

ORIGINAL ARTICLE

**NITRATE REDUCTASE ACTIVITY DURING HEAT SHOCK IN WINTER
WHEAT**

Klimenko S.B., Peshkova A.A., Dorofeev N.V

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SD RAS, Irkutsk, Russia

Phone: (3952)424659 Fax: (3952)510754

E-mail: dorofeev@sifibr.irk.ru

Received 18 January 2006 r.

Abstract - Nitrates are the basic source of nitrogen for the majority of plants. Absorption and transformation of nitrates in plants are determined by external conditions and, first of all, temperature and light intensity. The influence of the temperature increasing till +40 °C on activity of nitrate reductase was studied. It is shown, that the rise of temperature was accompanied by sharp decrease of activity nitrate reductase in leaves of winter wheat, what, apparently, occurred for the account deactivations of enzyme and due to its dissociation.

Key words: nitrate reductase/temperature/winter wheat

ORIGINAL ARTICLE

АКТИВНОСТЬ НИТРАТРЕДУКТАЗЫ У ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ТЕПЛОВОМ ШОКЕ**Клименко С.Б., Пешкова А.А., Дорофеев Н.В.***Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033 Иркутск, а/я1243, ул. Лермонтова,132, Россия**E-mail: dorofeev@sifibr.irk.ru*

Поступила в редакцию 18 января 2006 г.

Нитраты являются основным источником азота для большинства растений. Поглощение и превращение нитратов в растениях во многом определяются внешними условиями и в первую очередь, температурой и освещённостью. Изучали влияние повышенной температуры (+40 °С) на активность нитратредуктазы ключевого фермента метаболизма нитратов в клетке. Показано, что повышение температуры сопровождалось резким снижением активности нитратредуктазы в листьях озимой пшеницы, это происходило как за счёт фосфорилирования и дезактивации фермента, так и за счёт его распада.

Ключевые слова: нитратредуктаза/температура/озимая пшеница

В почве азот представлен в основном нитратами, которые являются основным источником азотного питания растений. Усваивать атмосферный азот за счёт симбиоза с азотфиксирующими бактериями могут только некоторые виды, в основном относящиеся к семейству бобовых. Поглощенные нитраты могут включаться в метаболизм растений только после восстановления их до аммиака

Первым ферментом цепи восстановления нитратов является нитратредуктаза. У высших растений нитратредуктаза представляет собой димер, каждая субъединица которого (около 100 кДа) состоит из трех доменов (Campbell, 2001). Нитратредуктаза катализирует перенос двух электронов от НАД(Ф)Н к нитрату с образованием нитрита.

Нитратредуктаза - субстратиндуцируемый фермент, т.е. активность в органах растений зависит от наличия нитратов. Экспрессия генов нитратредуктазы контролируется наряду с нитратами и другими факторами – свет, сахара и др. (Cheng et al., 1992; Foyer et al., 1994).

Большой интерес к регулированию активности нитратредуктазы объясняется несколькими причинами. Нитратредуктаза расположена на входе редукции нитратов и является лимитирующим ферментом включения нитратного азота в метаболизм растения во многом определяя скорость всего процесса восстановления. В свою очередь усвоение нитратов оказывает влияние на рост и продуктивность растений. Первичный продукт нитратной редукции – нитриты являются потенциально токсичными веществами для

растительной клетки. Кроме того, нитратредуктаза может участвовать в образовании оксида азота (NO) (Dean, Harper, 1988; Yamasaki, Sakihama, 2000) который является компонентом сигнальной системы для связи между отдельными клетками и растениями.

Нитратредуктаза регулируется на различных уровнях. Первый уровень это экспрессия соответствующих генов, что позволяет регулировать уровень нитратредуктазного белка в клетке. Второй уровень это регуляция активности фермента в клетке за счёт обратимого фосфорилирования, посттрансляционная регуляция нитратредуктазы позволяет очень быстро изменять активность фермента в клетке (Kaiser et al., 1999).

Регуляция нитратредуктазы на посттрансляционном уровне осуществляется за счёт фосфорилирования на консервативном сериновом остатке. В присутствии катионов магния (Mg^{2+}) фосфорилированная форма НР взаимодействует с 14-3-3 протеином и инактивируется (Kaiser et al., 1999).

Большое значение в регуляции активности нитратредуктазы на посттрансляционном уровне играют такие факторы как доступность нитратов для растений, аноксия, солевой стресс и т.д. (Kenjebaeva, Rakova, 1995; Garg et al., 2001; Stoimenova et al., 2003).

Действие различных стресс-факторов на регуляцию нитратредуктазной активности на посттрансляционном уровне в настоящее время привлекает внимание многих исследователей (Jones et al., 1998; Kaiser, Huber, 2001; Tucker, Ort, 2002). Однако, вопрос влияния температурных

условий на процессы пострасляционной регуляции нитратредуктазы изучен недостаточно. Существуют отдельные сведения о влиянии низких температур на процессы фосфорилирования фермента и образование комплекса НР с 14-3-3 протеином (Tucker, Ort, 2002; Yaneva et al., 2002).

Настоящее сообщение посвящено изучению влияния повышения температуры на соотношение активной и общей нитратредуктазы в листьях растений озимой пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Иркутская озимая до начала эксперимента выращивали в водной культуре на полной питательной смеси Кнопа. Продолжительность светового и темнового периодов 12 часов, температура 20 ± 2 °C и освещённости 5000 лк.

В опытах использовали растения в возрасте семи суток, считая от закладки семян на проращивание. К этому моменту растения озимой пшеницы находились в фазе полностью развёрнутого первого листа, начало появления второго.

В экспериментах с повышенными температурами через 60 минут после начала светового периода в камере с растениями осуществляли подъем температуры с 20 ± 2 °C до 40 ± 2 °C. Пробы для анализа фермента отбирали через определённые промежутки времени.

Нитратредуктазу экстрагировали из свежих листьев в буфер pH 7,6, содержащий 50 мМ НЕРЕС-КОН, 1мМ ЭДТА, 1% казеина и меркаптоэтанол 0,001М. Навески незамороженного растительного материала тщательно растирали, соотношение ткани и буфера было 1:3, суспензию центрифугировали 15 мин в охлажденной центрифуге при 15 000g. Надосадочную жидкость использовали для оценки активности нитратредуктазы. Общую активность фермента (НРобщ) определяли с буфером НЕРЕС-КОН pH 7,6, содержащий 5мМ ЭДТА, а для активной формы (НРакт) вместо ЭДТА добавляли 10 мМ MgCl₂.

Активность фермента оценивали по скорости накопления нитритов. Реакционная смесь содержала 0,5 мл соответствующего буфера 0,1 мл 0,1 М KNO₃ и 0,1 мл экстракта. В качестве донора электронов приливали 0,1 мл 0,005 М НАДН₂, в контроль вместо него добавляли воду. Смесь инкубировали 5 мин при 30 °C, реакцию останавливали добавлением 0,1 мл 0,005 М щавелевоуксусной кислоты. Через 2 - 3 мин для окрашивания образовавшихся нитритов приливали 0,5 мл 1%-ного сульфаниламида в 1 N HCl и 0,5 мл 0,02%-ного нафтилэтилендиаминдигидрохлорида. Через 10 мин окрашенные пробы центрифугировали при 4 тыс. g 10 мин и в супернатанте измеряли

оптическую плотность при 546 нм на Speco1-20 ("Karl Zeiss" Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследования изучали изменение общей (НРобщ) и активной (НРакт) форм нитратредуктазы после начала светового периода с шагом наблюдений 2 часа. Как следует из полученных результатов (табл. 1) активность обеих форм нитратредуктазы значительно возрастала через два часа наблюдений. Через 4 часа после начала освещения доля активной формы фермента составляла 70% от общей активности нитратредуктазы.

В экспериментах с более короткими промежутками наблюдений (40 мин) было показано, что уже спустя 40 минут после начала освещения общая активность фермента в листьях озимой пшеницы возрастала в 1,76 раз, а активная форма увеличивалась в 2,1 раза по сравнению с темновой точкой. Через 80 мин величина активности обеих форм фермента стабилизировалась и мало изменялась на протяжении последующих 80 минут.

После наступления темнового периода отмечали значительный спад активности как общей, так и активной формы нитратредуктазы (табл. 2).

Уже через сорок минут активная форма снижалась на 40%, а общая только на 23%. В последующие 40 минут активность нитратредуктазы снижалась значительно медленнее, через 80 минут темноты активность обеих форм фермента снизилась только на 14 и 6 % соответственно. После резкого падения активности нитратредуктазы в начале темного периода, в дальнейшем на протяжении 12 часов темноты не отмечали изменения активности фермента. В конце этого периода активная форма нитратредуктазы составляла 40-41% от общей активности фермента.

Тепловой стресс (+40 °C) уже через 20 мин приводил к резкому снижению активности обеих форм нитратредуктазы (табл. 3).

Через 60 минут после начала воздействия повышенной температуры отмечали стабилизацию активности фермента, а к 100 минутам наблюдений небольшое повышение активности.

Отмена теплового воздействия и возврат растений в температуру 20 °C активность нитратредуктазы НРобщ и НРакт восстанавливалась до прежних значений уже через 40 минут.

ОБСУЖДЕНИЕ

У пшеницы основным местом восстановления нитратного азота является надземная часть. Так в растениях пшеницы в фазе кушения 75-97% от общей активности

Таблица 1. Изменения активности нитратредуктазы (нмоль в мин/г сырого веса) в зависимости от продолжительности освещения

Продолжительность освещения, час	НРобщ	НРакт	% НРакт от НРобщ
0	285,8±53,8	130,2±16,3	46,6
2	411,1±44,4	267,9±28,5	65,2
4	420,6±41,2	291,6±18,3	70,0
6	463,7±46,2	291,1±24,7	63,0
8	398,7±27,4	251,5±23,2	62,9

Таблица 2. Изменения активности нитратредуктазы (нмоль в мин/г сырого веса) в зависимости от продолжительности темного периода

Продолжительность темного периода, мин	НРобщ	НРакт	% НРакт от НРобщ
0	502,7±15,3	293,5±11,5	58,4
40	387,0±8,6	172,6±7,0	44,6
80	353,4±8,0	158,5±7,2	44,8
120	341,1±6,3	141,9±7,5	41,5
160	323,4±9,6	131,9±2,7	40,9
200	314,6±15,3	142,8±8,8	45,3
280	315,3±4,0	137,4±1,9	43,6

Таблица 3. Снижение активности нитратредуктазы (нмоль в мин/г сырого веса) в листьях озимой пшеницы при температуре + 40 °С

Условия эксперимента	Время мин	НРобщ	НРакт	% НРакт от НРобщ
Темнота 12 часов t = 20 °С	0 норма	258±20	108±9	42
60 мин свет t = 20 °С	60 норма	466±29	252±14	54
100 мин свет 20 мин t = 40 °С	20 стресс	353±15	148±8	42
140 мин свет 60 мин t = 40 °С	60 стресс	370±40	153±28	44
180 мин свет 100 мин t = 40 °С	100 стресс	415±4	174±9	46
220 мин свет 40 мин t = 20 °С	40 норма	452±28	235±14	52
220 мин свет 80 мин t = 20 °С	80 норма	451±10	239±4	53

нитратредуктазы приходится на листья (Wallace, 1986; Пешкова, 1992).

Активность нитратредуктазы в листьях озимой пшеницы изменялась в зависимости от продолжительности освещения после темноты. Спустя 2 часа после начала светового периода общая активность нитратредуктазы в листьях озимой пшеницы возрастала более чем в 1,5 раза. Освещение оказывало влияние не только на повышение общей активности фермента, но и на

изменение соотношения между фосфорилированной и свободной формами нитратредуктазы. Так активность нефосфорилированной нитратредуктазы через 2 часа после освещения возрастала вдвое. В результате этого доля активной формы фермента возрастала с 46,6% (конец темного периода) до 70% (4 часа после начала освещения).

Изменение доли активной формы нитратредуктазы от общей активности фермента в листьях в цикле свет-темнота определяется как

внешними условиями, так и видовой принадлежностью растений. Так у ячменя активная форма нитратредуктазы спустя 2 часа после начала освещения составляет 73% от общей активности нитратредуктазы, а спустя 2 часа темноты 56%, у шпината 88 и 35% соответственно (Kandlbinder et al., 2000).

Известно, что регуляция активности НР у растений на пострасветном уровне осуществляется за короткий промежуток времени – 5-10 минут (Kaiser et al., 1999).

Анализ данных полученных в эксперименте с более короткими промежутками времени (40 минут) показал, что общая активность (НР_{общ}) фермента в листьях озимой пшеницы и активная форма (НР_{акт}) возрастали уже спустя 40 минут после начала освещения. При этом активность НР_{акт} увеличивалась гораздо быстрее, чем НР_{общ}. Соотношение между активной формой и общей стабилизировалось уже спустя 40 минут и в дальнейшем оставалось практически постоянным. Тем не менее, активность обеих форм фермента продолжала увеличиваться.

Из вышесказанного следует, что основные изменения в активности фермента с началом освещения происходят за короткий промежуток времени не более 40 минут. Начало светового периода связано с более быстрым возрастанием активной формы нитратредуктазы НР_{акт}, это позволяет предположить, что происходит дефосфорилирование и восстановление активности фермента. В дальнейшем на протяжении светового периода также отмечали колебания активности нитратредуктазы, но в гораздо меньшей степени.

Как активность нитратредуктазы в целом, так и соотношение между НР_{общ} и НР_{акт} в начале темного периода было практически зеркальным отражением этого процесса при перемещении растений из темноты на свет (табл. 1 и 2).

Вероятно, при переходе растений от темноты к свету и наоборот изменения в активности фермента происходят как за счёт реакции фосфорилирования-дефосфорилирования, о чём указывает изменение доли активной нитратредуктазы от общей, так и за счёт синтеза-распада фермента, о чём можно косвенно судить по возрастанию или падению общей активности нитратредуктазы (НР_{общ}). Поскольку изменение общей активности нитратредуктазы имеет схожий профиль с изменением содержания нитратредуктазного белка в клетке (Tucker et al., 2004).

Полученные результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими о быстрой реакции синтеза - распада фермента в ответ на изменение условий освещения растений (Брей, 1986; Измайлов, 1986).

Как известно, высокая температура значительно сказывается на метаболических

процессах в растениях. Так повышение температуры в дневные часы до 40 °С приводит к резкому снижению интенсивности фотосинтеза у пшеницы (Law, Crafts-Brandner, 1999). Поскольку нитратредуктаза тесным образом связана с процессом фотосинтеза (донор электронов, источник углеродных скелетов и др.), следовало ожидать изменение скорости восстановления нитратов под действием высоких температур.

Растения озимой пшеницы, помещённые в условия температурного стресса (+40 °С), после периода световой индукции нитратредуктазы резко снижали активность обеих форм фермента (табл. 3.). Наиболее интенсивно шло падение активной формы нитратредуктазы. При этих условиях процент активной формы нитратредуктазы от общей её активности уже за 20 минут теплового шока снижался практически до уровня активности фермента после 12 часового периода темноты. В данном случае активная часть фермента составляла 42-44% от общей активности нитратредуктазы. Увеличение продолжительности теплового воздействия свыше 20 минут не приводило к изменению активности обеих форм нитратредуктазы при условии, что растения оставались на свету. Возможно, это является свидетельством адаптации нитратвосстанавливающего комплекса к повышенной температуре.

Таким образом, тепловое воздействие (+40 °С) на растения озимой пшеницы сопровождается резким снижением как общей активности фермента (НР_{общ}) так и активной его формы (НР_{акт}). После снятия теплового воздействия в условиях освещённости активность нитратредуктазы в растениях озимой пшеницы способна к быстрому восстановлению.

Проведённые эксперименты позволяют сделать вывод о том, что смена температурных условий выращивания приводит к значительным изменениям активности нитратредуктазы в листьях озимой пшеницы. Такое изменение в условиях кратковременных экспериментов носит обратимый характер.

ЛИТЕРАТУРА

- Брей С.М. (1986) Азотный обмен в растениях. М.: Агропромиздат, 199 с.
- Измайлов С.Ф. (1986) Азотный обмен в растениях. М.: Наука, 319 с.
- Пешкова А.А. (1992) Формирование нитратвосстанавливающей системы в органах проростков озимой и яровой пшеницы // Физиология растений, **39**, 111-118.
- Campbell W.H. (2001) Structure and function of eukaryotic NAD(P)H:nitrate reductase // CMLS, Cell. Mol. Life Sci., **58**, 194-204.
- Cheng C.L., Acedo G.N., Cristinsin M., Conkling M.A. (1992) Sucrose mimics the light

- induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89(5)**, 1861-1864.
- Dean J.V., Harper J.E. (1988) The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean // *Plant Physiology*, **88**, 389-395.
- Foyer C.H., Lescure J.C., Lefebvre C., Morot-Gaudry J.F., Vincentz M., Vaucheret H. (1994) Adaptations of Photosynthetic Electron Transport, Carbon Assimilation, and Carbon Partitioning in Transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* Plants to Changes in Nitrate Reductase Activity // *Plant Physiology*, **104**, 171-178.
- Garg B.K., Kathju S., Burman U. (2001) Influence of water stress on water relations, photosynthetic parameters and nitrogen metabolism of moth bean genotypes // *Biologia Plantarum*, **44(20)**, 289-292.
- Jones T.L., Tucker D.E., Ort D.R. (1998) Chilling Delays Circadian Pattern of Sucrose Phosphate Synthase and Nitrate Reductase Activity in Tomato // *Plant Physiol.*, **118**, 149-158.
- Kaiser W.M., Weiner H., Huber S.C. (1999) Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity // *Physiologia Plantarum.*, **105**, 385-390.
- Kaiser W.M., Huber S.C. (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers // *J. Exp. Bot.*, **52**, 1981-1989.
- Kandlbinder A., Weiner H., Kaiser W.M. (2000) Nitrate reductases from leaves of *Ricinus* (*Ricinus communis* L.) and spinach (*Spinacia oleracea* L.) have different regulatory properties // *Journal of Experimental Botany*, **51(347)**, 1099-1105.
- Kenjebaeva S., Rakova N. (1995) Multiple forms of nitrate reductase and their role in nitrate assimilation in roots of wheat at low temperature or high salinity // *Physiologia Plantarum*, **93**, 249-252.
- Law R.D., Crafts-Brandner S.J. (1999) Inhibition and acclimation of photosynthesis to heat stress is closely correlated with activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase // *Plant Physiology*, **120**, 173-181.
- Stoimenova M., Lidourel I.G.L., Ratcliffe R.G., Kaiser W.M. (2003) The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots II. Anoxic metabolism of tobacco roots with or without nitrate reductase activity // *Plant and Soil*, **253**, 155-167.
- Tucker D.E., Ort D.R. (2002) Low temperature induces expression of nitrate reductase in tomato that temporarily overrides circadian regulation of activity // *Photosynthesis Research*, **72**, 285-293.
- Tucker D.E., Allen D.J., Ort D.R. (2004) Control of nitrate reductase by circadian and diurnal rhythms in tomato // *Planta*, **219**, 277-285.
- Wallace W. (1986) Distribution of nitrate assimilation between the root and shoot of legumes and a comparison with wheat // *Physiologia Plantarum*, **66**, 630-636.
- Yamasaki H., Sakihama Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species // *FEBS Letters*, **468**, 89-92.
- Yaneva I.A., Hoffmann G.W., Tischner R. (2002) Nitrate reductase from winter wheat leaves is activated at low temperature via protein dephosphorylation // *Physiologia Plantarum*, **114**, 65-72.