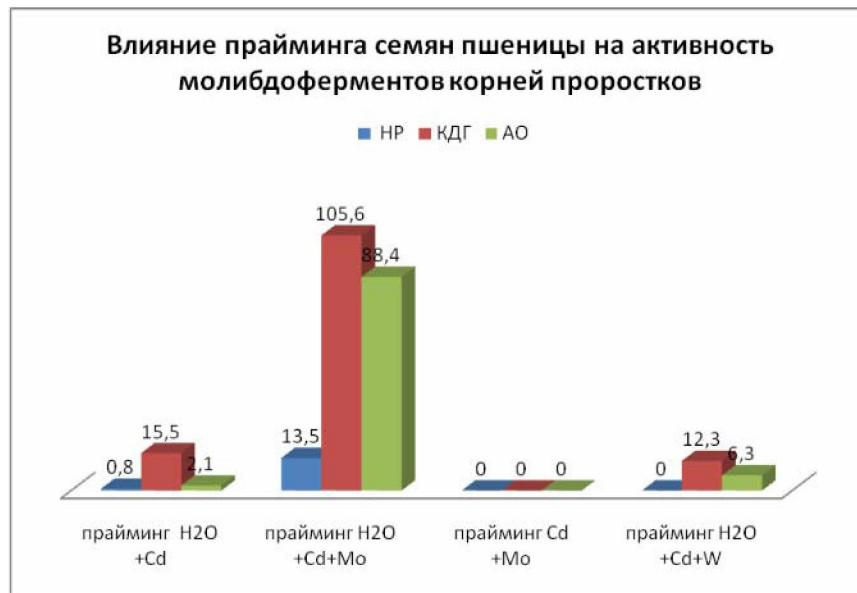


Рис. 3. Влияние прайминга семян пшеницы на активность молибдоферментов корней проростков

температурам (Marin and Marion-Poll, 1997). Общепризнано, что продукт каталитической реакции КДГ – мочевая кислота, является потенциальным водорастворимым антиоксидантом. Известно, что неблагоприятные условия окружающей среды вызывают окислительный стресс в растительной клетке. Таким образом, инактивация АО, КДГ и НР может привести к высокой чувствительности растений к низким температурам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vankova-Radeva R., Schiemann J., Mendel R., Salcheva G. Stress and molybdenum- containing complex (molybdenum cofactor) in winter wheat seeds // Plant Physiol. – 1989. – 87. – P. 533-535.
2. Hageman R.H., Lambert R.J. The use of physiological traits for corn improvement // Agronom. Monograph. – N 18. – Am. Soc. Agron. & Soil Sci. Soc. Madison. – WI. 1988. – P. 431-461.
3. Speer M., Brine A., Kaiser W.M. Replacement of nitrate by ammonium as the nitrogen source increases the salt sensitivity of pea plants. I. Ion concentrations in root and leaves // Plant, Cell and Environ. – 1994. – V. 17. – P. 1215-1221.
4. Marin E., Marion-Poll A.S. Tomato flacca mutant is impaired in ABA aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase activities // Plant physiol.Biochem. – 1997. – V. 35. – P. 369-372.
5. Sagi M., Fluhr R., Lips H. Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in flacca tomato mutant with deficient abscisic acid and wilty phenotype // Plant physiol. – 1999. – V. 120. – P. 571-578.
6. Savidov N., Alikulov Z., Lips H. Identification of an endogenous NAD(P)H-generating system coupled to nitrate reduction in vitro in plant and fungal crude extracts // Plant Sci. – 1998. – V. 133, N 1. – P. 33-45.

Г. А. Шалахметова, З. А. Аликұлов

ТӨМЕН ТЕМПЕРАТУРА ЖАҒДАЙЫНДА МОЛИБДЕННИҢ ПРОТЕКТОРЛЫҚ РӨЛІ ЖӘНЕ АУЫР МЕТАЛДАРДЫҢ БИДАЙ МОЛИБДЕНФЕРМЕНТТЕРИНІҢ БЕЛСЕНДІЛІГІНЕ ӘСЕРІ

Молибденнің және құрамында молибден бар ферменттердің бидайдың сүйкә төзімділігін арттырудағы рөлі зерттелді. Сонымен қатар егу алдындағы дәнді праймингтеудің әсері және қоршаған ортаның жағымсыз факторларының көрінісін зерттеді.

G. A. Shalakhmetova, Z. A. Alikulov

THE PROTECTIVE ROLE OF MOLYBDENUM AT LOW TEMPERATURES AND EFFECT OF HEAVY METALS ON ACTIVITY OF MOLYBDENUM- CONTAINING ENZYMES

The protective role of molybdenum and molybdenum - containing enzymes in resistant of wheat to cold and effect of a preceding priming of grain, and also the possible conditions strengthening inhibition action of adverse factors of environment is studied.