

На правах рукописи



Хабибуллин Салават Ильнурович

**АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ЭКЗОГЕННЫХ ПРОТЕИНАЗ В
КЛУБНЯХ И ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ В СВЯЗИ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ
К КОЛОРАДСКОМУ ЖУКУ**

03.00.12 – физиология и биохимия растений

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

УФА - 2003

Работа выполнена в Башкирском государственном университете.

Научные руководители: доктор биологических наук,
профессор Ибрагимов Ринат Исмагилович;
доктор биологических наук,
профессор Ахметов Радик Рахимьянович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Кудоярова Гузель Радомесовна;
кандидат биологических наук, доцент
Исаев Рустем Фидаевич

Ведущее учреждение: Всероссийский научно-исследовательский институт
растениеводства им. Н.И.Вавилова РАСХН
(г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится "25" сентября 2003 г. в "14" часов
на заседании диссертационного Совета К 212.013.04 при Башкирском
государственном университете (450074, г. Уфа, ул. Фрунзе, 32)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Башкирского
государственного университета

Автореферат разослан "23" августа 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
доктор биологических наук, профессор



Кузяхметов Г.Г.

2003-A
13259

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Белки-ингибиторы протеолитических ферментов обнаружены в тканях животных, растений и в микроорганизмах (Мосолов, 1971; 1983; Ryan, 1973; 1981; Laskowski, Kato, 1980; Richardson, 1977; Валуева, Мосолов, 1999, 2002). Содержание ингибиторов в семенах культурных растений достигает до 5-10 % растворимых белков (Micola, Kirsí, 1972). Общим свойством этих молекул является способность образовывать с протеолитическими ферментами устойчивые комплексы, что приводит к обратимому подавлению их активности.

Широкое распространение ингибиторов и их содержание в значительных количествах в тканях растений позволяют предположить, что они являются одним из важнейших компонентов регуляции различных физиологических процессов.

Способность растительных белков подавлять активность протеиназ млекопитающих, насекомых и микроорганизмов легли в основу представлений об их защитных функциях. Так, в семенах сельскохозяйственных культур были обнаружены специфические ингибиторы протеолитических ферментов пищеварительного тракта насекомых. Оказалось, что эти ингибиторы были неактивны по отношению ни к трипсину и ни к химотрипсину (Конарев, Вилкова, 1984; Конарев, 1984, 1987, 1991, 2000). В растительных тканях обнаружены ингибиторы, подавляющие активность протеиназ патогенных микроорганизмов (Кладницкая и др., 1994; Конарев, 2000, Валуева, Мосолов, 2002).

Большое количество ингибиторов содержится в тканях картофеля. Особенно высоким содержанием белков-ингибиторов характеризуются клубни картофеля, где на их долю приходится до 15-20% всех водорастворимых белков (Ryan С.А. et al., 1976). Среди белков-ингибиторов, присутствующих в клубнях картофеля, обнаружены ингибиторы протеолитических ферментов различных классов - сериновых, цистеиновых и аспартильных протеиназ, а также металлосодержащих карбоксипептидаз (Garsia-Olmedo F. et al., 1987).

Колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* является особо опасным вредителем картофеля. Установлено, что личинки колорадского жука за 2 недели могут уничтожить до 45 % листовой поверхности растений (Теняев, 2000). Изучение физиолого-биохимических и молекулярных механизмов взаимодействия этих насекомых с растениями является актуальной задачей. В этом плане весьма перспективным представляется исследование функционирования системы «протеиназы насекомых - белковые ингибиторы растений».



Цель и задачи исследований. Цель работы заключалась в оценке значения ингибиторов экзогенных протеиназ в формировании устойчивости картофеля к колорадскому жуку. Нами были поставлены следующие задачи:

- разработка новых методов определения активности протеиназ и их ингибиторов;
- изучение активности протеиназ личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata*;
- изучение активности ингибиторов протеиназ у сортов картофеля с различной устойчивостью к колорадскому жуку;
- изучение влияния защитных препаратов и биостимуляторов на активность ингибиторов протеиназ в растениях картофеля.

Научная новизна. Разработаны новые методы определения активности протеолитических ферментов и их ингибиторов. Показано, что уровень активности ингибиторов экзогенных протеиназ (ферментов личинок насекомых) в тканях картофеля зависит от степени устойчивости сорта к колорадскому жуку.

Практическая значимость. Разработанные методы и полученные данные могут быть использованы в селекции картофеля на устойчивость к неблагоприятным факторам среды, в том числе и к насекомым-вредителям.

Апробация результатов. Результаты исследований были представлены на VII Международной научно-практической конференции “Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье” (Симферополь, 1998), на V Молодежной научной конференции (Сыктывкар, 1998), на VI Молодежной научной конференции (Сыктывкар, 1999), на конференции “Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии” (Челябинск, 1999), на IV Съезде физиологов растений России (Москва, 1999), на конференции «Химия и технология применения регуляторов роста растений» (Уфа, 2001), на конференции «Актуальные проблемы современной генетики» (Москва, 2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, в т.ч. 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературных данных, описания объектов и методов исследований, изложения и обсуждения результатов исследований, выводов. Список цитируемой литературы содержит 149 ссылок (66 отечественных и 83 зарубежных источников). Работа изложена на 110 страницах и содержит 11 таблиц и 20 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для исследований использовались сорта и линии картофеля. Клубни получали из селекционно-семеноводческих и научных учреждений: Башкирского НИИ сельского хозяйства РАСХН и учебно-опытного хозяйства Башгосагроуниверситета.

В полевых условиях растения выращивали по принятой для зоны агротехнике, в лабораторных условиях - на светоплощадке при комнатной температуре.

Белки из растений экстрагировали 0,05 М трис-НСI-буфером, рН-8,2, дистиллированной водой. Объем экстрагента для каждого объекта подбирали экспериментально.

Активность протеолитических ферментов определяли по гидролизу N, α -бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида (БАПА) (Erlanger, Kokowski, Cohen, 1961) и гидролизу желатинового слоя фотопластинок (см. глава 1). Активность ингибиторов протеиназ определяли по торможению скорости гидролиза субстрата БАПА (Гофман, Вайсблей, 1976) и желатина соответствующими протеиназами.

Для определения концентрации белка в растворах использовали метод М. Бредфорд (Bradford, 1976). Калибровочную кривую составляли по α -химотрипсину.

Для исследования активности ингибиторов протеиназ насекомых-вредителей использовали экстракты личинок колорадского жука *Leptinotarsa decemlineata* и вредителя бобовых – фасолевой зерновки *Acanthoscelides obtectus*.

Личинки колорадского жука собирали на разных стадиях их развития, в нескольких районах Республики Башкортостан. Фасолевую зерновку выращивали на семенах фасоли в лабораторных условиях. Протеиназы из насекомых экстрагировали 0,05 М трис-НСI-буфером, рН-8,2, очищали и хранили при температуре – 24 °С.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Exel пакета Microsoft Office.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Методы определения активности протеолитических ферментов и их ингибиторов по гидролизу желатинового слоя фотопластины (разработка методов)

1.1. Метод определения активности протеолитических ферментов

Денатурированная форма коллагена (желатин) представляет хороший субстрат для протеолитических ферментов и может использоваться для определения их активности. В литературе описаны методы, использующие желатиновый слой фотоматериалов для качественного обнаружения протеиназ, а также для выявления локализации ферментов и их ингибиторов после электрофоретического разделения (Ambrose, Patrick, Vincent, 1991; Конарев, Фомичева, 1991).

Нами разработан метод, позволяющий количественно оценить активность протеолитических ферментов по гидролизу желатинового слоя фотоматериалов.

Принцип метода заключается в том, что пробу ферментного раствора вносили в лунку, вырезанную в слое агарозного геля, которым покрывали фотопластинку. Объем одной лунки составляет 50 мкл. Для предотвращения высыхания раствора в лунке нагель накладывали целлулоидную пленку. Готовую пластину помещали во влажную камеру и инкубировали при 37°C в течение 3-6 час. Молекулы фермента из раствора диффундируют в гель и гидролизуют желатину вокруг лунки. Скорость диффузии молекул в геле пропорциональна исходной концентрации фермента в растворе. После окончания инкубации агарозный гель снимали и пластину промывали водой. Гидролизованные участки желатинового покрытия хорошо смываются и проявляются на темном фоне в виде светлых участков округлой формы.

Определение ферментативной активности проводили путем измерения интенсивности светового потока, проходящего через гидролизованный участок желатина. Для этой цели был разработан и сконструирован прибор, позволяющий измерять интенсивность света, проходящего через пластину. Это устройство состоит из источника света, фотоприемника и измерительного прибора. Для проведения замеров фотопластинка помещалась между источником света и фотоприемником устройства. Активность фермента определяли по интенсивности светового потока, проходящего через гидролизованные участки желатинового слоя фотопластинки.

За единицу активности фермента принимали такую активность, которая в стандартных условиях гидролизует площадь слоя желатина, размером, повышающим интенсивность светового потока на 1% по сравнению с негидролизованным участком фотопластины.

На рисунке 1 показан гидролиз желатинового слоя фотопластинки трипсином.

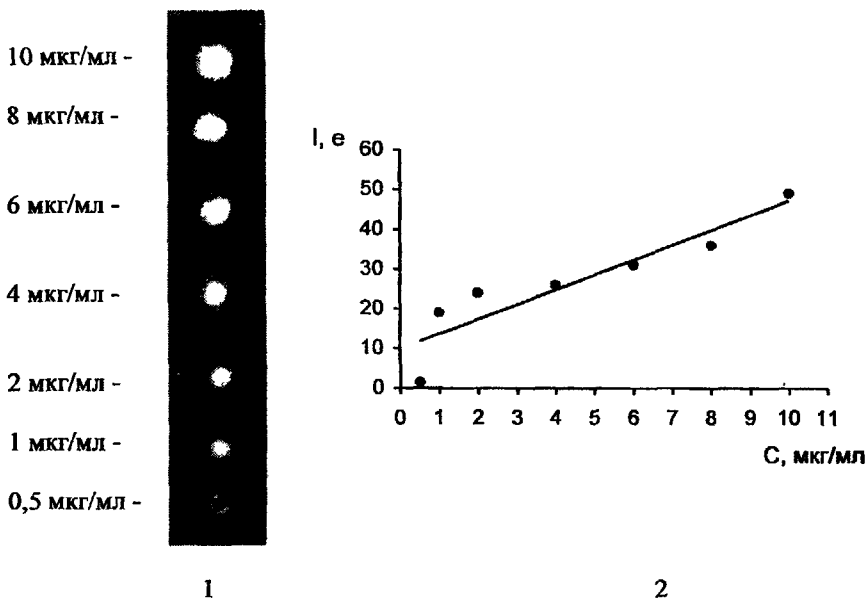


Рис.1. Зависимость активности фермента трипсина от его концентрации.

1 - фотопластина с гидролизованными участками желатина;

2 - график зависимости интенсивности светового потока от концентрации трипсина.

По оси абсцисс – С - концентрация фермента (мкг/мл);

по оси ординат – I – интенсивность светового потока, проходящего через гидролизованный участок желатинового слоя (е)

Как видно, величина участка гидролизованного желатина, соответственно, и интенсивность светового потока, зависит от концентрации фермента в растворе. Активность фермента повышается пропорционально с увеличением концентрации в инкубационной среде. Соответственно, при этих условиях активность фермента можно

определять по интенсивности света, проходящего через участок гидролизованного желатина.

Нами были проанализированы экстракты тканей из различных объектов с целью выявления желатингидролизующей активности. На рисунке 2 и в таблице 1 представлены результаты эксперимента по определению активности желатингидролизующих протеиназ из семян пшеницы, гречихи и культурального фильтрата патогенных грибов *Fusarium sp.*

Таблица 1

Активность желатингидролизующих ферментов из различных источников

Экстракт	Интенсивность светового потока, е					Активность протеиназ, е-мкл/мин
	1	2	3	4	ΔX	
Семена пшеницы, зараженной пыльной головней (сорт Жница)	20	22	20	19	20,25	0,307
Семена гречихи (сорт Казанская)	0	0	0	0	0	0
Культуральный фильтрат <i>Fusarium sp.</i>	14	19	17	15	16,25	0,246

Как видно, протеолитическая активность определяется в экстрактах из семян пшеницы и в культуральном фильтрате грибов. Оказалось, что в данных условиях опыта покоящиеся семена гречихи не обладали желатингидролизующей активностью.

Предложенный метод характеризуется высокой воспроизводимостью. Ошибка метода в серии повторов не превышает 5 %. Полученные результаты показывают, что его можно использовать для определения активности желатингидролизующих ферментов из различных источников. Более того, этот метод можно применять и для измерения активности ингибиторов протеолитических ферментов.

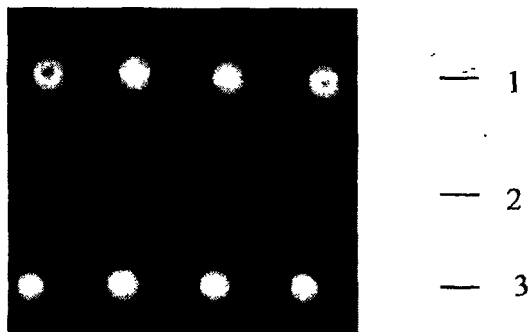


Рис.2 Фотография фотопластины после гидролиза желатинового слоя растительными и грибными протеиназами
 1 – семена пшеницы, зараженные пыльной головней;
 2 – семена гречихи;
 3 – культуральная жидкость *Fusarium* sp.

1.2. Метод определения активности ингибиторов протеиназ

Как отмечалось выше, разработанный метод можно использовать и для определения активности белков-ингибиторов, подавляющих желатингидролизующую способность протеиназ.

Измерение активности ингибиторов желатингидролизующих протеиназ проводили аналогично описанной выше процедуре определения протеолитической активности

Активность ингибиторов рассчитывали по разности активности фермента в лунке без ингибитора и в лунке с ингибитором. Ингибиторную активность выражали в ингибиторных единицах (ИЕ) и миллиингибиторных единицах (мИЕ): за 1 ИЕ принимали такую активность ингибитора, которая при стандартных условиях полностью подавляет 1 Е активности фермента.

Как видно из рисунка 3, этот метод позволяет определять активность ингибиторов протеиназ из различных источников.

Таким образом, предложенные методы позволяют обнаружить и измерить активность желатингидролизующих протеиназ и их ингибиторов из различных источников. Процедура проведения экспериментов проста и доступна, поскольку не требует сложного оборудования и приборов. Методы характеризуются высокой чувствительностью. Нижний предел

определения активности коммерческих препаратов протеиназ (трипсин, проназа Е, химотрипсин) составил 0,5-1 мкг/мл.

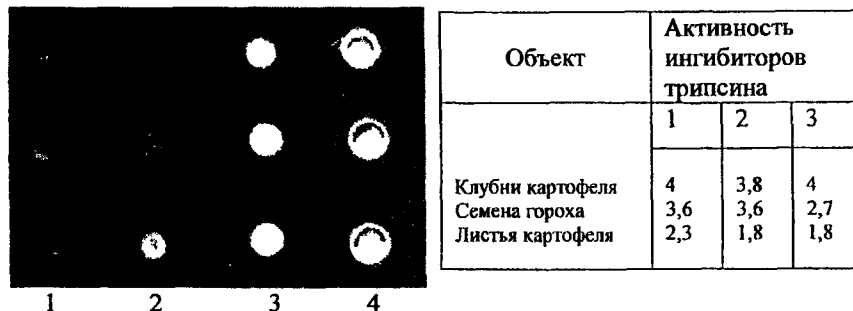


Рис. 3. Активность ингибиторов трипсина из клубней и листьев картофеля, семян гороха

- 1 – клубни картофеля (сорт Романо)
- 2 – семена гороха (сорт Чишминский)
- 3 – листья картофеля (сорт Романо)
- 4 – бычий трипсин (10 мкг/мл)

По сравнению с широко используемыми методами определения (Eglanger, Kokowski, Cohen, 1961; Гофман, Вайсблай, 1976) в описанных процедурах используются микрообъемы инкубационных растворов (5-50 мкл), что снижает расход реактивов в несколько десятков раз. Описанные методы позволяют варьировать составом инкубационной среды и измерять активность всех протеиназ, гидролизующих желатин, а также определять активность их ингибиторов.

2. Активность ингибиторов протеиназ в тканях картофеля

2.1. Активность ингибиторов трипсина в покоящихся и прорастающих клубнях картофеля

Растения семейства пасленовых характеризуются высокой активностью ингибиторов протеиназ (Ryan et al., 1976; Мосолов, Валуева, 1993). Ранее было показано, что в покоящихся клубнях картофеля различных сортов активность ингибиторов трипсина колеблется от 6,1 до 16,6 ИЕ/г массы ткани (Ибрагимов и др., 1999). Известно также, что при прорастании клубней активность ингибиторов в них снижается, а в проростках - возрастает (Ryan et al., 1976). Представляет интерес

исследование уровня активности ингибиторов протеиназ в клубнях и проростках картофеля у сортов, различающихся по устойчивости к болезням и действию насекомых-вредителей.

В таблице 2 представлены данные об активности ингибиторов трипсина (с использованием субстрата БАПА и желатина) в прорастающих клубнях картофеля. Видно, что исследованные сорта характеризуются неодинаковым уровнем ингибиторной активности в клубнях. Наибольшая активность ингибиторов трипсина выявлена у сорта Белореченский (в расчете на сырую массу клубней). Значительно меньшей активностью ингибиторов трипсина обладают клубни сортов Невский, Гатчинский, Ева. Однако, вследствие низкого содержания растворимого белка в клубнях сорта Ева, удельная активность ингибиторов в клубнях этого сорта обнаруживается на высоком уровне. В клубнях сорта Ева удельная активность ингибиторов самая высокая из исследованных сортов. Так, по субстрату БАПА значение удельной активности у этого сорта составляет 20,5 мИЕ, по желатину – 384 мИЕ/мг белка.

Таблица 2

Активность ингибиторов трипсина в прорастающих клубнях картофеля

Сорт	Хар-ка сорта	Субстрат БАПА		Субстрат желатин	
		мИЕ/г массы	мИЕ/мг белка	ИЕ/г массы	мИЕ/мг белка
Ашкадар	У	185 ± 30,7	12,3	3,4±0,3	226
Гатчинский	НУ	162 ± 21	5,6	2,5±0,3	86
Невский	НУ	163 ± 15,7	3,8	2,8±0,2	66
Ева	У	160 ± 19,1	20,5	3,0±0,2	384
Акротия	НУ	175 ± 22,5	5,5	3,2±0,2	101
Луговской	НУ	175 ± 18,2	5,5	3,0±0,3	94
Пушкинец	НУ	175 ± 25,2	6,07	3,0±0,2	104
Фреско	У	188 ± 27,2	12	3,2±0,3	205
Пригожий	СУ	204 ± 39,7	8,5	3,5±0,2	145
Томич	НУ	210 ± 34,2	6,1	3,7±0,2	108
Тулунский	СУ	210 ± 41,4	8,7	3,5±0,2	145
Уральский ранний	СУ	204 ± 29,8	8,1	3.5±0,2	140
Сантэ	СУ	205 ± 29,2	7,1	3,75±0,2	128
Белореченский	У	218 ± 35,5	8,7	4,0±0,3	160

Примечание: У- устойчивый сорт, СУ - среднеустойчивый сорт, НУ - неустойчивый сорт

Следует отметить, что значение показателя ингибиторной активности с использованием желатины значительно выше, чем аналогичные показатели с субстратом БАПА.

По активности ингибиторов трипсина в проросших клубнях исследуемые сорта картофеля можно разделить на 3 группы:

1 – с высокой активностью ингибиторов (Ева, Ашкадар, Фреско, Белореченский),

2 – со средними значениями активности ингибиторов (Пригожий, Тулунский, Уральский ранний, Сантэ),

3 – с низкой активностью (Томич, Акросия, Пушкинец, Луговской, Невский, Гатчинский).

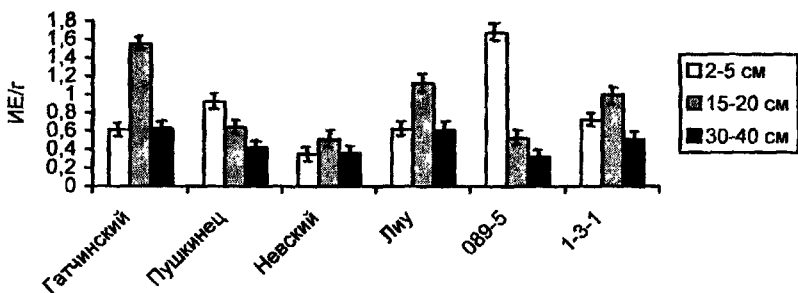
Уровень активности ингибиторов трипсина в клубнях исследованных сортов картофеля коррелируют с показателем их устойчивости к неблагоприятным факторам, в т.ч. к действию патогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей. Из таблицы видно, что сорта с высокой устойчивостью характеризуются повышенным уровнем активности ингибиторов. Сорта с низкой устойчивостью обладают невысокими показателями антипротеолитической активности.

2.2. Активность ингибиторов протеиназ в проростках картофеля

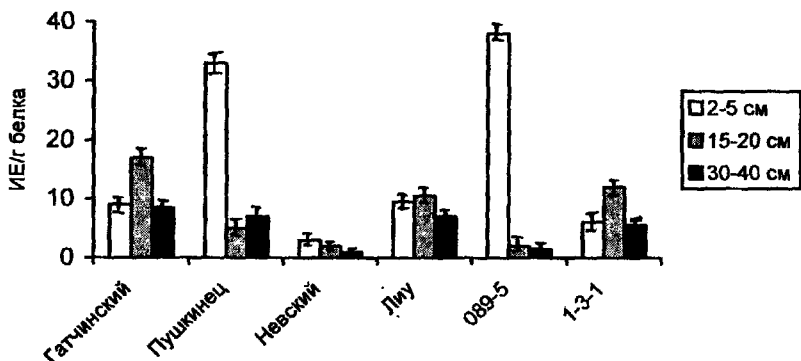
Большой практический интерес представляет исследование активности ингибиторов протеиназ в стеблях и листьях картофеля, которыми питаются личинки колорадского жука. В связи с этим, мы изучали динамику активности ингибиторов трипсина в растениях нескольких сортов картофеля, различающихся по устойчивости к колорадскому жуку (рис. 4).

Видно, что на стадии молодых проростков (длина проростков не более 5 см) наибольшей активностью ингибиторов трипсина обладает устойчивая к колорадскому жуку линия 089-5 (1,68 ИЕ/г массы ткани), у среднеустойчивого сорта Пушкинец этот показатель составляет 0,93 ИЕ/г. Активность ингибиторов у сортов Гатчинский, Лиу и линии 1-3-1 определяется примерно на среднем уровне. Неустойчивый сорт Невский характеризуется низкой активностью этих ингибиторов в проростках этого возраста.

Аналогичная картина наблюдается и при исследовании проростков на следующем этапе развития (для проростков длиной 15-20 см). В этом случае высокая активность ингибиторов трипсина характерна для устойчивых к колорадскому жуку сортов. Как видно, показатель активности ингибиторов протеиназ в листьях картофеля положительно коррелирует с уровнем устойчивости сорта к колорадскому жуку.



А



Б

Рис. 4. Изменение активности ингибиторов трипсина в проростках
 А – активность ингибиторов трипсина на массу ткани (ИЕ/г);
 Б – удельная активность ингибиторов трипсина на (ИЕ/г белка)

В то же время, измерение активности ингибиторов проназы Е в проростках не выявило такой закономерности. Уровень активности ингибиторов этого фермента в листьях не зависит от степени устойчивости сорта картофеля к колорадскому жуку. Однако, нужно отметить, что наибольшая активность ингибиторов проназы Е выявляется у устойчивого сорта Пушкинец, а наименьшая активность – у неустойчивого сорта Невский.

Из рисунка 4 видно, что активность ингибиторов в проростках по мере их развития снижается. Активность ингибиторов трипсина и ингибиторов проназы Е в проростках позднего возраста значительно ниже, чем в молодых проростках. Особенно четкие различия между проростками разного возраста выявляются по удельной активности ингибиторов.

Полученные данные позволили выявить положительную связь между устойчивостью сортов картофеля к колорадскому жуку и уровнем активности ингибиторов трипсина в проростках. Чем выше активность ингибиторов трипсина в листьях, тем устойчивее сорт к действию пищеварительных протеиназ насекомых, в т.ч. и личинок колорадского жука.

3. Активность ингибиторов протеолитических ферментов насекомых-вредителей (личинок колорадского жука и фасолевой зерновки) в тканях картофеля

3.1. Активность протеолитических ферментов личинок колорадского жука и фасолевой зерновки

Как известно, значительная часть ингибиторов в семенах и других органах растений представлена ингибиторами чужеродных протеиназ: ферментов животных, насекомых, микроорганизмов (Appelbaum, Konjin, 1966; Мосолов, 1983; Конарев, 1987; Валуева, Мосолов, 1995; 2002). Это позволяет предполагать, что ингибиторы являются важной частью защитного механизма растений от поражения их гетеротрофными организмами.

Среди молекулярных факторов, обеспечивающих пищевые связи фитофагов с растениями, ключевая роль принадлежит пищеварительным гидролазам (амилазам, протеиназам и т.д.). В процессе коэволюции с растениями насекомые приобрели наборы пищеварительных гидролаз, в той или иной степени приспособленные к усвоению питательных веществ из определенных видов растений и их отдельных органов (Дунаевский и др., 1995; Konarev et al., 1999). Особенно ярко специализация и адаптивность ферментативной системы проявляется у колорадского жука. В его кишечнике найдены химотрипсиноподобные и цистеиновые ферменты (Ryan, 1990; Konarev and Fasulati, 1996), но ведущая роль в пищеварении принадлежит кислой аспартильной протеиназе типа катеписина D (Brunelle et al., 1999). Последняя инициирует процесс расщепления белков, который продолжают остальные протеиназы. В связи с вышесказанным, особый интерес представляет исследование роли ингибиторов во взаимоотношениях растений и насекомых-вредителей.

Как известно, питаются растениями картофеля жуки и личинки, но наиболее вредоносны последние. Личинки колорадского жука за 2 недели могут уничтожить до 45 % листовой поверхности растений (Теняев, 2000)

Нами показано, что ткани личинок содержат ферменты, гидролизующие желатиновый субстрат. Молодые личинки характеризуются невысокой активностью ферментов. Так, в гомогенате молодых личинок (размер личинки до 3 мм) протеолитическая активность составила 0,14 Е·мкл/мин или 280 Е/г сырой массы (рис. 5), что соответствует активности 1,3 мкг коммерческого препарата бычьего трипсина. В гомогенате личинок размером 3-8 мм протеолитическая активность составила 0,167 Е·мкл/мин или 334 Е/г массы личинок, что соответствует активности 1,5 мкг трипсина. Как видно, с ростом личинок активность протеолитических ферментов в тканях повышается. У личинок с размером тела больше 8 мм активность протеиназ доходит до 0,217 Е·мкг/мин или 434 Е/г.

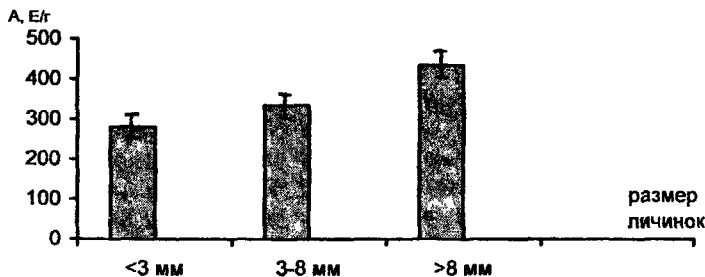


Рис.5. Зависимость активности желатингидролизующих протеолитических ферментов личинок колорадского жука от их размеров

Таким образом, в процессе роста и развития личинок колорадского жука имеет место увеличение активности протеолитических ферментов, что свидетельствует о повышении способности насекомых к расщеплению белковых субстратов. В дальнейшем, для получения препаратов с протеиназной активностью мы использовали личинки 3-й стадии развития.

3.2. Активность ингибиторов протеиназ насекомых-вредителей (фасоловой зерновки и личинок колорадского жука) в тканях картофеля

Виды насекомых существенно отличаются по компонентному составу гидролаз и, соответственно, по относительной активности и роли отдельных молекулярных компонентов. У них обнаружены трипсино-, эластаза-, химотрипсин- подобные, цистеиновые и другие ферменты. У видов с широкой пищеварительной специализацией, например *Tenebrio molitor* L., в кишечнике выявляется широкий спектр протеолитических ферментов. У более специализированных видов может преобладать по активности один тип фермента, например, трипсинподобный фермент у *Rhyzopertha dominica* F. (Конарев, Фомичева, 1991; Zhu and Baker, 1999). Особенно ярко специализация и адаптивность ферментативной системы проявляется у колорадского жука. В его кишечнике найдены химотрипсиноподобные, трипсиноподобные и цистеиновые ферменты (Ryan, 1990; Konarev and Fasulati, 1996; Конарев Ал.В., 2000).

Как видно из таблицы 3, активность ингибиторов протеолитических ферментов личинок колорадского жука и активность ингибиторов трипсина значительно варьируют в зависимости от сорта картофеля.

Таблица 3

Активность ингибиторов протеиназ (ИЕ/г массы) в клубнях сортов картофеля, различающихся по устойчивости к колорадскому жуку.

Сорт, линия	Характеристика сорта	Активность ингибиторов		
		трипсина	протеиназ личинок колорадского жука	протеиназ фасоловой зерновки
Ашкадар	У	5,6±0,3	8,5±0,9	4,2±0,3
Белореченский	У	5,5±0,3	8,9±0,9	4,2±0,3
1-3-1	У	6,0±0,3	8,1±0,7	4,3±0,3
Сантэ	У	5,6±0,5	8,1±0,8	4,2±0,3
Пушкинец	СУ	4,2±0,2	7,8±0,6	4,2±0,3
Гатчинский	СУ	4,5±0,2	6,0±0,3	4,1±0,3
Невский	НУ	3,9±0,2	5,2±0,4	4,2±0,3
Ева	НУ	3,5±0,2	3,0±0,3	4,2±0,3
Акросия	НУ	3,6±0,2	4,1±0,2	4,2±0,3
Луговской	НУ	3,3±0,2	5,0±0,3	4,1±0,3

Примечание: У - устойчивый сорт, СУ - среднеустойчивый сорт, НУ - неустойчивый сорт

Причем, устойчивые к колорадскому жуку сорта характеризуются высокой активностью этих ингибиторов, а неустойчивые – низкой активностью. Так, в группе устойчивых сортов активность ингибиторов трипсина выявляется в пределах 5,5 - 6,0 ИЕ/г массы, активность ингибиторов протеиназ личинок колорадского жука - 8,1-8,9 ИЕ/г массы. У неустойчивых сортов эти показатели значительно ниже - 3,3-3,9 ИЕ/г и 4,1-5,2 ИЕ/г соответственно. Эти результаты позволяют утверждать, что уровень активности ингибиторов пищеварительных протеиназ положительно коррелирует с устойчивостью сорта к колорадскому жуку.

Интересно отметить, что активность ингибиторов протеиназ фасолевого зерновки в клубнях всех сортов определяется на примерно одинаковом уровне (~4,2 ИЕ/г массы). Полученные данные свидетельствуют о том, что в клубнях картофеля содержатся специфические ингибиторы, проявляющие активность только к ферментам личинок колорадского жука.

Связь между устойчивостью сорта к колорадскому жуку и показателем активности ингибиторов протеиназ личинок в растительных тканях обнаруживается и при исследовании листьев картофеля (рис. 6).

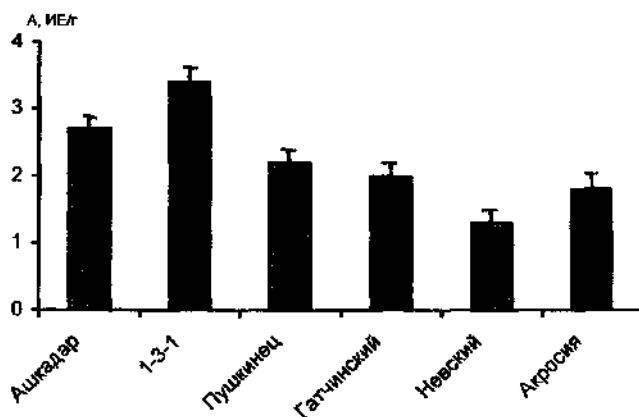


Рис.6. Активность ингибиторов протеиназ личинок колорадского жука в листьях картофеля

У устойчивых сортов (Ашкадар и линии 1-3-1) активность ингибиторов протеиназ личинок колорадского жука самая высокая и составляет, соответственно, 2,7±0,2 и 3,4±0,3 ИЕ/г массы. У среднеустойчивых сортов (Пушкинец и Гатчинский) активность ингибиторов трипсина составляет 2,2±0,2 и 2,0±0,1 ИЕ/г массы. У неустойчивых сортов (Невский и Акросия)

активность ингибиторов протеиназ личинок самая низкая - $1,3 \pm 0,1$ и $1,8 \pm 0,1$ ИЕ/г массы.

Можно предположить, что появление специфичных к ферментам личинок колорадского жука ингибиторов в тканях картофеля является результатом коэволюции насекомого и растительного организма. Это факт также свидетельствует в пользу предположения, что ингибиторы гидролаз представляют один из эффективных механизмов приспособления растений к действию неблагоприятных факторов, в том числе, и к действию насекомых вредителей и микроорганизмов-патогенов.

Таким образом, высокая активность ингибиторов протеиназ жука в клубнях характерна для сортов, устойчивых к колорадскому жуку. Можно утверждать, что ингибиторы протеиназ входят в число факторов, определяющих устойчивость картофеля к колорадскому жуку и уровень их активности и молекулярной гетерогенности в тканях могут служить показателями такой устойчивости.

4. Активность ингибиторов протеиназ в тканях картофеля, обработанных физиологически активными веществами

Большой практический интерес представляет создание препаратов, стимулирующих защитные механизмы растений к действию патогенов и насекомых-вредителей. В этом плане актуальным представляется исследование активности ингибиторов протеиназ в вегетирующих органах картофеля при обработке их физиологически активными соединениями. На рисунке 7 представлены данные об активности ингибиторов трипсина (субстрат желатин) в проростках различных сортов, выращенных из клубней, обработанных 0,001% раствором препарата Рифтал. В качестве контроля служили клубни, обработанные дистиллированной водой.

Обработка клубней 0,001% раствором Рифтала у большинства исследованных нами сортов картофеля вызывает повышение активности ингибиторов трипсина в проростках. Причем, такая закономерность обнаруживается при использовании в качестве субстрата для фермента синтетического соединения БАПА и белка желатина. Так, активность ингибиторов трипсина в проростках, выращенных из обработанных клубней сорта Ашкадар, Тулунский повышается на 60 – 75 % по сравнению с контрольными.

Увеличение активности ингибиторов трипсина в клубнях наблюдалось при обработке их химическим препаратом ТМТД и препаратом бактериального происхождения фитоспорином. В таблице 4 представлены данные об активности ингибиторов трипсина в клубнях. Как видно, обработанные клубни характеризуются более высокой активностью

ингибиторов трипсина, чем контрольные. Так, через 10 дней после обработки фитоспорином, антитрипсиновая активность в них была выше на 14% , чем в необработанных клубнях.

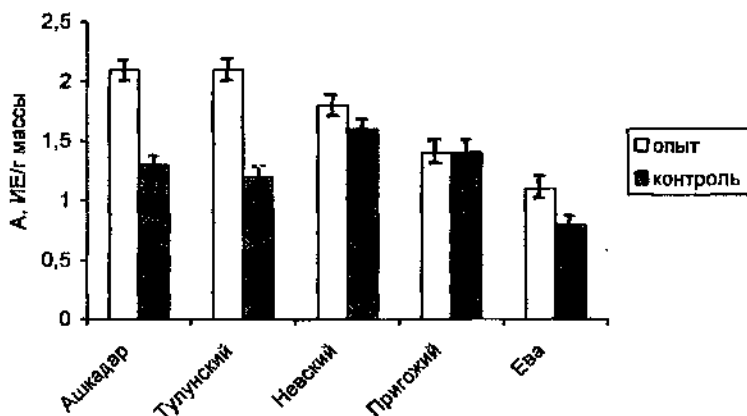


Рис. 7. Активность ингибиторов трипсина в проростках картофеля (субстрат желатин)

- - проростки, выращенные из клубней, обработанных 0,001% раствором «Рифтал»
- - контроль (обработка клубней водой)

Как видно, в прорастающих клубнях опытных и контрольных вариантов активность ингибиторов трипсина снижается. Однако, клубни обработанные химическими и биологическими препаратами характеризовались более высокой активностью ингибиторов, чем клубни контрольного варианта.

Таблица 4
Активность ингибиторов трипсина (ИЕ/г) в прорастающих клубнях картофеля, обработанных ТМТД и фитоспорином (субстрат желатин)

Варианты опыта	Сутки после обработки			
	10	20	25	30
Контроль	5.01 ± 0.1	4.7 ± 0.1	3.52 ± 0.09	3.16 ± 0.08
ТМТД	5.48 ± 0.1	5.51 ± 0.15	3.80 ± 0.08	3.21 ± 0.07
Фитоспорин	5.71 ± 0.2	5.62 ± 0.2	4.06 ± 0.1	3.38 ± 0.1
Арахидоновая кислота		8.20 ± 0.2	7.01 ± 0.2	5.48 ± 0,2

Таким образом, обработка клубней картофеля защитными и биостимуляторами (Рифгал, ТМТД, фитоспорин, арахидоновая кислота) стимулирует синтез белков с ингибиторной активностью, что повышает их устойчивость к действию неблагоприятных факторов. В обработанных этими препаратами клубнях имеет место 1,5 -3 кратное повышение активности ингибиторов трипсина.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны новые методы количественного определения активности протеолитических ферментов и их ингибиторов.
2. В личинках колорадского жука обнаружены протеолитические ферменты, гидролизующие субстрат желатин. Наибольшая активность протеиназ выявлена в тканях личинок поздних стадий развития.
3. В листьях и клубнях картофеля выявлены белки, подавляющие активность протеиназ личинок колорадского жука и протеиназ фасоловой зерновки. Показано, что уровень активности ингибиторов экзогенных протеиназ (ферментов личинок насекомых, трипсина) в тканях картофеля зависит от степени устойчивости сорта к колорадскому жуку.
4. Исследованные сорта картофеля существенно различаются по активности ингибиторов трипсина, протеиназ личинок колорадского жука, проназы и характеризуются одинаковым уровнем ингибиторов протеиназ фасоловой зерновки.
5. Обработка клубней картофеля защитными препаратами стимулирует синтез белков с ингибиторной активностью, что повышает их устойчивость к действию неблагоприятных факторов, в т.ч. и к действию насекомых- вредителей.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ибрагимов Р.И., Хабибуллин С.И. Активность протеиназ и их ингибиторов в проростках пшеницы при действии культуральных фильтратов патогенных грибов // Результаты научных исследований преподавателей биологического факультета БашГУ. - Уфа: Баш. ун-т. - 1997. - С. 19-21.
2. Ибрагимов Р.И., Ахметов Р.Р., Хабибуллин С.И. Диффузия ингибиторов протеиназ из набухающих и прорастающих семян. // Результаты научных исследований биологического факультета Башкирского госуниверситета за 1996 год. Уфа.- 1997.- С.3.
3. Ибрагимов Р.И., Марданшин И.С., Зайнутдинова Г.Ф., Хабибуллин С.И., Пусенкова Л.И. Механизмы индуцированной устойчивости картофеля к патогенам при обработке биопрепаратами // Материалы VII Международной научно-практической конференции "Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье.- Симферополь.-1998.-с.408.
4. Зайнутдинова Г.Ф., Хабибуллин С.И. Протеиназы и амилазы патогенных грибов *Fusarium* и *Helminthosporium* // Тезисы докладов V Молодежной научной конференции.-Сыктывкар.-1998.-С.67.
5. Хабибуллин С.И., Зайнутдинова Г.Ф. Ингибиторы экзогенных протеиназ в тканях культурных растений // Тезисы докладов V Молодежной научной конференции.-Сыктывкар.-1998.-С.203-204.
6. Ибрагимов Р.И., Зайнутдинова Г.Ф., Хабибуллин С.И. Протеолитические ферменты патогенных грибов р. *Fusarium* // Тезисы докладов IV Съезда физиологов растений России.-1999.-с. 216.
7. Ибрагимов Р.И., Хабибуллин С.И., Ахметов Р.Р. Изменение активности ингибиторов протеолитических ферментов в тканях растений при обработке их защитными препаратами // Материалы конф. «Химия и технология применения регуляторов роста растений» 20.12.01. Уфа.- 2001.- С.126-127.
8. Ибрагимов Р.И., Хабибуллин С.И. Измерение активности протеиназ с использованием желатинового слоя фотопластинок. // Итоги биол. исследований. Сборник научн. трудов Башгосуниверситета. - 2000. - Уфа. - С.108-109.
9. Ибрагимов Р.И., Хабибуллин С.И., Ахметов Р.Р. Способ определения активности протеолитических ферментов. Патент РФ на изобретение № 2175134. – 2001.
10. Хабибуллин С.И., Женин Р.И. Изучение активности протеолитических ферментов личинок *Leptinotarsa decemlineata* и их ингибиторов в

- листьях *Solanum tuberosum*. // Итоги биол. исследований. Сборник научн. трудов Башгосуниверситета. - 2001. - Уфа. - С.116-117.
11. Женин Р.И., Хабибуллин С.И. Способ измерения активности амилаз из тканей насекомых. // Итоги биол. исследований. Сборник научн. трудов Башгосуниверситета. - 2001. - Уфа. - С.118.
 12. Хабибуллин С.И., Ибрагимов Р.И. Метод определения активности ингибиторов желатингидролизующих ферментов. // Итоги биол. исследований. Сборник научн. трудов Башгосуниверситета. - 2002. - Уфа. - С.37-39
 13. Женин Р.И., Хабибуллин С.И., Ибрагимов Р.И. Использование пластины с полиакриламидным гелем для определения активности амилазы слюны. // Итоги биол. исследований. Сборник научн. трудов Башгосуниверситета, - 2002. - Уфа. - С.40-41
 14. Ибрагимов Р.И., Марданшин И.С., Хабибуллин С.И. Активность ингибиторов протеиназ у сортов картофеля, различающихся по устойчивости к фитопатогенам и насекомым-вредителям // Материалы конф. «Актуальные проблемы современной генетики».- 2003.- М.- С.81-82.

Хабибуллин Салават Ильнурович

АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ЭКЗОГЕННЫХ ПРОТЕИНАЗ
В КЛУБНЯХ И ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ
В СВЯЗИ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К КОЛОРАДСКОМУ ЖУКУ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

*Лицензия на издательскую деятельность
ЛР № 021319 от 05.01.99 г.*

Подписано в печать 21.08.2003 г. Бумага офсетная. Формат 60x84/16.
Гарнитура Times. Отпечатано на ризографе.
Усл.печ. л. 1,26. Уч.-изд.л. 1.38. Тираж 100 экз. Заказ 544.

*Редакционно-издательский отдел
Башкирского государственного университета
450074, РБ, г.Уфа, ул.Фрунзе, 32.*

*Отпечатано на множительном участке
Башкирского государственного университета
450074, РБ, г.Уфа, ул.Фрунзе, 32.*

2003-A

13259

#13259