

УДК 581.19:577.152.34

**О. М. Андрієвський**, канд. біол. наук, доц., **В. О. Кучеров**, мол. наук. співроб., **В. М. Тоцький**, д-р біол. наук, проф.

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,  
кафедра генетики та молекулярної біології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

## ОРГАНО-ТКАНИННИЙ РОЗПОДІЛ АКТИВНОСТІ ГІДРОКСИДНОЇ ПЕПТИДГІДРОЛАЗИ В ОКРЕМИХ СОРТІВ ПШЕНИЦІ НА ПОЧАТКОВИХ СТАДІЯХ РОЗВИТКУ

Вивчали активність гідроксидної пептидгідролази органів і тканин етіологованих паростків чотирьох озимих сортів м'якої пшениці. Виявлено сортові відмінності в прояві ферментативної активності на ранніх стадіях розвитку. Показано зв'язок активності пептидгідролази зі стійкістю рослин до низьких температур, обговорена можлива роль цього ферменту у формуванні механізмів стійкості рослин до дії екстремальних факторів навколишнього середовища.

**Ключові слова:** пептидгідролаза, сорти пшениці, стадії розвитку.

Зміни в системі протеолізу тісно пов'язані з онтогенезом пшеничної рослини на всіх його етапах. Цей зв'язок спостерігається вже з моменту проростання зерна і початку формування органів рослини [1], далі під час його росту і розвитку [2] і нарешті в період формування зернівки і досягнення нею повної спілості [3, 4]. З протеолітичною активністю ферментів пов'язана експресія окремих ознак і властивостей рослин: висота, продуктивність, якісний склад і технологічні властивості зерна та багато іншого [5]. Крім того, є підстави думати, що ступінь виразності тієї чи іншої ознаки значною мірою обумовлений якісно-кількісним складом протеолітичних ферментів і інтенсивністю процесів протеолізу в організмі, що розвивається [6].

Протеолітичні ферменти беруть участь у формуванні стійкості рослин до різних вірусних, бактеріальних і грибкових захворювань, а також до комах-шкідників [6, 7]. Виявлено сортові відмінності змін ефективності протеолізу у рослин м'якої пшениці у відповідь на зараження патогеном [8, 9]. Це дозволило запропонувати спосіб виявлення стійких до патогену форм рослин за допомогою біохімічних досліджень [10].

Протеолітичні ферменти беруть участь у формуванні морозостійкості рослин озимої пшениці; при цьому між інтенсивністю протеолізу і морозостійкістю сортів пшениці спостерігається пряма залежність [11]. Відмінності серед сортів озимої м'якої пшениці за рівнем активності протеолітичних ферментів сприяють розробці нового підходу до

визначення фізіолого-біохімічних особливостей сортів на ранніх стадіях розвитку рослин [1].

Наведені факти вказують на важливу роль протеолітичних ферментів в онтогенезі м'якої пшениці і спонукають до подальшого вивчення цих ферментів у зв'язку з необхідністю створення нових сортів пшениці, стійких до патогенів та несприятливих умов.

Метою даних досліджень було з'ясування інтенсивності протеолізу в паростках різних сортів озимої м'якої пшениці, які відрізняються стійкістю до грибкових захворювань та інших несприятливих чинників. Вивчення процесу протеолізу на стадії паростків актуально тому, що саме на ранніх стадіях розвитку важливо спрогнозувати ступінь адаптації рослин до екстремальних умов середовища, а також інші ознаки і властивості, що визначають відмінності між сортами [1, 11].

### **Матеріали і методи**

Дослідження провадили на етіологованих паростках чотирьох озимих сортів м'якої пшениці: Сирена одеська, Одеська 267, Фантазія одеська і Застава одеська. Ці сорти створені в Селекційно-генетичному інституті (м. Одеса) і внесені до Реєстру сортів України після 1995 року. Сорт Сирена одеська має високу морозо- і зимостійкість, а також жаро- і посухостійкість, польову стійкість до борошністої роси, бурої іржі, жовтої іржі; сорт толерантний до стеблової іржі і фузаріозу колоса. СОРТУ Одеська 267 властива дуже висока морозостійкість, зимостійкість вище середньої, жаростійкість і висока посухостійкість; оцінки його стійкості до хвороб у балах: борошніста роса — 5, бура іржа — 3, стеблова іржа — 5, вірусна жовта карликовість — 4. У сорту Фантазія одеська зимостійкість вище середньої, дуже високі жаро- і посухостійкість, висока польова комплексна стійкість до борошністої роси, бурої іржі, летючої сажки. Сорт Застава одеська має високі показники зимостійкості і посухостійкості, високу стійкість до борошністої роси, бурої, жовтої і стеблової іржі, толерантний до фузаріозу колоса [12].

Замочування зерен і вирощування паростків провадили на вологому фільтрувальному папері в скляних посудинах об'ємом 250 мл у темряві при кімнатній температурі (18—20 °С). Для одержання листових пластинок у кожену посудину поміщали по 15 зерен. Для одержання коренів паростків у кожену посудину поміщали по 25 зерен. Через добу відбирали по 10 набряклих зерен. Зерна, що залишилися в кожній з посудин, пророщували до отримання 6-добових паростків, з яких відбирали корені та залишки зерен. Досліджуваний матеріал (набряклі зерна, залишки зерен, корені і листові пластинки) поміщали в окремі пробірки і зберігали в морозильній камері. Отримані зразки тканин розтирали протягом двох хвилин у порцеляновій ступці з екстрагуючим буфером (0,1 М гліцин-NaOH буфер рН 9,0) у співвідношенні 1:3 (маса : об'єм). Після 20 хвилин екстракції на холоді проби центрифугували при 12000 об./хв протягом 5 хв. Отримані

супернатанти використовували як ферментний розчин. Вміст білка в отриманих екстрактах визначали за методом Лоурі і співавторів при довжині світлової хвилі 750 нм за допомогою спектрофотометра СФ-26; вихідний ферментний розчин попередньо розводили в 10 разів. Активність протеолітичних ферментів визначали при довжині світлової хвилі 382,5 нм, використовуючи синтетичний субстрат БАПНА, гідроліз якого проходив при 42 °С [13, 14]. За результатами спектрофотометрування досліджуваних зразків будували графіки кінетики протеолізу, а також розраховували загальну активність ферментів (ЗА), виражену в міліодинаціях на 1 мл досліджуваного розчину (мО/мл). Питому активність (ПА) виражали в міліодинаціях на 1 мг білка, що знаходився у вихідному розчині (мО/мг). За 1 міліодинацію ферментативної активності приймали кількість ензиму, що призводить до утворення 1 мкмоль п-нітроаніліну за 1 хв при зазначеній температурі. Отримані дані обробляли статистично [15].

### **Результати досліджень та їх аналіз**

Нас цікавила мінімальна тривалість екстракції, протягом якої основна частина досліджуваного ферменту переходить із тканин рослини в екстрагуючий розчин. Одночасно слід було з'ясувати, як впливає тривалість екстракції на пептидгідролазну активність в пробах. Для цього ми провели дослідження на етіологованих листових пластинках 7-добових паростків і на сухих зернах пшениці сорту Застава одеська. Гомогенати тканин листових пластинок у буфері центрифугували зразу ж після отримання (додаткова екстракція — 0 хв), а також після інкубації гомогенату (додаткова екстракція ферментів протягом 20 і 40 хв при температурі +4 °С). Сухе зерно також розтирали в буферному розчині і витримували перед центрифугуванням 0, 20, 40 і 60 хвилин. Надосадову рідину після центрифугування обережно зливали в окремі пробірки, а до осаду, що залишився, повторно доливали відповідну кількість екстрагуючого розчину, ресуспендували осад скляною паличкою, витримували той же час, що і при першій екстракції, і знову центрифугували. У випадку листових пластинок повторно екстрагували осад у пробах, які на першому етапі дослідження інкубували протягом 40 хвилин, у випадку сухого зерна повторно екстрагували осад із проб, що раніше не інкубувалися. Отримані надосадові рідини зливали в окремі пробірки й аналізували з метою виявлення активності протеолітичних ферментів.

Як видно з рис. 1, рівені активності протеолітичних ферментів листових пластинок у пробах із тривалістю екстракції 0, 20 і 40 хвилин практично збігаються, що свідчить про однаково ефективну екстракцію ферментів із тканин листа в усіх варіантах дослідження. Дещо інші дані отримано в експериментах із сухим зерном (рис. 2). З'ясувалося, що екстракція ферментів з тканин сухого зерна відбувається значно повільніше, ніж із тканин листової пластинки. На підставі зазначених дослідів ми прийшли до висновку, що для оптимального

екстрагування пептидгідролази із досліджуваного матеріалу потрібна додаткова екстракція осаду тривалістю 20 хв, що й застосовували у подальшій роботі.

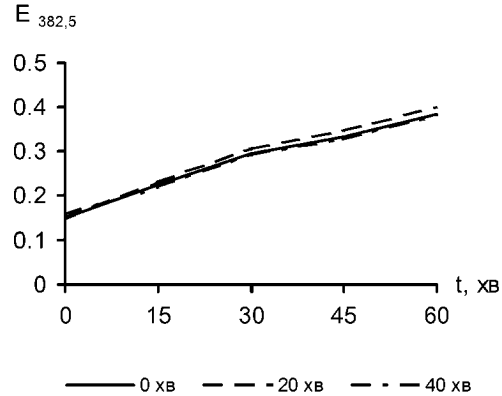


Рис. 1. Залежність елюювання пептидгідролази із листя 7-добових паростків пшениці сорту Застава одеська від тривалості екстракції

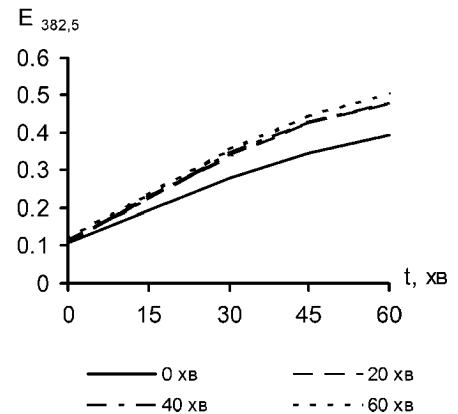


Рис. 2. Залежність елюювання пептидгідролази із сухого зерна пшениці сорту Застава одеська від тривалості екстракції

Відмінності у протеолітичній активності екстрактів тканин паростків для чотирьох досліджуваних озимих сортів м'якої пшениці виявилися досить істотними. Слід зазначити, що ці міжсорткові відмінності спостерігалися у всіх досліджуваних тканинах рослин і мали схожу спрямованість.

Виявилося (рис. 3—7), що у порівнянні з іншими сортами протеолітична активність паростків сорту Застава одеська є значно меншою. Це спостерігалось у дослідгах на залишках зерен і коренях, етіюльованих листах, а також на сухому і замоченому зерні.

Найбільша протеолітична активність виявлена в екстрактах із сухих зерен (рис. 3). Стартові значення екстинкцій в екстрактах сортів Сирена одеська, Одеська 267 і Фантазія одеська були однаковими і значно вищими, ніж в екстрактах паростків сорту Застава одеська. До 60-ї хвилини вимірів (з моменту додання у проби субстрату БАПНА) значення екстинкцій для екстрактів паростків перших трьох сортів відрізнялися одне від одного максимально на 0,1 од., а від Застави одеської — на 0,2—0,3 од.

В екстрактах замочених на одну добу зерен активність була меншою, ніж в екстрактах із сухих зерен, однак міжсорткові відмінності зберігалися (рис. 4).

Схожі закономірності спостерігали при визначенні протеолітичної активності в залишках зерен і коренях паростків. У залишках зерен максимальні розходження екстинкцій на 60-й хвилині інкубації проб для різних сортів склали 0,15 од.; найменші значення екстинкцій властиві екстрактам із паростків пшениці сорту Застава одеська (рис. 5). У коренях паростків максимальні міжсорткові відмінності

протеолітичної активності склали не більше 0,1 од., за винятком паростків Застави одеської, екстракти яких виявляли дещо меншу протеолітичну активність (рис. 6).

Найбільш чіткі відмінності з боку активності протеолітичних ферментів виявлено у листах паростків. Значення активності у сортів Сирена одеська, Одеська 267 і Фантазія одеська практично збігаються у всіх пунктах вимірів і мають високі значення — майже вдвічі вищі за такі у сорту Застава одеська (рис. 7).

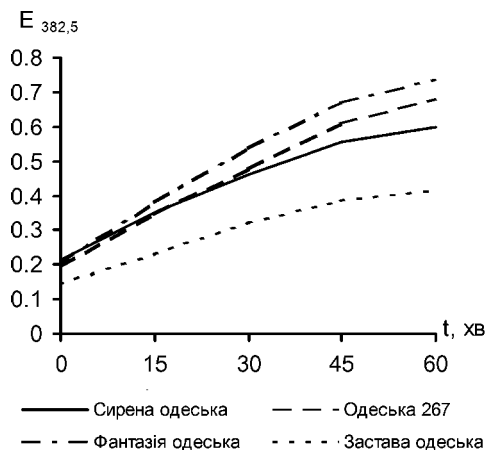


Рис. 3. Інтенсивність розщеплення субстрату БАПНА пептидгідролазою сухого зерна досліджувальних сортів пшениці

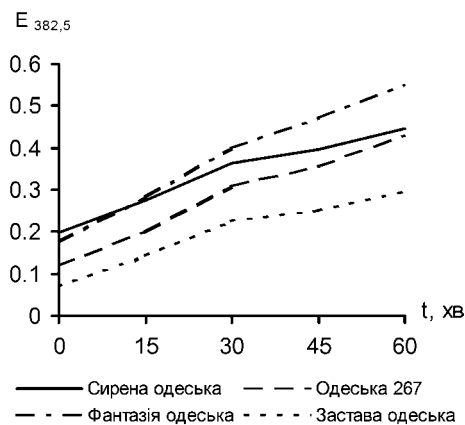


Рис. 4. Інтенсивність гідролізу субстрату БАПНА пептидгідролазою замоченого на 1 добу зерна різних сортів пшениці

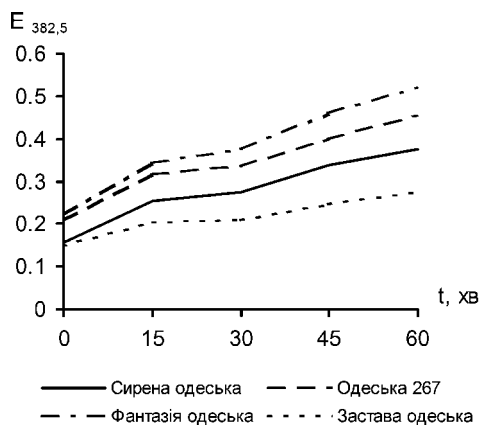


Рис. 5. Динаміка гідролізу субстрату БАПНА пептидгідролазою залишків зерен 6-добових паростків чотирьох сортів пшениці

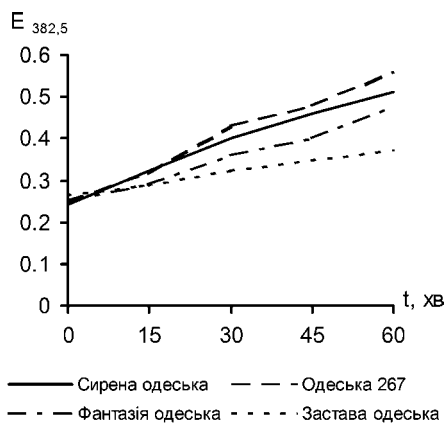


Рис. 6. Динаміка гідролізу субстрату БАПНА пептидгідролазою корінців 6-добових паростків досліджуваних сортів пшениці

Найбільша активність БАПНАаз виявлена в листах і коренях паростків — органах, що, можливо, визначають морозовитривалість усієї рослини. У сортів Сирена одеська і Застава одеська питома активність пептидгідролази у листах (відповідно 3,8 мО/мг і 2,1 мО/мг) на 60-й хвилині вимірів була найвищою у порівнянні з цим же показником інших органів рослин. Питома активність ферменту у сортів Одеська 267 і Фантазія одеська була найбільшою в листах і коренях (табл. 1).

Таблиця 1

**Пептидгідролазна активність органів і тканин 6-добових паростків окремих сортів пшениці (М ± m)**

№	Сорти	Органи паростків									
		Сухе зерно		Замочене зерно		Залишки зерен		Корінь		Лист	
		ЗА	ПА	ЗА	ПА	ЗА	ПА	ЗА	ПА	ЗА	ПА
1	Сирена одеська	19,3 ±1,8	1,8 ±0,2	12,4 ±0,1	1,6 ±0,1	10,9 ±0,1	1,5 ±0,0	13,4 ±0,9	3,1 ±0,2	21,9 ±4,4	3,8 ±0,5
2	Одеська 267	24,3 ±0,8	2,1 ±0,1	15,6 ±1,2	2,1 ±0,2	12,4 ±1,4	2,0 ±0,2	15,5 ±0,3	4,0 ±0,1	21,8 ±2,9	3,9 ±0,4
3	Фантазія одеська	26,6 ±1,2	2,5 ±0,1	18,7 ±1,3	2,5 ±0,2	15,0 ±0,6	1,9 ±0,1	11,4 ±0,6	3,5 ±0,2	21,0 ±2,3	3,5 ±0,7
4	Застава одеська	13,6 ±0,4	1,5 ±0,1	11,4 ±1,4	1,6 ±0,2	6,4 ±0,6	1,0 ±0,1	5,4 ±0,1	1,4 ±0,1	10,6 ±2,2	2,1 ±0,5

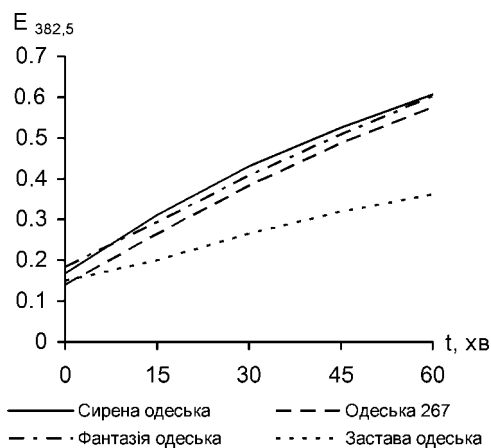


Рис. 7. Динаміка гідролізу субстрату БАПНА пептидгідролазою листя 6-добових паростків окремих сортів пшениці

Незважаючи на те, що у вегетативних органах рослин (лист, корінь) і в ендоспермі в умовах наших дослідів виявляється одна і та ж пептидгідролазна активність (субстрат БАПНА), є підстави вважати, що ця активність у зерні на ранніх стадіях онтогенезу виконує важливу роль у мобілізації запасних білків, тоді як у клітинах листа і кореня вона бере участь у механізмах захисту рослини від несприятливих факторів навколишнього середовища.

Виходячи з наведених даних, можна припустити такий варіант одного із можливих напрямків механізмів адаптації рослин до низьких температур. БАПНАзи, що є трипсиноподібними (або родинними) високоспецифічними ферментами, першими розщеплюють пептидні зв'язки в білках клітин листів і коренів за місцем локалізації аргініну і лізину, тим самим роблячи їх доступними для інших пептидаз. У кінцевому підсумку узгоджена робота протеолітичної системи приводить до підвищення концентрації діамінокислот у клітині, що сприяє активації циклу трикарбонових кислот та циклу сечовини [16]. Крім того, як показано у працях [17, 18], уже саме підвищення вмісту вільних амінокислот сприяє підвищенню морозовитривалості окремих сортів пшениці.

Варто зазначити, що біологічні характеристики сортів, приведені в "Каталозі нових сортів" [11], не у всіх випадках дають чітку констатацію ознаки морозовитривалості. Однак, у відношенні сорту Одеська 267 чітко сказано, що його морозостійкість дуже висока. Результати наших досліджень показують, що у цього сорту спостерігаються найвищі показники питомої пептидгідролазної активності (ПА) в листях і коренях паростків — відповідно 3,9 і 4,0 мО/мг (табл. 1). Сорту Сирена одеська властива підвищена морозо- і зимостійкість і теж досить високі показники ПА (3,8 мО/мг — у листях і 3,1 мО/мг — у коренях). Для сортів Фантазія одеська і Застава одеська дані про морозостійкість у каталозі не наводяться, а говориться лише про їхню зимостійкість, що оцінюється вище середньої. Показники ПА у цих сортів виявилися дещо нижчими, ніж у попередніх (табл. 1).

Відмінності показників активності протеолізу і, відповідно, ступеня стійкості рослин до низьких температур, очевидно, мають спадкову основу. Це припущення впливає із того факту, що у створенні сорту Сирена одеська використовували мексиканські сорти пшениці, а у створенні сорту Застава одеська — західноєвропейські.

На підставі проведених досліджень можна зробити такі висновки:

1. Активність протеолітичних ферментів на початкових етапах розвитку озимої м'якої пшениці виявляє сортову специфічність.
2. Активність пептидгідролаз листів і коренів має певне відношення до механізмів адаптації рослин, зокрема до низьких температур.

## Література

1. *Левицкий А. П., Безлюдный В. Н.* Активность протеолитических ферментов в корнях проростков озимой пшеницы // Науч.-техн. бюл. Всесоюз. селекц.-генет. ин-та. — 1987. — Т. 64, № 2. — С. 39—42.
2. *Вовчук С. В.* Регуляторная роль протеолитических ферментов при прорастании зерна злаковых растений // Биологические аспекты изучения и рационального использования животного и растительного мира. Тезисы докладов конференции молодых ученых-биологов. — Рига, 1981. — С. 242—243.
3. *Вовчук С. В., Левицкий А. П., Адамовская В. Г.* Активность протеолитических ферментов и содержание ингибитора трипсина в зерне пшеницы при их созревании // Науч.-техн. бюл. Всесоюз. селекц.-генет. ин-та. — 1982. — Т. 43, № 1. — С. 39—44.
4. *Левицкий А. П., Вовчук С. В., Пыльнева П. Н., Адамовская В. Г.* Роль протеаз и их ингибиторов в накоплении и распаде запасных белков зерна // Производство и использование растительного белка. — Краснодар, 1981. — 360 с.
5. *Адамовская В. Г., Левицкий А. П., Вовчук С. В.* Взаимосвязь между уровнем протеиназ, их ингибиторами и хозяйственно полезными признаками зерна пшеницы // Науч.-техн. бюл. Всесоюз. селекц.-генет. ин-та. — 1980. — Т. 37, № 3. — С. 32—37.
6. *Ильинская Л. И., Васюкова Н. И., Озерецковская О. А.* Биохимические аспекты индуцированной устойчивости и восприимчивости растений // Итоги науки и техники. Сер. Защита растений. — М.: ВИНТИ, 1991. — Вып. 7. — 196 с.
7. *Конарев А. В.* Изменчивость ингибиторов трипсиноподобных протеиназ у пшеницы и родственных ей злаков в связи с устойчивостью к зерновым вредителям // Сельскохозяйственная биология. — 1987. — С. 17—24.
8. *Адамовская В. Г., Клечковская Е. А., Молодченкова О. О., Вовчук С. В.* Изменение протеиназно-ингибиторной системы озимой пшеницы под действием салициловой кислоты и Fusarium // Физиология растений. — 2000. — Т. 47, № 2. — С. 210—215.
9. *Левицкий А. П., Безлюдный В. Н., Клечковская Е. А.* Активность протеолитических ферментов в листьях озимой мягкой пшеницы при заражении Fusarium graminearum Schwabe // Науч.-техн. бюл. Всесоюз. селекц.-генет. ин-та. — 1989. — Т. 71, № 1. — С. 46—49.
10. *Адамовская В. Г., Вовчук С. В., Молодченкова О. О., Левицкий А. П., Бабаянц Л. Т., Гончаренко О. В.* Способ оценки генотипов пшеницы на устойчивость к фузариозу // Бюл. гос. патент. вед.-ва. — 1997. — № 1. — С. 1—8.
11. *Вовчук С. В., Макаренко О. А., Тутова А. В.* Биологическая активность проростков различных сортов пшеницы // Науч.-техн. бюл. селекц.-генет. ин-та. — 1993. — Т. 84, № 2. — С. 46—51.
12. *Каталог нових сортів зернових колосових культур Селекційно-генетичного інституту. Пшениця, ячмінь, тритикале.* — Одеса: СГІ, 2000. — 89 с.
13. *Вовчук С. В.* Определение активности протеолитических ферментов в зерне злаковых культур // Биохимические методы исследования селекционного материала. — Одесса: ВСГИ. — 1979. — С. 59—67.
14. *Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W.* The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. Biophys. — 1961. — V. 95, № 2. — P. 271—278.
15. *Рокицкий П. Ф.* Биологическая статистика. — Минск: Высшая школа, 1964. — 328 с.
16. *Кретович В. Л.* Биохимия растений. — М.: Высшая школа, 1980. — 445 с.
17. *Бабенко В. И., Нигрецька М. Л.* О характере изменений белковых фракций у озимой пшеницы при закаливании и промораживании // Науч.-техн. бюл. Всесоюз. селекц.-генет. ин-та. — 1972. — № 19. — С. 23—27.
18. *Бабенко В. И., Махновская М. Л.* Повышение морозостойкости озимой пшеницы под действием экзогенных аминокислот // Доклады ВАСНИЛ. — 1977. — № 19. — С. 13—14.



**А. М. Андриевский, В. А. Кучеров, В. Н. Тоцкий**

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,  
кафедра генетики и молекулярной биологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**ОРГАНО-ТКАНЕВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ  
ГИДРОКСИДНОЙ ПЕПТИДГИДРОЛАЗЫ У ОТДЕЛЬНЫХ СОРТОВ  
ПШЕНИЦЫ НА НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ**

**Резюме**

Изучали активность гидроксидной пептидгидролазы органов и тканей этиолированных проростков четырех озимых сортов мягкой пшеницы. Обнаружены сортовые различия в проявлении ферментативной активности на ранних фазах развития. Показана связь активности пептидгидролазы с устойчивостью растений к низким температурам, а также изложены предположения о роли этого фермента в формировании механизмов устойчивости организма к действию экстремальных факторов окружающей среды.

**Ключевые слова:** пептидгидролаза, сорта пшеницы, стадии развития.

**A. M. Andrievsky, V. A. Koocherov, V. N. Totsky**

Odessa National I. I. Mechnikov University  
Department of Genetics and Molecular Biology  
Dvoryanskaya Street, 2, Odessa, 65026, Ukraine

**THE ORGAN-TISSUE DISTRIBUTION OF HYDROXIDIC  
PEPTIDHYDROLASE ACTIVITY IN THE SEPARATE VARIETIES OF  
WHEAT AT THE FIRST PERIODS OF DEVELOPMENT**

**Summary**

The activity of hydroxidic peptidhydrolase of organs and tissues of etiolated sprouts of four winter common wheat varieties has been studied. The differences in the display of fermentative activity of different varieties at the early periods of development were observed. The connection of peptidhydrolase activity with the plants stability to low temperatures is shown, and the suppositions of the role of this ferment in the formation of the mechanisms of organism stability to extreme factors of the environment are stated as well.

**Key words:** peptidhydrolase, varieties of wheat, periods of development.