

Шевченко Н.Д., Шпирная И.А., Саляхова А.Ф., Цветков В.О.,
Марданшин И.С., Ибрагимов Р.И.

Башкирский государственный университет, г.Уфа

АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРОВ ЦЕЛЛЮЛАЗ, ПЕКТИНАЗ В КЛУБНЯХ И ЛИСТЯХ КАРТОФЕЛЯ

Одним из механизмов защиты растений от стрессовых воздействий является их способность подавлять активность гидролитических ферментов фитопатогенных организмов. Статья посвящена исследованию активности ингибиторов пектинолитических и целлюлолитических ферментов *Leptinotarsa decemlineata* из тканей картофеля. Установлено, что клубни и листья различных сортов и гибридов картофеля содержат ингибиторы, подавляющие активность гидролаз колорадского жука. Показатели активности ингибиторов целлюлаз и пектиназ в тканях растений могут служить в качестве критерия их устойчивости к фитофагам.

Ключевые слова: пектиназы, целлюлазы, ингибиторы гидролитических ферментов, колорадский жук, картофель.

Растения противостоят инфекциям и стрессовым воздействиям окружающей среды посредством проявления комплекса физиолого-биохимических реакций [1], важным составляющим которых является подавление активности гидролитических ферментов [2,3]. Ткани растений содержат соединения, способные ингибировать активность гидролаз патогенных микроорганизмов, насекомых, млекопитающих. Наибольшее число работ посвящено исследованию ингибиторов, подавляющих активность протеолитических ферментов [4, 5]. Сведения об ингибиторах, подавляющих активность других гидролаз пока в литературе малочисленны [2].

Целлюлазы (КФ 3.2.1.4 и 3.2.1.74) и пектиназы (КФ 3.1.1.11) участвуют в гидролизе материала клеточных стенок растений, уровень активности этих ферментов является важным фактором агрессивности и патогенности микроорганизмов и насекомых — фитофагов [6]. Соответственно, уровень антицеллюлазной активности растительных тканей может служить одним из важных показателей их устойчивости к фитофагам. В связи с этим, исследование относительной активности ферментов и их ингибиторов в системе «растение – насекомое» представляется актуальным и имеет научное и практическое значение.

В данной работе определяли активность ингибиторов из листьев, клубней и проростков картофеля различных сортов, подавляющих действие ферментов колорадского жука.

Материалы и методы

В работе были использованы клубни, листья, проростки картофеля сортов и гибридных

сортообразцов (Невский, Луговской, Удача, 4292-149, 4281-7, 9513). Клубни картофеля были выращены в ОПХ Башкирского НИИ сельского хозяйства РАСХН (г. Бирск).

Для получения растворов с ферментативной активностью, навеску имаго колорадского жука (1г) гомогенизировали в ступке и экстрагировали охлажденной дистиллированной водой (5 мл) в течение 1 ч. Центрифугировали в центрифуге МРW-310 (Польша) при 7000 об/мин, 10 мин. Для получения растворов с ингибиторной активностью, 1г растительной ткани экстрагировали в 5 мл охлажденной дистиллированной воды, осадок отделяли центрифугированием при 7000 об/мин, 10 мин.

Способность экстрактов тканей картофеля подавлять активность целлюлаз определяли по разнице значений активности фермента с водой (контроль) и фермента с ингибитором (растительный экстракт). Активность ингибиторов определяли в экстрактах без нагревания и прогретых при 60°С в течение 10 мин.

Измерение ферментативной и ингибиторной активности проводили методом гелевых пластин [7]. В качестве субстрата для целлюлаз использовали 1% раствор карбоксиметилцеллюлозы, для пектиназ - 1% раствор яблочного пектина. За 1 миллиединицу активности фермента (мЕ) принимали такое его количество, которое гидролизовало субстрат геля размером 1 мм². За 1 миллиингибиторную единицу активности (мИЕ) - количество ингибитора, необходимое для подавления 1 мЕ активности фермента в стандартных условиях (1ИЕ = 1000 мИЕ).

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлен результат измерения активности целлюлолитических ферментов, гидролизующих иммобилизованную в агарозный гель карбоксиметилцеллюлозу. Как видно, экстракты гомотената колорадского жука обладают высокой целлюлолитической активностью, сопоставимой с активностью коммерческого препарата целлюлазы (*Trichoderma reesei*) в концентрации 1 мг/мл.

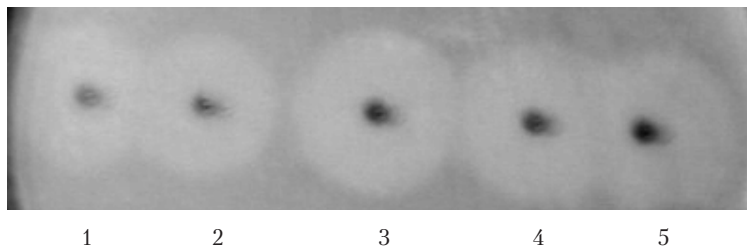


Рисунок 1. Гидролиз субстрата КМЦ, иммобилизованного в агарозный гель, ферментами колорадского жука и *Trichoderma reesei*; 1,2 – колорадский жук; 3,4,5- *T. reesei* (коммерческий препарат, 1 мг/мл)

В листьях исследованных сортов картофеля выявлена активность ингибиторов, подавляющих действие целлюлолитических и пектинолитических ферментов (табл.1). Уровень ингибиторной активности в листьях значительно различается в зависимости от сорта. Так, экстракты листьев гибрида 4281-7 обладают наибольшей антицеллюлазной активностью, причем практически в равной степени подавляют активность целлюлаз колорадского жука и *T. reesei*. В сортах Невский, Удача активность свободных ингибиторов целлюлаз в листьях не выявляется. Антицеллюлазная активность у этих сортов выявляется лишь после прогревания экстрактов. В любом случае, прогревание экстрактов при-

водит либо к появлению, либо к повышению активности целлюлитических ферментов. По-видимому, определенная часть молекул ингибиторов целлюлаз в растительных тканях находится в составе комплексов с термолабильными компонентами клетки.

Наши эксперименты показывают, что ткани картофеля не обладали целлюлолитической активностью. Ранее показано, что белковые ингибиторы протеолитических ферментов из растений обладают высокой термостабильностью, и могут быть выделены из комплекса с ферментом путем селективной денатурацией конформационно лабильных молекул фермента при нагревании экстрактов [4]. По нашим данным, растительные ингибиторы целлюлаз

Таблица 1. Активность ингибиторов целлюлаз и пектиназ (ИЕ/г сырой массы) в листьях различных сортов картофеля

Сорт картофеля	Ингибиторы целлюлаз				Ингибиторы пектиназ	
	<i>Trichoderma reesei</i>		Имаго <i>Leptinotarsa decemlineata</i>		имаго <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	
	1	2	1	2	1	2
Невский	0	11,8 ± 0,4 9,4 %	4,6 ± 0,9 3,9%	20,1 ± 0,7 17,0%	14,9 ± 0,8 19,0%	14,9 ± 0,8 19,0%
Удача	0	5,6 ± 0,6 4,4%	0	5,5 ± 0,8 4,2%	14,9 ± 0,6 19,0%	14,9 ± 0,7 19,0%
Луговской	2,3 ± 0,4 1,8%	14,8 ± 0,7 11,8%	2,8 ± 0,6 2,4%	19,7 ± 0,8 16,6%	21,8 ± 0,5 27,8%	14,9 ± 0,8 19,0%
4281-7	2,3 ± 0,3 1,8%	28,3 ± 1,2 22,6%	5,6 ± 0,5 4,7%	27,1 ± 0,6 23,1%	11,4 ± 0,6 14,4%	14,9 ± 0,8 19,0%
9513	0	5,6 ± 0,5 4,4%	-	-	18,4 ± 0,8 23,4%	3,9 ± 0,9 4,9%

Примечание: 1- экстракт без прогревания; 2-экстракт после прогревания при 60° С, 10 мин.

В процентах выражена доля подавления активности фермента.

Активность целлюлаз *T. reesei* - 125,2 Е/мг; активность целлюлаз *L. decemlineata* - 117,9 Е/г активность пектиназ *L. decemlineata* – 78,5 Е/г

Таблица 2. Активность ингибиторов целлюлаз (ИЕ/г сырой массы) колорадского жука в клубнях и проростках картофеля

Сорт	Проростки		Клубни	
	1	2	1	2
Невский	13,3± 0,5 13,3%	19,1±0,8 19,2%	9,3±0,4 9,3%	6,1± 0,8 6,1%
Удача	0	11,4 ± 0,5 11,4%	8,3±0,6 8,3%	13,5±0,7 13,5%
4281-7	0	10,6± 0,5 10,6%	11,8±0,4 11,8%	10,2±0,4 10,2%
4292-149	0	12,1± 0,4 12,1%	4,2±0,3 4,3%	13,3± 0,5 13,3%

1- экстракт без прогревания; 2-экстракт после прогревания при 60 °С, 10 мин.

Активность целлюлаз *L. decemlineata* - 117,9 Е/г.

В процентах выражена доля подавления активности фермента

и пектиназ также термостабильны и не теряют активности при прогревании экстрактов.

Интересно отметить, что прогревание экстрактов листьев картофеля не приводит к повышению активности ингибиторов пектиназ. Этот факт свидетельствует о том, что в листьях картофеля ингибиторы не способны образовывать комплексы с эндогенными пектиназами, хотя пектинолитическая активность в листьях картофеля присутствует.

Проростки и клубни картофеля также обладают антицеллюлазной активностью (табл.2). Как видно, ингибиторы в проростках находятся в связанном состоянии и их активность определяется только после прогревания экстрактов. В

клубнях картофеля определяется активность как свободных, так и связанных ингибиторов. Изученные образцы картофеля характеризуются значительными различиями по показателям активности свободных и связанных ингибиторов целлюлаз в проростках и клубнях.

Таким образом, в тканях картофеля нами выявлены водорастворимые соединения, способные подавлять активность целлюлолитических и пектинолитических ферментов *Leptinotarsa decemlineata* и *Trichoderma reesei*. Изученные сорта и гибриды картофеля имеют существенные различия по уровню антицеллюлазной и антипектиназной активности в клубнях и листьях.

Список использованной литературы:

1. Яруллина Л. Г., Ибрагимов Р.И. Клеточные механизмы формирования устойчивости растений к грибным патогенам.- Уфа:Гилем, 2006.-232с.
2. Валуева Т.А., Мосолов В.В. Роль ингибиторов протеолитических ферментов в защите растений //Успехи биологической химии.-2002.-Т.42.-С.193-216.
3. Дунаевский Я.Е., Цыбина Т.А., Белякова Г.А., Домаш В.И., Шарпио Т.П., Забрейко С.А., Белозерский М.А. Ингибиторы протеиназ как антистрессовые белки высших растений //Прикладная биохимия и микробиология.-2005.-т.41№4.-с.392-396.
4. Ибрагимов Р.И., Яруллина Л.Г., Ахметов Р.Р. Активность свободных и связанных ингибиторов протеиназ в проростках пшеницы при поражении корневой гнилью//Сельскохозяйственная биология.-2000.-№3.- С.89-92.
5. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Панина Я.С., Чаленко Г.И. Действие иммуномодуляторов на устойчивость и восприимчивость картофеля к *Phytophthora infestans* // Физиология растений.-2006.- т.53 №4.- С. 546-553.
6. Абдеев Р.М., Голденкова К.А., Мусийчук К.А., Пирузян Э.С. Свойства термостабильной целлюлазы CeIE *Clostridium thermocellum* // Биохимия. – 2001. – Т.66 №7.- С. 991 – 992.
7. Шевченко Н.Д., Шпирная И.А., Ибрагимов Р.И. Метод измерения пектиназ по гидролизу иммобилизованного субстрата//Аграрная Россия.- 2009.-С.133