

УДК 547.9:581.19

ГИББЕРЕЛЛОВАЯ И АБСЦИЗОВАЯ КИСЛОТЫ КАК РЕГУЛЯТОРЫ α -АМИЛАЗЫ ЗАРОДЫША СО ЩИТКОМ И АЛЕЙРОНОВОГО СЛОЯ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

Н.С. МАМЫТОВА, А.А. ХАКИМЖАНОВ, О.В. ФУРСОВ

*Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина
Министерства образования и науки Республики Казахстан
050012 Алматы, ул. Досмухамедова, 86
e-mail: mamytovanur@gmail.com*

Исследовано влияние экзогенной гибберелловой ($ГК_3$), абсцизовой (АБК) кислот на синтез и секрецию α -амилазы, ее изоферментов в изолированных алейроновых слоях и зародышевых щитках. $ГК_3$ стимулировала эти процессы в обеих тканях, тогда как АБК оказывала обратное (тормозящее) действие. Синтез и секреция фермента в щитке менее чувствительны к действию АБК по сравнению с клетками алейронового слоя. Не все изоферменты α -амилазы обладали способностью секретироваться, что свидетельствовало об особенностях их посттрансляционной модификации. Выявлен «сдерживающий» эффект низких концентраций $ГК_3$ на супрессию синтеза α -амилазы АБК как в алейроновом слое, так и в щитке.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., алейроновый слой, щиток, гибберелловая кислота, абсцизовая кислота, α -амилаза, синтез, секреция.

Предуборочное прорастание — один из основных факторов, влияющих на производство высококачественного зерна. Мука из проросшего зерна обладает повышенной α -амилазной активностью, что негативно влияет на качество хлеба [13].

В зрелой зерновке пшеницы различают четыре основные формы α -амилазы: ферменты перикарпа, α -амилаза позднего созревания (*РМАА* или *LMA*), α -амилаза прорастания, синтезирующаяся в созревающей зерновке, и собственно α -амилаза, синтезирующаяся во время прорастания [12]. α -Амилаза позднего созревания является результатом генетических дефектов пшеницы, ее появление стимулируется внешними факторами (низкая, высокая температура). Эта форма не связана с внешними признаками прорастания, но ее влияние на качество продуктов из зерна столь же пагубно, как и при избыточной активности остальных форм фермента [14]. Общей для всех форм α -амилазы является регуляция их синтеза гормонами $ГК_3$ и АБК [7].

Установлено, что содержание АБК у чувствительной к прорастанию в колосе пшеницы на 25 % ниже, чем у устойчивых генотипов, при этом зародыши устойчивых и неустойчивых генотипов обладают различной восприимчивостью к действию гормона [20]. Эффектором действия АБК является *R* ген пшеницы, контролирующий окраску зерновки. Мутанты по гену синтеза каротиноидов — предшественников АБК теряли

устойчивость, присущую исходному сорту [5]. Мы выявили четкую зависимость устойчивости сортов пшеницы к прорастанию в колосе и способности к синтезу различных форм α -амилазы от количества АБК в зерновке [3]. Помимо прямого действия АБК на синтез α -амилазы существует механизм индукции синтеза белкового ингибитора этого фермента под действием гормона [17].

Антагонист АБК — гибберелловая кислота, синтезирующаяся при прорастании зерна в зародыше, запускает синтез и секрецию α -амилазы в клетках алейронового слоя. Ингибирование биосинтеза ГК₃ в прорастающем семени полностью не подавляло синтез α -амилазы, что указывает на наличие запасных форм предшественников гормона [6]. В целом ГК₃-индуцируемый синтез α -амилазы — это сложный механизм, в котором принимают участие многие компоненты, такие как Ca^{2+} , гетеротример G-протеин, фосфоинозитид Ca^{2+} и др. [9—11].

Известна также важная роль ионов Ca^{2+} в секреции α -амилазы алейроновыми клетками [9]. Установлено, что в алейроновом слое ячменя синтезируется особый белок — ВiР с мол. м. 70 кД [8]. Функция этого белка заключается в связывании ионов Ca^{2+} и вовлечении их в процессы секреции. Очевидно гормон АБК, супрессируя синтез этого белка, подавляет секрецию накапливаемой в клетках α -амилазы.

Участие ГК₃ в экспрессии всех форм α -амилазы подтверждено результатами исследований синтеза α -амилазы позднего созревания, активность которой не проявляется визуально в видимых признаках прорастания, но отражается на значении числа падения и качестве хлеба [14]. Индукция этой формы значительно уменьшалась в зерне генотипов пшеницы, имеющих гены короткостебельности, связанные с чувствительностью к ГК₃ [15]. Сделан вывод о необходимости ГК₃ для синтеза α -амилазы позднего созревания в алейроне, что дает основание сравнивать этот процесс с экспрессией других форм фермента в щитке и алейроновом слое при прорастании [16].

Цель нашей работы состояла в изучении особенностей синтеза и секреции α -амилазы в щитке и алейроновом слое зерна пшеницы под действием экзогенных фитогормонов.

Методика

Объектами исследования служили изолированные зародыши со щитками и алейроновые слои зерновок мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казахстанская 10.

Зародыши с неповрежденными щитками вычленили в асептических условиях из наклюнувшихся в течение 24 ч семян и помещали для инкубации в лунки со средами 24-гнездных плашек. Алейроновые слои, свободные от крахмала, выделяли в асептических условиях из предварительно намоченных в течение суток зерновок с удаленными зародышами и инкубировали в лунках 6-гнездных плашек на средах небольшого объема.

При изучении влияния продолжительности инкубации на синтез и секрецию α -амилазы изолированные зародыши со щитками и алейроновые слои инкубировали в 5 мМ растворе CaCl_2 , содержащем 1 мкМ ГК₃ («Sigma», США) в течение 48 ч. Для изучения влияния гормонов на активность α -амилазы ткани инкубировали 36 ч в 5 мМ растворе CaCl_2 с

добавлением ГК₃ или АБК («Sigma», США) в следующих концентрациях: 0,1; 1; 10 мкМ. Контролем служил вариант без добавления гормонов.

α -Амилазу экстрагировали из ткани 0,05 М ацетатным буфером (рН 5,2) с 10 мМ СаСl₂ в соотношении ткань : буфер = 1 : 3. Гомогенат настаивали 30 мин и центрифугировали при 8000 g в течение 10 мин. Аналогично центрифугировали инкубационные среды. Все процедуры проводили при +4 °С. Для удаления α -амилазы надосадочную жидкость прогревали 10 мин при 70 °С, резко охлаждали и центрифугировали 10 мин при 8000 g.

Амилазную активность определяли крахмал-йодным методом с использованием 0,02 %-го крахмала в качестве субстрата и выражали в единицах активности на 1 мл за 1 ч [1]. Нативный электрофорез α -амилазы проводили в столбиках 7,5 % ПААГ по методу, описанному в работе [1]. После электрофореза гели инкубировали в 1,5 %-м растворе крахмала при +4 °С в течение 1 ч, промывали холодной водой и окрашивали 2 %-м раствором I₂ в 5 %-м KI.

Ферментную активность измеряли в трех биологических и трех аналитических повторностях. Результаты обработаны статистически с вычислением стандартной погрешности среднего [2].

Результаты и обсуждение

В прорастающих семенах синтез α -амилазы сосредоточен в алейроновом слое и эпителии зародышевого щитка. Для изучения изменчивости синтеза и секреции α -амилазы во времени алейроновые слои инкубировали 48 ч при 24 °С в 5 мМ растворе СаСl₂ с добавлением 1 мкМ ГК₃. Через каждые 12 ч анализировали активность и изоферментный состав α -амилазы экстрактов тканей (внутриклеточно синтезирующийся фермент) и инкубационной среды (внеклеточно секретирующийся фермент).

Как видно из рис. 1, а, б, в ходе инкубации активность как внутриклеточной, так и внеклеточной α -амилазы возрастала, ее максимум наблюдался через 36 ч. Наиболее существенный прирост активности приходился на период с 24 до 36 ч (см. рис. 1, а). Согласно данным электрофореза, повышение активности связано с экспрессией обеих групп АМУ 1 и АМУ 2 (см. рис. 1, б, I). Из представленных спектров видно, что не все изоферменты способны секретироваться в среду (см. рис. 1, б, II).

Аналогичным образом изучены новообразование и секреция фермента в зародышах со щитками. Максимумы синтеза и секреции фермента наблюдались на 48 ч инкубации, причем синтезировались и секретировались в основном изоферменты группы АМУ 2 (см. рис. 1, в, з).

Проведено сравнительное изучение действия различных концентраций ГК₃ и АБК на синтез и секрецию α -амилазы в изолированных зародышах и алейроновом слое. Активность в экстрактах тканей и средах определяли после 36 ч инкубации (оптимальное время для максимального синтеза фермента).

Установлено, что концентрации ГК₃ 0,1 и 1 мкМ стимулируют синтез и секрецию фермента в клетках алейронового слоя (рис. 2, а, 2, 3). Напротив, наличие даже низких концентраций АБК приводило к подавлению синтеза и секреции α -амилазы (см. рис. 2, а, 5, б), что подтверждено результатами электрофореза α -амилазы (см. рис. 2, б), причем АБК подавляла как синтез, так и секрецию всех изоформ

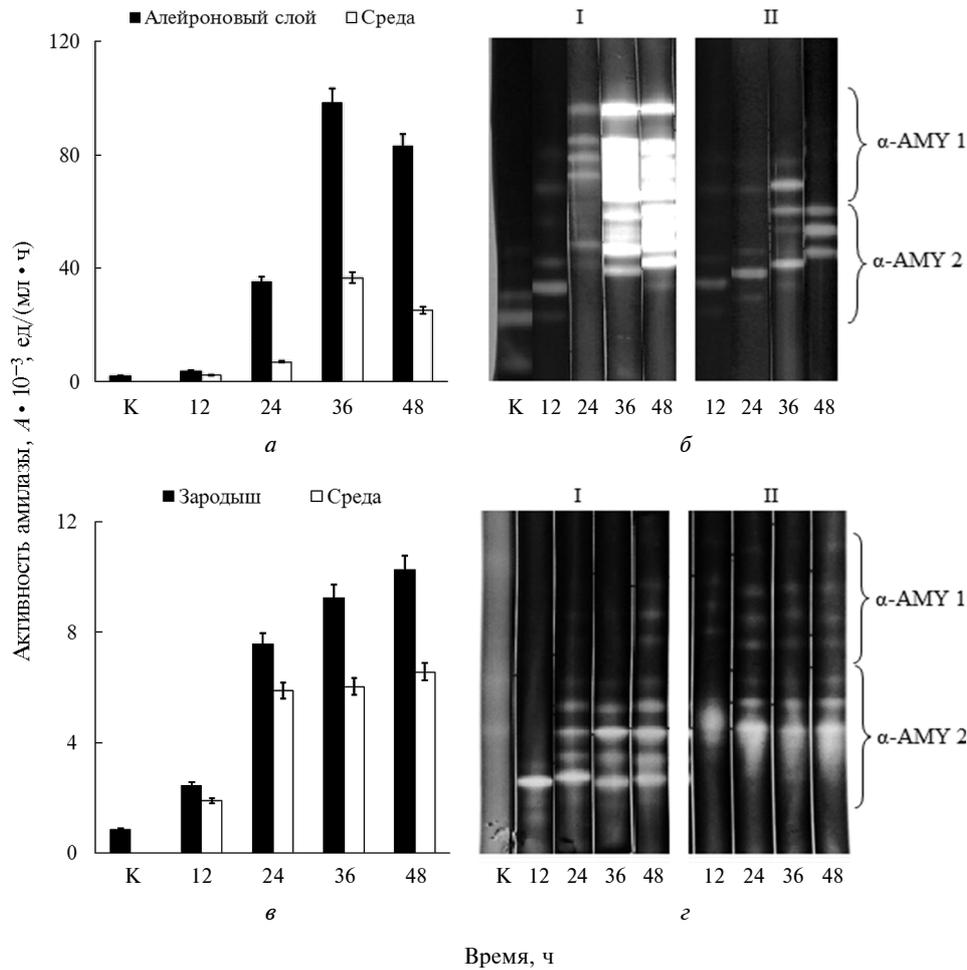


Рис. 1. Влияние времени инкубации на активность (а, в) и секрецию α -амилазы (б, г) в алейроновом слое (а, б) и в зародыше с неповрежденным щитком (в, г) зерновки пшеницы, инкубированных в растворе 5 мМ CaCl_2 с добавлением 1 мкМ ГК_3 . Здесь и на рис. 2, 3:

I — электрофоретический спектр изоферментов α -амилазы экстракта; II — электрофоретический спектр изоферментов секретируемой α -амилазы

α -амилазы (см. рис. 2, б, I, II). ГК_3 стимулировала новообразование групп изоферментов АМУ 1 и АМУ 2 (см. рис. 2, б, I, 2—4), секретируются же наиболее активные компоненты обеих групп (см. рис. 2, б, II, 2—4). При этом в составе секретируемой α -амилазы практически отсутствовали катодные компоненты АМУ 2, что очевидно объясняется особенностями посттрансляционной модификации секретируемого фермента.

Аналогичные опыты проведены на изолированных зародышах со щитками. Из рис. 2, в, г видно, что максимальные синтез и секреция α -амилазы происходят при наличии 1 мкМ ГК_3 . Другие ее концентрации — 0,1 и 10 мкМ — обладали меньшей стимулирующей активностью. Уровень активности внеклеточной α -амилазы при концентрации гормона 0,1 и 1,0 мкМ был ниже активности внутриклеточного фермента (см. рис. 2, в). ГК_3 при концентрации 10 мкМ снижала интенсивность синтеза α -амилазы по сравнению с 1 мкМ гормона, что отразилось и на количестве секретирующегося фермента (см. рис. 2, в, 4).

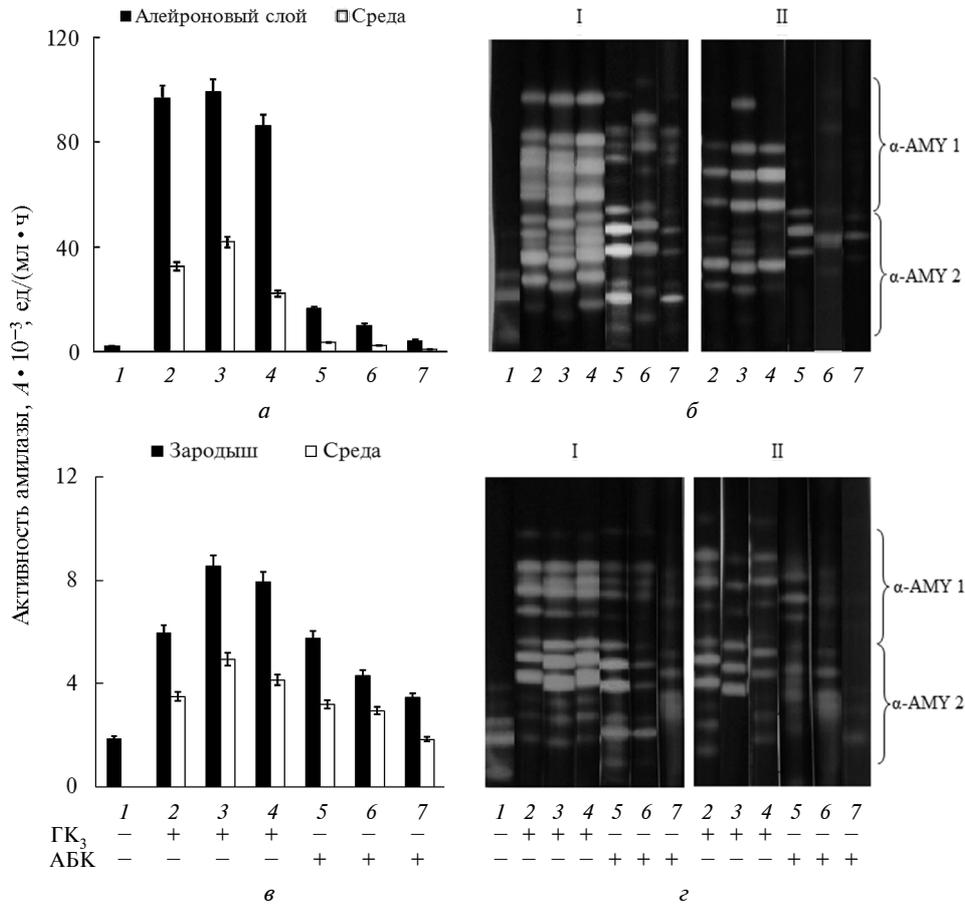


Рис. 2. Влияние ГК₃ и АБК на активность (а, в) и изоферментный состав α -амилазы (б, г) в алейроновом слое (а, б) и в зародыше с неповрежденным щитком (в, г) зерновки пшеницы:

1 — контроль; 2–4 — соответственно 0,1; 1 и 10 мкМ ГК₃; 5–7 — соответственно 0,1; 1 и 10 мкМ АБК

Несколько необычные результаты получены при изучении влияния АБК на синтез и секрецию α -амилазы зародыша. При низкой концентрации (0,1 мкМ) гормон оказывал некоторое стимулирующее действие на синтез фермента, сопоставимое по своему уровню с 0,1 мкМ ГК₃ (см. рис. 2, в, 2, 5; рис. 2, г, 2, 5). Скорее всего это связано не с прямым действием экзогенной АБК, а с влиянием эндогенной ГК₃ зародыша на синтез α -амилазы. Повышение концентрации АБК приводило к заметной супрессии синтеза и секреции α -амилазы зародыша (см. рис. 2, в, г). В отличие от алейронового слоя, в котором АБК почти полностью подавляла синтез и секрецию фермента, в щитке ее действие было не столь значительно, что также связано с содержанием антагониста — эндогенной ГК₃.

Далее мы изучили одновременное действие двух гормонов на α -амилазу алейронового слоя и зародыша (рис. 3). Изолированные ткани инкубировали в течение 36 ч при постоянной и оптимальной концентрации индуцирующего гормона ГК₃ (1 мкМ) и возрастающем количестве его антагониста — АБК (1; 5; 10; 20 мкМ). Из рис. 3, а видно, что при наличии 1 мкМ ГК₃ в среде инкубации алейронового слоя в значительной степени снималось ингибирующее действие АБК на синтез α -ами-

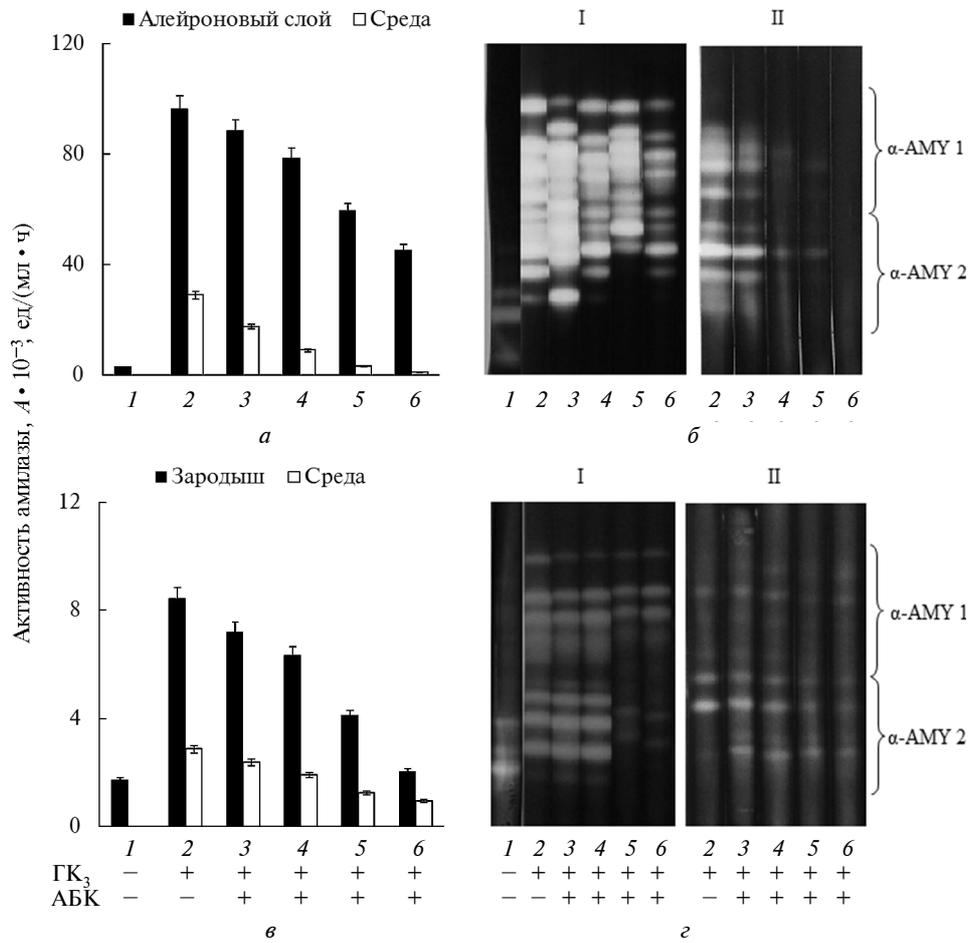


Рис. 3. Влияние одновременного действия ГК₃ и АБК на активность (а, в) и изоферментный состав α-амилазы (б, г) в алейроновом слое (а, б) и в зародыше с неповрежденным щитком (в, г) зерновки пшеницы после 36 ч инкубации:

1 – контроль; 2 – 1 мкМ ГК₃; 3–6 – 1 мкМ ГК₃ и соответственно 1; 5; 10; 20 мкМ АБК

лазы в клетках, это также подтверждено результатами электрофоретического исследования (см. рис. 3, б). Следует отметить, что секреция фермента в среду инкубации, несмотря на активный синтез, была невысокой (см. рис. 3, а, б). Таким образом, АБК при наличии ГК₃ в большей степени подавляла секреторную активность клеток алейронового слоя по сравнению с индукцией синтеза фермента.

На фоне существенно меньшей общей α-амилазной активности зародышевого щитка (см. рис. 3, в, г) следует также отметить стимулирующее влияние ГК₃ при повышении концентрации АБК. При 20 мкМ АБК клетки щитка обладали незначительной секреторной активностью (см. рис. 3, в, г). Вероятно, это связано с отмеченным выше наличием эндогенного гормона ГК₃ в тканях зародыша.

Подводя итоги, можно сделать вывод, что клетки алейронового слоя, являясь основными продуцентами α-амилазы, демонстрируют максимальные синтез и секрецию фермента после 36 ч инкубации при наличии ГК₃. При этом секретироваться способны не все изоформы групп AMY 1 и AMY 2. Зародышевый щиток обладал более высокой се-

креторной активностью по сравнению с алейроновым слоем, в среде инкубации также обнаруживались не все изоферменты α -амилазы. Известно, что на самых ранних этапах прорастания зерна синтез α -амилазы в щитке стимулируется собственной ГК₃ зародыша [4]. Очевидно, этот гормон индуцирует секрецию фермента. Мы показали, что уже 0,1 мкМ ГК₃ индуцировала активный синтез и секрецию α -амилазы в алейроновом слое и щитке, причем максимальная секреция наблюдалась при концентрации гормона 1 мкМ.

АБК при концентрации 0,1 мкМ заметно подавляла как синтез, так и секрецию α -амилазы в алейроновом слое. Во всех случаях секретировались наиболее активные изоферменты обеих групп, среди которых отсутствовали промежуточные компоненты АМУ 2. Эти факты указывают на особенности постсинтетической модификации фермента, выявленные ранее в алейроновом слое ячменя [18, 19].

Секреция фермента клетками алейронового слоя подавлялась АБК в значительно большей степени, чем в клетках щитка, что подтверждает стимулирующее действие эндогенного гиббереллина зародыша. В результате изучения одновременного действия ГК₃ и АБК на синтез и секрецию α -амилазы обнаружен стимулирующий эффект низких концентраций ГК₃ при супрессии синтеза α -амилазы высокими концентрациями АБК как в алейроновом слое, так и в щитке.

1. Гильманов М.К., Фурсов О.В., Францев А.П. Методы очистки и изучения ферментов растений. — Алма-Ата: Наука, 1981. — 91 с.
2. Крюков В.И. Статистические методы изучения изменчивости. — Орел: Орел-ГАУ, 2006. — 208 с.
3. Шалахметова Г.А., Бргынбаева Ш.М., Мамытова Н.С. и др. Фитогормональная регуляция процессов покоя и прорастания в семенах пшеницы // Вестн. КазНУ. Сер. биологич. — 2006. — № 3. — С. 83—87.
4. Appleford N.E.J., Lenton J.R. Hormonal regulation of α -amylase gene expression in germinating wheat (*Triticum aestivum*) grains // *Physiol. Plant.* — 1997. — **100**. — P. 534—542.
5. Fang J., Chu C. Abscisic acid and pre-harvest sprouting in cereals // *Plant Signal. Behav.* — 2008. — **3**, N 12. — P. 1046—1048.
6. Grosselindemann E., Graebe J.E., Stockl D., Hedden P. Ent-kaurene biosynthesis in germinating barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya) caryopses and its relation to α -amylase production // *Plant Physiol.* — 1991. — **96**. — P. 1099—1104.
7. Ho T.-H.D., Gomez-Cadenas A., Zentella R., Casaretto J. Crosstalk between gibberellin and abscisic acid in cereal aleurone // *J. Plant Growth Regul.* — 2003. — **22**. — P. 185—194.
8. Jones R.L., Bush D.S. Gibberellic acid regulates the level of a BiP cognate in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells // *Plant Physiol.* — 1991. — **97**. — P. 456—459.
9. Jones R., Girloy S., Hillmer S. The role of calcium in the hormonal regulation of enzyme synthesis and secretion in barley aleurone // *J. Exp. Bot.* — 1993. — **44**. — P. 207—212.
10. Kashem M., Ztoh K., Zwabuchi S. et al. Possible involvement of phosphoinositide-Ca²⁺ signaling in the regulation of α -amylase expression and germination of rice seed (*Oryza sativa* L.) // *Plant Cell Physiol.* — 2000. — **41**, N 4. — P. 399—407.
11. Lovegrove A., Hooley R. Gibberellin and abscisic acid signaling in aleurone // *Trends Plant Sci.* — 2000. — **5**. — P. 102—110.
12. Lunn I.D., Major B.J., Kettlewell P.S., Scott R.K. Mechanisms leading to excess alpha-amylase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain in the U.K. // *J. Cereal Sci.* — 2001. — **33**. — P. 313—319.
13. Mares D.J., Mrva K., Fincher I.B. Enzyme activities // C. Wrigley, H. Corke, C.E. Walker (eds.). *Encyclopedia of Grain Science.* — Oxford: Elsevier Acad. Press, 2004. — P. 357—365.
14. Mares D.J., Mrva K. Late-maturity α -amylase: Low falling number in wheat in the absence of pre-harvest sprouting // *J. Cereal Sci.* — 2008. — **47**. — P. 6—17.
15. Mrva K., Mares D.J. Expression of late maturity α -amylase in wheat containing gibberellic acid in sensitivity genes // *Euphytica.* — 1996. — **88**. — P. 69—76.
16. Mrva K., Mares D.J. Regulation of high pI α -amylase synthesis in wheat aleurone by a gene (S) located on chromosome 6B // *Ibid.* — 1999. — **109**. — P. 17—23.

17. Robertson M., Walker-Simmons M., Munro D., Hill R.D. Induction of α -amylase inhibitor synthesis in barley embryos and young seedlings by abscisic acid and dehydration stress // *Plant Physiol.* — 1989. — **91**. — P. 415–420.
18. Sticher L., Jones R.L. α -Amylase isoforms are post-translationally modified in the endomembrane system of the barley aleurone layer // *Ibid.* — 1992. — **98**. — P. 1080–1086.
19. Sticher L., Jones R.L. Isolation and partial characterization of a factor from barley aleurone that modifies α -amylase in vitro // *Ibid.* — 1991. — **97**. — P. 936–942.
20. Walker-Simmons M. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars // *Ibid.* — 1987. — **84**. — P. 61–66.

Получено 05.08.2013

ГИБЕРЕЛОВА ТА АБСЦИЗОВА КИСЛОТИ ЯК РЕГУЛЯТОРИ α -АМИЛАЗИ ЗАРОДКА ЗІ ЩИТКОМ І АЛЕЙРОНОВОГО ШАРУ ЗЕРНА ПШЕНИЦІ

Н.С. Мамитова, А.А. Хакімжанов, О.В. Фурсов

Інститут молекулярної біології і біохімії ім. М.А. Айтхожина Міністерства освіти і науки Республіки Казахстан, Алмати

Досліджено вплив екзогенної гібереллової ($ГК_3$) й абсцизової (АБК) кислот на синтез і секретію α -амілази, її ізоферментів в ізольованих алейронових шарах і зародкових щитках. $ГК_3$ стимулювала ці процеси в обох тканинах, тоді як АБК виявляла зворотну (гальмівну) дію. Синтез і секретія ферменту в щитку менш чутливі до дії АБК порівняно з клітинами алейронового шару. Не всі ізоферменти α -амілази були здатними секретуватись, що свідчило про особливості їх посттрансляційної модифікації. Виявлено «стримувальний» ефект низьких концентрацій $ГК_3$ на супресію синтезу α -амілази АБК як у алейроновому шарі, так і в щитку.

GIBBERELIC AND ABSCISIC ACIDS AS α -AMYLASE REGULATORS IN SCUTELLUM AND ALEURONE LAYER FROM WHEAT GRAIN

N.S. Mamytova, A.A. Khakimzhanov, O.V. Fursov

M.A. Aitkhozhin Institute of Molecular Biology and Biochemistry, Ministry of Education and Science of Republic of Kazakhstan
86 Dosmuhamedov St., Almaty, 050012, Kazakhstan

The influence of exogenous gibberellic acid (GA) and abscisic acid (ABA) on the synthesis and secretion of α -amylase and its isoenzymes in isolated aleurone layer and scutellum was investigated. GA stimulated these processes in both tissues, whereas the ABA has provided opposite (inhibitory) effect. Synthesis and secretion of the enzyme in the scutellum is less susceptible to the action of ABA compared with aleurone cells. Not all α -amylase isozymes were able to be secreted, indicating the specifics of their posttranslational modification. The stimulation effect of the low GA concentrations under suppression of α -amylase synthesis by ABA in the scutellum was shown.

Key words: *Triticum aestivum* L., aleurone, scutellum, gibberellic acid, abscisic acid, α -amylase, synthesis, secretion.