

УДК 630.18 + 504.33

Н.М. Шебалова, Л.Г. Бабушкина
(Уральская государственная лесотехническая академия)

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХВОИ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В ЗОНАХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Приведены результаты определения протеолитической активности, аминокислотного состава в ассимиляционных органах сосны, произрастающей в разных зонах загрязнения.

Из всех компонентов лесных биогеоценозов наиболее чувствительными к действию атмосферных техногенных выбросов являются растения и, прежде всего, хвойные и их ассимиляционные органы, поскольку они не обладают специальной приспособленностью к загрязнению атмосферного воздуха. Гудериан (1979) считает, что наибольшую опасность для растений представляют газообразные соединения фтора, серы, азота и др.

Известно, что взаимосвязанные реакции, которые составляют "жизнь" живой клетки, зависят от ферментов. Все реакции промежуточного обмена веществ, поставляющих строительный материал и энергию для образования новых и жизнедеятельности старых клеток, катализируются ферментами. Поэтому изменения, происходящие в обмене веществ, а следовательно, и в химическом составе растений под влиянием условий среды, теснейшим образом связаны с соответствующими сдвигами в ферментных системах, поскольку первой ответной реакцией растений на проникновение в них токсикантов является нарушение физиолого-биохимических процессов, управляемых ферментами. Кроме того, постоянное присутствие в атмосфере промышленных регионов фитотоксичных соединений приводит к необходимости формирования у растений защитных реакций, позволяющих растениям сохранять относительное равновесие процессов их роста и развития (Гирс, 1982; Илькун, 1987).

Целью наших исследований было изучение активности протеазы, аминокислотного состава хвои, содержания пролина и оксипролина в хвое сосны обыкновенной, произрастающей в зонах действия Полевского криолитового завода (ПКЗ) и Первоуральско-Ревдинского промышленного узла (ПРПУ). Для этого были заложены постоянные пробные площади (ППП) в зонах сильного, среднего и слабого загрязнения по направлению господствующих ветров. Основными токсикантами в рай-

оне ПКЗ являются газообразные фториды и сернистый газ, способные распространяться на очень большие расстояния, а в районе ПРПУ - сернистый газ и тяжелые металлы. На исследуемых участках преобладают две категории деревьев - нормально вегетирующие и угнетенные. Следовательно, исследования проводились на хвое этих двух категорий деревьев. Активность протеазы определяли по общепринятой методике (Методы биохимического..., 1972) в 5 повторностях каждого образца. Активность фермента выражали в единицах ферментативного действия, что представляет собой количественное изменение субстрата под действием фермента за определенный промежуток времени. Аминокислотный состав хвои определяли на автоматическом анализаторе аминокислот ААА - 339 (ЧССР), содержание оксипролина и пролина - колориметрическим методом (Методы биохимических..., 1982).

Естественно, при действии фитотоксикантов происходят глубокие изменения общего метаболизма. Ведущее место в регуляции обмена веществ растительных тканей занимают белки, нуклеиновые кислоты и др. Белковый обмен у древесных растений при действии неблагоприятных факторов внешней среды изучен недостаточно. Действие промышленных выбросов вызывает нарушение синтеза и катаболизма белков (Физиология сосны..., 1990). Распад белков до конечных продуктов осуществляется в три этапа: протеолиз, аммонификация и нитрификация. Протеолиз осуществляется при участии гидролитических ферментов - протеаз и его конечным продуктом являются аминокислоты, т.е. протеолиз служит пусковым механизмом, включающим в себя все последующие этапы преобразования белков. Развитие протеолитической активности определяется наличием в хвое азотсодержащих органических соединений, главным образом гидролизуемых. Сведения о белках в вегетативных органах сосны довольно ограничены, хотя содержание белковой фракции азотсодержащих соединений достигает порой значительных величин (12-13%) в хвое (Судачкова, 1977). Азот в органах и тканях хвойных растений представлен преимущественно белковой формой. Белки могут составлять в определенные периоды 93 - 99% от общего содержания азота, небелковый азот в хвое сосны не превышает 20%. Основную часть небелковой фракции азота у хвойных составляют свободные аминокислоты и аммиачный азот. А азотный обмен - это один из важнейших показателей физиологического состояния растений, а также их адаптационных возможностей при воздействии неблагоприятных факторов. При изучении метаболизма азотсодержащих соединений был сделан вывод о значительной роли отдельных фракций белков и некоторых аминокислот в повышении стойкости растений в экстремальных условиях.

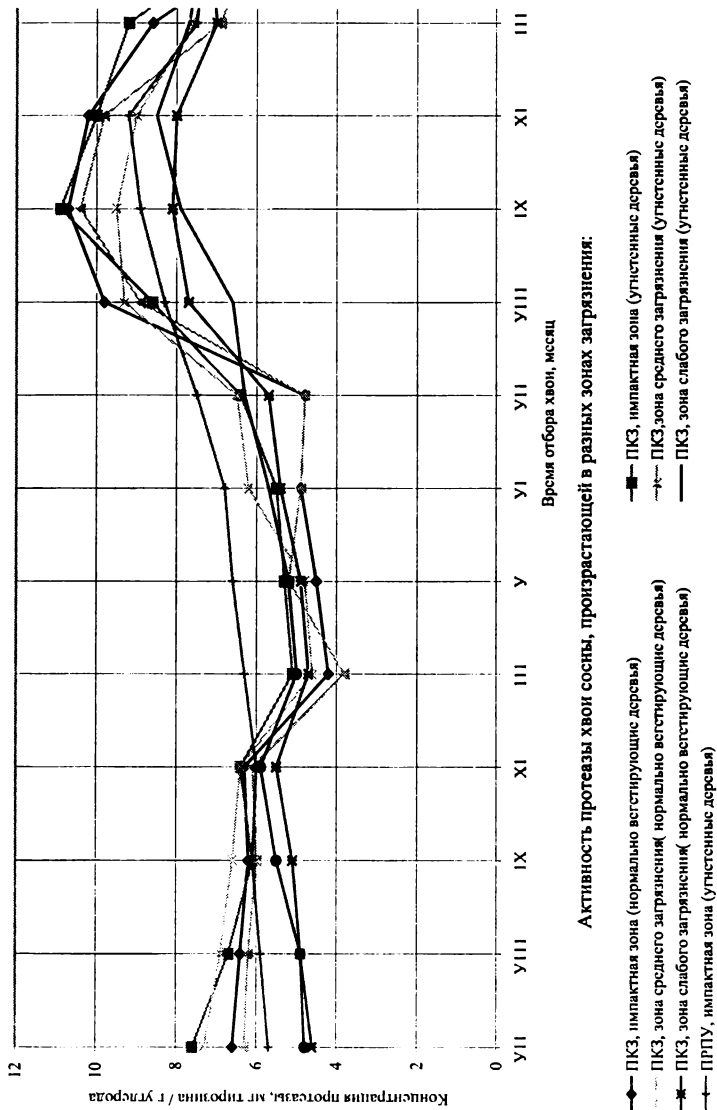


Таблица 1
Аминокислотный состав хвои второго года жизни нормально вегетирующей сосны, произрастающей в зонах техногенного загрязнения ПКЗ, мг/100 г

Аминокислоты	Удаление от ПКЗ, км									
	1,5 - 2,0		4,0 - 4,5		7,0 - 7,5		Контроль			
	Количество	% увеличения от контроля	Количество	% увеличения от контроля	Количество	% увеличения от контроля	Количество	% увеличения от контроля	Количество	Контроль
Аспарагиновая кислота	747 ± 72	32,5	667 ± 17	18,3	626 ± 20	10,9	564 ± 6			
Треонин	338 ± 26	30,0	307 ± 13	18,0	284 ± 12	9,2	260 ± 13			
Серин	314 ± 27	40,8	270 ± 10	21,0	262 ± 10	17,4	223 ± 10			
Глутаминовая кислота	1061 ± 109	35,3	927 ± 26	18,2	881 ± 55	12,3	784 ± 14			
Пролин	373 ± 19	13,0	370 ± 18	13,0	350 ± 44	12,3	285 ± 29			
Глицин	464 ± 35	24,6	417 ± 17	25,9	395 ± 12	5,6	374 ± 27			
Аланин	444 ± 33	34,9	406 ± 18	23,4	376 ± 38	14,2	329 ± 29			
Валин	490 ± 45	23,1	425 ± 11	6,7	428 ± 16	6,7	398 ± 10			
Изолейцин	351 ± 27	22,7	328 ± 4	14,6	308 ± 6	7,6	286 ± 7			
Лейцин	577 ± 39	20,7	543 ± 16	13,5	514 ± 9	7,5	478 ± 2			
Тирозин	220 ± 24	30,2	200 ± 3	18,3	188 ± 6	11,2	169 ± 6			
Фенилаланин	418 ± 9	17,7	362 ± 2	1,9	378 ± 12	2,4	355 ± 6			
Гистидин	24 ± 36	16,8	241 ± 23	24,8	225 ± 39	16,0	193 ± 17			
Лизин	432 ± 22	23,0	401 ± 6	14,2	380 ± 11	8,2	351 ± 6			
Аргинин	407 ± 28	28,8	370 ± 15	17,0	366 ± 5	15,8	316 ± 4			

Из данных, представленных на рисунке, видно, что уровень активности протеазы, обнаруженный в сформировавшейся хвое всех категорий деревьев на всех исследуемых ППП, практически не изменяется в течение длительного периода. Очевидно, что в этот период времени в вегетативных органах сосны достаточно питательных веществ (скорости синтеза белка и его распада в этот период очевидно равны). Сопоставляя показатель протеолитической активности в вегетативных органах, можно сделать вывод, что процессы мобилизации белков в них протекают одинаково интенсивно как у сосен, произрастающих в импактной зоне ПКЗ, так и в зоне слабого загрязнения, что не наблюдается в более зрелой хвое. В августе - сентябре в ней происходит резкое возрастание окислительно-восстановительных процессов, что, в свою очередь, не могло не оказать влияние и на гидролитические ферменты. Уровень протеолитической активности возрастает, причем у угнетенных деревьев она несколько выше, чем у нормально вегетирующих. Повышенный уровень активности протеазы свидетельствует о недостатке азота, что и способствует интенсификации процессов разложения белков. По мере приближения ППП к ПКЗ активность фермента возрастает на 20-25% у нормально вегетирующих и на 22-29% - у угнетенных. Протеолитическая активность хвои сосны, произрастающей в импактной зоне ПРПУ, постепенно возрастает в течение всего периода и увеличивается на 30-35%. Если учесть, что запасы белкового азота в хвое сравнительно низкие, то при высоком уровне протеолитической активности они могут израсходоваться почти полностью, что не может не влиять на биохимические процессы.

С целью получения представления о состоянии аминокислотного состава хвои сосны было исследовано содержание общих аминокислот в хвое сосны в зоне действия ПКЗ, поскольку фтор-ион является более сильным окислителем, чем газообразные сернистые соединения. Аминокислоты представляют собой физиологически наиболее важную группу азотистых соединений, поскольку они участвуют в синтезе ферментов, нуклеиновых и органических кислот, сложных углеводов, жиров и т.д. Важность аминокислот определяется непосредственным использованием их в синтезе белков, причем азот белковой фракции в тканях хвойных может составлять 99% общего его содержания.

Помимо непосредственного участия в построении белков аминокислоты могут регулировать активность ферментов. Например, экзогенные глутамат, аспарат и особенно серин, повышают активность глутаматдегидрогеназы, в то время как лейцин и глицин снижают активность данного фермента. Известны данные об использовании свободных аминокислот хвойными древесными растениями в качестве источника органического азота.

При исследовании хвои сосны, произрастающей в разных зонах загрязнения, установлено довольно высокое содержание аспарагиновой и глута-

миновой кислот. Известно, что эти кислоты играют первостепенную роль в аминокислотном обмене, активно участвуя в реакциях переаминирования, дезаминирования, прямого аминирования. Данные аминокислоты способны присоединять NH_3 , превращаясь в соответствующие амиды. Повышенный синтез глутаминовой и аспарагиновой аминокислот предотвращает накопление в растениях вредных концентраций аммиака. Из глутаминовой кислоты образуются пролин и аргинин. К аминокислотам, образующимся из аспарагиновой кислоты, относятся лизин, треонин и метионин.

Проведенные исследования показали, что среди аминокислот преобладают серин, треонин, аланин, валин, изолейцин, фенилаланин, лизин, пролин. Качественный состав аминокислот при длительном воздействии фторидов на ассимиляционные органы сосны на всех исследуемых участках не изменяется, а вот их количественное содержание зависит от месторасположения исследуемого участка относительно источника загрязнения. В хвое, наиболее активно аккумулирующей фитотоксиканты, происходит увеличение содержания аминокислот, и степень этого увеличения определяется уровнем накопления фтор-иона. Так, в хвое сосны импактной зоны на 20-35% выше содержание глутаминовой и аспарагиновой кислот, треонина, аланина, тирозина, аргинина, на 40% - серина, количество остальных аминокислот возрастает на 16-25%. По мере удаления исследуемого участка от ПКЗ наблюдается снижение количественного содержания аминокислот в хвое относительно зоны сильного загрязнения: на ППП 4-4,5 км - в 1,5-2 раза, на ППП 7,0-7,5 км - 2,0-3,5 раза. Повышенный уровень фенилаланина может свидетельствовать об активации синтеза лигнина клеточной в стенке. В условиях промышленного загрязнения в хвое второго года жизни происходящее увеличение аминокислот связано с усилением гидролитического расщепления белка и подавлением синтетических процессов. Это свидетельствует о разбалансировке биосинтетических процессов и накоплении аминокислот.

Белки хвои сосен, произрастающих в разных зонах загрязнения, отличаются и по содержанию пролина, единственного источника и предшественника оксипролина в структурном белке клеточных стенок плазмолеммы. Оксипролин, как правило, в свободном состоянии в растениях не встречается, а пролин может быть как в связанном, так и в свободном виде. Свободный пролин - постоянный компонент растительной клетки, приурочен к точкам максимально напряженного метаболизма, в котором механизм его утилизации оказывается предельно экономным. Он может быть включен в структурные и биологически активные белки, для синтеза хлорофилла, путем прямого включения его молекулы непосредственно в скелет порфобилиногена, как источник энергии, азота и как возможный физико-химический медиатор в метаболизме покоящихся тканей.

Таблица 2

Содержание свободного пролина и оксипролина в хвое второго года жизни нормально вегетирующих сосен, произрастающих в разных зонах загрязнения ПКЗ, мг/100 г

Время года	Удаление от источника загрязнения, км							
	1,5 - 2,0		4,0 - 4,5		7,0 - 7,5		Контроль	
	Свободный пролин	Окси-пролин	Свободный пролин	Окси-пролин	Свободный пролин	Окси-пролин	Свободный пролин	Окси-пролин
Весна	154,9 ±1,9	522,0 ±26	142,0 ± 1,0	447,3 ±18	75,1 ± 7	424,8 ±27	67,2 ±2	408± 34
Лето	69,50 ±4,2	619,6 ±28	44,9 ± 3,5	467 ± 36	38,8 ± 1	454,3 ±23	33,4 ±2	385,0± 14
Осень	83,8 ± 1,9	620,3 ±15	67,4 ±3	565,4 ±29	61,3 ± 2	540± 20	40,8 ±3	412,3± 32

Естественное накопление его происходит в структурах и тканях, находящихся перед началом интенсивных процессов роста и дифференциации (пыльцевые зерна, точки роста, семена), а также в листьях и стеблях некоторых растений на определенных этапах онтогенеза. Необходимый для жизнедеятельности растений внутриклеточный уровень свободного пролина поддерживается как регуляцией ферментов его синтеза, так и их деградацией, которые могут индуцироваться его высокими концентрациями. В условиях стресса механизм по типу обратной связи в клетках может и не функционировать. В связи с этим в тканях растений, подвергнутых действию неблагоприятных факторов, количество свободного пролина может значительно возрасть. Увеличение свободного пролина в условиях стресса исследователи рассматривают как защитно-приспособительную реакцию к условиям среды. Защитную функцию свободного пролина связывают с его высокой гидрофильностью, с отсутствием ингибирующего эффекта высоких концентраций и его способностью стабилизировать коллоиды и метаболические процессы в тканях. Увеличение синтеза экстенсивна может быть не связано с клеточным ростом, а являться одним из механизмов защиты растений против проникновения патогенов в ткани растений, а также признаком старения растений.

Свободный пролин - составная часть комплекса веществ, синтезируемых растениями в процессе жизнедеятельности, и его накопление зависит от генотипа растения, их физиологического состояния, от внешних условий.

Анализ приведенных табличных данных выявил корреляционную зависимость между накоплением в вегетационных органах свободного пролина и оксипролина с уровнем аккумуляции в них фтор-иона, наибольшей концентрации токсиканта соответствует и высокая степень содержания перечисленных выше аминокислот. Повышенное содержание свободного пролина в хвое второго года жизни в весенний период связано с активацией метаболических процессов и фотосинтеза в связи с интенсивным ростом растений. Осеннее увеличение аминокислот, очевидно, вызвано активизацией процессов разложения белков, синтезом экстенсивна и процессами старения.

Активность аминокислот в молодой хвое на 10-15% выше, чем в более зрелой хвое, особенно это касается оксипролина. Степень накопления пролина в хвое сосны, произрастающей в районе ПРПУ, на 8-10% ниже, чем на ПКЗ, а оксипролина - практически такая же. Прослеживается и зависимость аминокислот от состояния древостоя - у сосен с угнетенным ростом по сравнению с нормально вегетирующими наблюдается повышение на 12-18% пролина и на 5-9% - оксипролина.

Из вышеизложенного следует, что протектитическая активность в хвое сосны зависит от ее возраста и местопрорастания древостоя.

ЛИТЕРАТУРА

- Гудериан Р. Загрязнение воздушной среды. М.: Мир, 1979. 200 с.
- Илькун Г.М. Загрязнители атмосферы и растений. Киев: Наукова думка, 1987. 111 с.
- Гирс Г.И. Физиология ослабленного дерева. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1982. 256 с.
- Методы биохимического анализа растений / Под ред. А.И. Ермакова. Л.: Колос, 1972. 455 с.
- Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М.И. Прохорова. Л.: ЛГУ, 1982. 156 с.
- Физиология сосны обыкновенной / Судачкова Н.Е., Гирс Г.И. и др. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1990. 248 с.
- Судачкова Н.Е. Метаболизм хвойных и формирование древесины. Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1977. 230 с.