

ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В РАСТЕНИЯХ, ВЫРАЩЕННЫХ ПРИ ВАРЬИРОВАНИИ КАЧЕСТВЕННЫХ И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТНОГО ПИТАНИЯ

*Были изучены изменения количественного и качественного состава свободных аминокислот в клетках водоросли *Chlorella vul.* и в проростках ячменя, выращенных при варьировании качественных и количественных показателей минерального азота. У клеток водоросли, выращенных в условиях азотного голодания, общее содержание свободных аминокислот примерно в три раза ниже, чем у культуры, росшей при избытке нитратного азота. В то же время общее содержание глутамина и глутаминовой кислоты не изменяется, а концентрации серосодержащих аминокислот различаются в десятки раз. В вытяжках из корней проростков ячменя содержание глутаминовой кислоты и глутамина у растений, росших на аммонийном азоте, заметно выше, чем у проростков, выращенных в условиях азотного голодания или на нитратном азоте.*

Азот, являясь составной частью белков, нуклеиновых кислот и ряда других физиологически значимых соединений, имеет первостепенное значение в жизни растений и всего органического мира. Растения, в отличие от животных, способны усваивать неорганические формы азота, синтезируя из них органические соединения. Способность корней растений к поглощению минеральных соединений азота и их транслокации в соответствии с потребностями организма – основа для эффективного развития и репродукции. Так, если при уменьшении количества доступных питательных веществ в почве или в результате воздействия факторов абиотического и биотического стресса ингибируется эта функ-

ция корней, растение переходит в состояние голода, что снижает его экологическую конкурентоспособность или сельскохозяйственную продуктивность.

Аммоний является предпочтительным источником азота для растения, так как в солях аммония азот находится в восстановленной форме, что в свою очередь снижает энергетические затраты растения на биосинтез органических соединений азота. Однако аммонийный азот не только поглощается растением из почвенного раствора, но и образуется в процессе фотодыхания или при распаде азотосодержащих соединений. Часть ионов аммония реассимилируется с участием глутаминсинтетазы, другая же часть ионов может выходить из клетки [1], в противном случае, при чрезмерном накоплении аммония, развивается реакция гипертоксичности, приводящая к гибели клетки [2]. Таким образом, растение должно обладать четкой системой регуляции транспорта ионов аммония. В настоящее время нет единой схемы, отражающей процесс регулирования активности транспортной системы ионов аммония (ТСА).

Так, ряд зарубежных авторов предполагают, что регуляция ТСА осуществляется на транскрипционном и посттрансляционном уровнях [3; 4; 5; 6]. Более того, изменение концентрации глутаминсинтетазы регулирует активность АМТ генов (гены, кодирующие белки-переносчики аммония) на транскрипционном уровне, а цитоплазматическая концентрация NH_4^+ на посттранскрипционном уровне. В ряде экспериментов было показано, что экспрессия NH_4^+ транспортеров зависит от азотного статуса корневой системы в большей степени, чем от азотного статуса всего растения [5; 6]. Посттрансляционная регуляция ТСА предполагает изменение активности белков-транспортеров путем фосфорилирования и дефосфорилирования С-концевой части белка [4; 5].

Иной механизм предполагает, с одной стороны, что активности ключевых ферментов метаболизма аммонийного азота – глутаминсинтетазы (ГС), глутаматсинтетазы (ГТС), и глутаматдегидрогеназы (ГДГ) регулируется цитоплазматической концентрацией глутамин и глутамата. С другой стороны, на процесс поглощения NH_4^+ влияют изменения в углеводном метаболизме, к примеру, изменение уровня сахарозы и органических кислот (2-кетоглутарата и малата). Так, для бактерий было показано, что концентрация глутамин и 2-кетоглутарата определяет фосфорилирование и дефосфорилирование регуляторного белка PII, который затем взаимодействует с другими регуляторными элементами, контролирующими синтез и активность ферментов азотного и углеводного метаболизма. Аналогичный механизм, возможно, характерен и для растений [3; 4; 7]. Таким образом, можно заключить, что в основном регуляторная роль активности ТСА отводится или самим аминокислотам и амидам, как продуктам первичной ассимиляции NH_4^+ или непосредственно ионам аммония. Однако ряд вопросов по функционированию ТСА остается открытым.

Так как синтез аминокислот – ключевой момент азотистого обмена растений, а растения, как автотрофные организмы, синтезируют значительное количество аминокислот, в том числе и не входящих в состав белковых молекул (непротеиногенные аминокислоты) в клетках растений находится значительное количество свободных аминокислот. Эти аминокислоты являются основой для биосинтеза других органических соединений. Кроме того, не исключается их роль в регуляции первичных процессов азотного обмена растений. Целью нашей работы было изучение качественного и количественного состава свободных аминокислот у растений, выращенных на разных источниках минерального азота, т.е. с активированной и инактивированной ТСА.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили двухнедельные проростки ячменя, а также культура одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris*.

Для выращивания проростков семени ячменя (сорт Бурштын) предварительно стерилизовали слабым раствором $KMnO_4$ и 3% раствором перекиси водорода в течение 10 мин. Затем семена помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную 0,3% раствором H_2O_2 , и проращивали двое суток в темноте при $24^\circ C$. Проросшие семена, культивировали рулонным методом две недели в водных культурах.

Культуру клеток хлореллы выращивали в течение двух недель на питательной среде Тамия при аэрировании воздухом, обогащенным CO_2 за счет прохождения через 0,1 моль/л раствор гидрокарбоната натрия. Световой режим поддерживался на постоянном уровне с помощью люминесцентных ламп (14 ч день; 10 ч ночь). По окончании культивирования водоросли собирали центрифугированием при 5000 г в течение 15 мин. После сбора культуру водоросли отмывали от питательной среды.

Выделение аминокислот из растительного материала проводили путем экстрагирования их горячим 70% этанолом. Корни проростков ячменя отделяли от растений и взвешивали. К навеске корней (3–5 г) добавляли 5 мл 70% кипящего этилового спирта, с последующим нагреванием на водяной бане 5 мин. После этого корни быстро растирали в фарфоровой ступке; спирт сливали, а к остаткам корней добавляли дополнительно по 5 мл горячего спирта вновь растирали. Остаток переносили в центрифужную пробирку, объединяя со спиртовым экстрактом, и центрифугировали 10 мин. при 7000 г. Спиртовую вытяжку сливали, а осадок дополнительно промывали спиртом, после чего спиртовые экстракты объединяли [8].

Полученные экстракты разделяли на две части, в одну из частей добавляли равный объем 10% трихлоруксусной кислоты (ТХУ), для осаждения белков. Белок осаждали центрифугированием при 7000 г в течение 15 мин.

Качественное и количественное определение аминокислот в этанольных экстрактах проводилось на основе хроматографического анализа в тонком слое пористого носителя (силикагеля), нанесенного на алюминиевую пластинку. Для анализа применялись стандартные хроматографические пластинки Сорбфил ПТСХ-АФ-В. Для более точного определения состава свободных аминокислот применялся метод двумерной хроматографии. В первом направлении в качестве элюента использовали смесь бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 4: 1: 5, причем при стоянии смеси происходит разделение водной и органической фаз; для хроматографирования брали только спиртовой слой, а водную фазу убирали [8]. Во втором направлении (перпендикулярно первому) – насыщенный раствор фенола. Идентификацию аминокислот осуществили по значению R_f пятен на хроматограмме, выявляемых нингидрином.

Определение количественного содержания конкретной аминокислоты производилось путем экстракции 75% этиловым спиртом участка хроматограммы, содержащего анализируемую аминокислоту. Количественное содержание аминокислоты в этом экстракте определялось колориметрически (колориметр "Ultraspec 100 pro", длина волны 540 нм) на основе реакции с нингидрином. Концентрации аминокислот устанавливались по калибровочным графикам, построенным с использованием стандартных растворов.

Кроме того, качественный и количественный состав свободных аминокислот проводился с помощью высокоэффективной хроматографии на жидкостном хроматографе "Hewlett Packard" (Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр гигиены").

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что в зависимости от условий культивирования клетки *Chlorella vul.* и проростки ячменя характеризуются активированной или

инактивированной ТСА [9]. Анализ состава свободных аминокислот показал, что в клетках хлореллы 3 суток находившихся в условиях азотного голодания суммарное количество свободных аминокислот примерно в 3 раза ниже, чем у свежесобранных клеток *Chlorella vul.* (Табл. 1).

Таблица 1

**Содержание свободных аминокислот
в клетках водоросли *Chlorella vulgaris***

Аминокислота	Содержание аминокислоты, мг/100 г сырой массы		Аминокислота	Содержание аминокислоты, мг/100 г сырой массы	
	Активированная ТСА	Инактивированная ТСА		Активированная ТСА	Инактивированная ТСА
Асп + Асн	91,8 ± 18,4	332,8 ± 66,6	Вал	96,2 ± 19,2	293,0 ± 58,6
Глю + Глн	337 ± 67,5	367,8 ± 73,6	Мет	18,3 ± 3,7	373,0 ± 74,6
Сер	73,9 ± 14,8	262,8 ± 52,6	Лей	49,4 ± 9,9	328,0 ± 65,6
Тре	42,6 ± 8,5	297,8 ± 59,6	Иле	59,8 ± 12,0	328,0 ± 65,6
Гли	31,4 ± 6,3	93,8 ± 18,8	Фен	178,4 ± 35,7	413,0 ± 82,6
Ала	232,7 ± 46,6	222,7 ± 44,5	Цис	53,8 ± 10,8	600,8 ± 120,2
Арг	105,8 ± 21,2	133,7 ± 26,7	Лиз	111,4 ± 22,3	365,5 ± 73,1
Про	189,5 ± 37,9	287,8 ± 57,6	Гис	110,6 ± 22,1	388,0 ± 77,6
Тир	116,7 ± 23,3	453,0 ± 90,6	Суммарное кол-во	1899,5 ± 379,9	5541,3 ± 1108,3

Следует отметить, что изменение содержания отдельных аминокислот в клетках водоросли происходило неравномерно, так концентрация валина, тирозина, лизина действительно снизилась втрое, а концентрация аланина, аргинина практически не изменилась. В то же время, у клеток с активированной ТСА количество серосодержащих аминокислот снизилось в десятки раз (количество метионина уменьшилось в 20 раз, а цистеина – примерно в 11 раз). Однако суммарное содержание глютаминовой кислоты и глютамина осталось примерно на том же уровне. Стоит отметить, что у клеток хлореллы, активно поглощающих ионы аммония, общая концентрация глютамина и глютаминовой кислоты превышала концентрацию любой другой аминокислоты.

Анализ результатов, представленных в табл. 1, позволяет предположить, что ключевым моментом инактивации ТСА является увеличение содержания цистеина и метионина. Кроме того, у клеток хлореллы, активно поглощающих ионы аммония, суммарное содержание аспарагиновой кислоты и аспарагина примерно в 3 раза меньше, чем у клеток, не поглощающих NH_4^+ . Накопление аспарагина происходит в процессе непосредственного связывания NH_3 и в процессе переаминирования глютамина и аспарагиновой кислоты. О влиянии амидов аспарагиновой и глютаминовой кислоты на активность ТСА упоминалось в ряде работ [3; 4; 6]. К сожалению применяемый для анализа метод не позволял разделить соответствующие аминокислоты и их амиды. Вероятно, цитоплазматическая концентрация аспарагина так же влияет на активность ТСА.

Ранее нами было показано, что у проростков ячменя, выращенных на нитратном азоте и в условиях азотного голодания система транспорта ионов аммония активированная. Для растений, росших на аммонийном азоте, характерна инактивированная ТСА [8]. Как и у клеток хлореллы, состав свободных аминокислот в вытяжке из корней проростков ячменя с активированной и инактивированной ТСА заметно различался по количественному и качественному содержанию (Табл. 2). Однако в отличие от *Chlorella vul.* у корней проростков ячменя росших в условиях азотного голодания концентрация аспарагиновой кислоты

как минимум в десять раз выше, чем в варианте, где ячмень рос на аммонийном азоте. Хотя в целом содержание свободных аминокислот (в том числе и глутаминовой) у растений, выращиваемых в условиях азотного голодания ниже (см. табл. 2).

Таблица 2

**Значения концентраций свободных аминокислот
в корнях проростков ячменя, выращенных на разных источниках азота**

Аминокислота	Концентрация свободных аминокислот, мг/100г сырой массы		
	Вытяжка из корней растений, растущих на нитратном азоте	Вытяжка из корней растений, растущих на аммонийном азоте	Вытяжка из корней растений, растущих в условиях азотного голодания
Глю	2,86 ± 0,3	28,6 ± 0,36	0,86 ± 0,07
Глн	0,74 ± 0,05	10,36 ± 0,85	0,74 ± 0,05
Асп	5,32 ± 0,4	0,13 ± 0,02	0,93 ± 0,08
Про	2,22 ± 0,32	11,10 ± 0,9	-
Сер	-	0,89 ± 0,07	-
Тре	-	1,07 ± 0,09	-
Ала	-	-	0,02 ± 0,001

Указанный факт, вероятно, связан с особенностями биохимических превращений соединений азота у высших растений. Возможно, содержание глутаминовой кислоты и глутамина является фактором, ответственным за активность ТСА в корнях проростков ячменя. Следует отметить, что содержание глутамин в растениях с активированной транспортной системой как у проростков, выращенных на нитратном азоте, так и в условиях азотного голодания одинаково и составляет $5 \cdot 10^{-8}$ моль/г сырой массы, что более чем в 10 раз ниже, чем у растений с инактивированной ТСА. Известно, что практически весь поглощаемый аммонийный азот, прежде всего, ассимилируется в корневой системе, а затем поступает в надземные части растения в виде аминокислот и главным образом их амидов. По мнению ряда исследователей (например, в [3; 5]), соотношение содержания глутамин и аспарагина к глутаминовой и аспарагиновой кислотам в цитоплазме является фактором, определяющим азотный статус локальной корневой системы, и тем самым, регулирует поглощение NH_4^+ .

Отмечаемые различия в концентрациях и составе свободных аминокислот у хлореллы и проростков ячменя отражают как особенности внутриклеточного азотного метаболизма у высших и низших растений, так и факт наличия дальнего транспорта соединений азота у высших растений. В этом случае более половины азота, транспортируемого из корней, находится в форме амидов. Таким образом, глутаминовой кислоте и глутамину отводится особая роль в азотном метаболизме.

Обмен глутаминовой кислоты и глутамин вероятно, является определяющим фактором в процессах регуляции ТСА. И хотя нами обнаружено значительное изменение содержания метионина и цистеина при инактивации ТСА у клеток хлореллы, это явление вполне может быть связано с метаболизмом глутаминовой кислоты. Накопление цистеина может происходить в результате ряда реакций, вовлекающих биосинтез и распад глутатиона, метаболизм которого непосредственно связан с глутаминовым обменом. Образовавшийся цистеин может непосредственно включаться и в биосинтез метионина [10] (рис. 1).

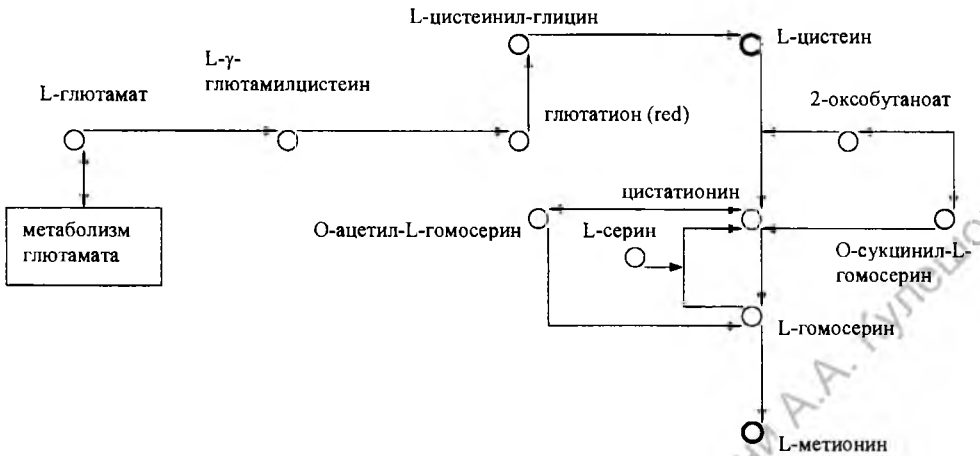


Рис. 1. Схема частичного биосинтеза аминокислот (L-цистеина, L-метионина)

Заключение

Полученные экспериментальные данные о содержании свободных аминокислот в проростках ячменя явно указывают на различия в концентрациях глютаминовой кислоты и ее амида у растений с активированной и инактивированной ТСА. Для клеток хлореллы изменения в содержании указанных соединений не столь значительны. В то же время, очевидно, что и в этом случае отмечаются изменения в метаболизме глютаминовой кислоты и ее амида в процессах активации и инактивации ТСА, на что указывают значительные изменения концентраций серосодержащих аминокислот. Наши результаты согласуются с общепринятой точкой зрения по этому вопросу, однако, для выяснения, какие именно продукты первичной ассимиляции аммонийного азота являются регуляторами ТСА, следует провести более детальные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ammonium uptake by rice roots / M. Wang [et al.] // *Plant physiology*. – 1993. – Vol. 103. – № 3. – P. 1249-1258.
2. Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants / D. Bittito [et al.] // *Pnas*. – 2001. – Vol. 98. – № 7. – P. 4255-4258.
3. **Persson, J.** Regulation of amino acid uptake by carbon and nitrogen in *Pinus sylvestris* / J. Persson, T. Nasholm // *Planta*. – 2003. – Vol. 217. – P. 309-315.
4. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition / A. Miller [et al.] // *J. of Experimental Botany*. – 2007. – Vol. 58. – № 10. – P. 1-9.
5. **Loque, D.** Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots / D. Loque, N. Wiren // *J. of Experimental Botany*. – 2004. – Vol. 55. – № 401. – P. 1293-1305.
6. **Tabuchi, M.** Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.) / M. Tabuchi, T. Abiko, T. Yamaya // *J. of Experimental Botany*. – 2007. – Vol. 64. – № 9. – P. 2319-2327.
7. **Moorhead G.** Interpreting the Plastid Carbon, Nitrogen, and Energy Status. A Role for PII? / G. B.G. Moorhead, C.S. Smith // *Plant Physiology*. – 2003. – Vol. 133. – № 14. – P. 492-498.
8. **Rhodes, D.** Analytical Methods Amino Acid and Onium Compound Extraction / D. Rhodes, B. Wood // Department of Horticulture & Landscape Architecture [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort640c/methods/me00001.htm>. – Data of access: 10.07. 2006.

9. *Цап, Т.В.* Поступление ионов аммония внутрь растительных клеток / Т.В. Цап, А.П. Кудряшов // Вестник МГУП. – 2007(3). – № 2. – С. 117-123.
10. Pathway maps // Kegg pathway database [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway.html>. – Data of access: 14.10. 2007.

Поступила в редакцию 14.03.2008 г.