

БИОЛОГИЯ

УДК 581.1

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ НА РАННИХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА ЗЕЛЁНЫХ И ЭТИОЛИРОВАННЫХ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM L.*

© 2009 г.

Л.Н. Олюнина, М.В. Томилин, А.П. Веселов

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

Aleksandrova@bio.unn.ru

Поступила в редакцию 17.02.2009

Исследовано влияние света на активность цитоплазматической (растворимой) и ионсвязанной с клеточной стенкой фракции пероксидазы (ПО) у 4–8-дневных проростков пшеницы. Обнаружены онтогенетические изменения в динамике внутри- и внеклеточных ПО и светозависимый сдвиг в сторону ионсвязанной фракции. Высказывается предположение, что это форма ПО наиболее тесно связана с модифицирующим влиянием света на ростовую активность проростков пшеницы.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, рост, пероксидаза, светозависимость.

Введение

Пероксидаза (ПО) – один из важнейших ферментов «двойного назначения», вовлечённый как в систему генерации, так и утилизации активных форм кислорода. Её полифункциональность позволяет растительным организмам реагировать на большинство эндогенных факторов, которые изменяются в ходе онтогенеза растений, а также под влиянием стрессоров. Участие этого фермента в защитных реакциях продолжает привлекать особое внимание исследователей, поскольку показано, что повышение общей активности ПО и её отдельных изоформ коррелирует с устойчивостью растений [1, 2]. Ранее в наших экспериментах [3] было выявлено, что присущие растительным организмам защитные реакции, возникающие в ответ на экстремальные воздействия, светозависимы. Не исключено, что механизм светового контроля устойчивости растений осуществляется с участием ПО. Цель настоящей работы – выяснить влияние света на изменение активности данного фермента на ранних стадиях роста проростков пшеницы.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили растения яровой пшеницы сорта Московская 35 (водная культура). Эксперименты проводили с 4–8-днев-

ными этиолированными (выращенными в темноте) и зелеными (14-часовой световой день) проростками.

В ходе опытов регулярно (с интервалом 1 сутки) регистрировали изменение биомассы проростков. В те же временные интервалы оценивали пероксидазную активность. Экстракцию и определение активности ПО осуществляли по следующей методике. Навеску растительного материала (корни или побеги) фиксировали жидким азотом и затем гомогенизировали в фосфатном буфере (рН 8.0), содержащем 0.1% цистеина. Отношение массы навески к объёму фосфатного буфера – 1:4. Гомогенат центрифугировали при 7000 об./мин в течение 15 мин. Из полученного супернатанта (супернатант 1) отбирали аликвоты для определения активности растворимой (цитоплазматической) фракции ПО. Для экстракции ионсвязанной с клеточной стенкой ПО осадок, после промывания средой выделения, суспендировали в 1 М растворе NaCl; затем снова центрифугировали 10 мин при 7000 об./мин (супернатант 2).

В полученных экстрактах сразу после выделения определяли белок по методу Lowry et al. [4], ПО-активность – спектрофотометрическим методом [5]. В качестве субстрата использовали 3,3-диаминобензидин. В кювету вносили: 0.5 мл 0.005 М раствора бензидина, 0.25 мл аликвоты фермента и 2 мл Na-ацетатного буфера (рН 5.4); реакцию инициировали введением 0.25 мл

0.015% раствора H_2O_2 . Нарастание оптической плотности регистрировали при 590 нм через 20 с – в момент линейного изменения скорости реакции. Измерения проводили на спектрофотометре марки СФ-46 (ЛОМО, Россия). Удельную активность исследуемых фракций ПО рассчитывали по увеличению адсорбции за 1 мин на мг белка. Опыты проводили как минимум в трёх биологических повторностях. На рисунках представлены средние арифметические значения и их среднеквадратичные отклонения.

Результаты и их обсуждение

Проведённые исследования показали (рис. 1), что корни четырёх–восьмидневных проростков пшеницы по сравнению с побегами имели повышенный уровень пероксидазной активности. Последнее характерно как для цитоплазматической (растворимой), так и для ионсвязанной с клеточной стенкой фракции фермента. При этом в корнях четырёхдневных проростков, выращенных в темноте, доля растворимой ПО от суммарной активности обеих фракций составляла 87.76% (рис. 2а). С возрастом происходило перераспределение активности в пользу ионсвязанной фракции, и, соответственно, максимальная пероксидазная активность, ассоциированная с клеточной стенкой, отмечена у корней шестидневных этиолированных проростков пшеницы; затем активность резко снижалась (рис. 1, 2а).

Свет (14-часовой фотопериод) индуцировал повышение пероксидазной активности в корнях проростков пшеницы. Выявлена большая чувствительность к действию света ионсвязанной с клеточной стенкой фракции ПО. Уже на стадии пятидневных проростков разница в активности ионсвязанной фракции между зелёными и этиолированными проростками составляла 22.2% (рис. 2а). Таким образом, свет ускорял нарастание активности данной фракции ПО и усиливал сдвиг отношения пероксидазная активность корни/побеги с 3.96 (этиолированные проростки) до 7.47 (зелёные проростки пшеницы). В целом, временной профиль изменения активности ПО в корнях зелёных и этиолированных проростков пшеницы (рис. 1) был сходным, что, несомненно, служит отражением связи между активностью фермента и динамикой ростовой реакции.

В побегах четырёхдневных проростков пшеницы «темнового» варианта соотношение цитоплазматической и ионсвязанной активности было сдвинуто в сторону ионсвязанной фракции ПО (рис. 1, 2а) Это первое, что отличает пероксидазную активность побегов от корней. Кроме

того, возрастная динамика сопровождается не увеличением, а уменьшением доли ионсвязанной фракции фермента. У четырёхдневных этиолированных проростков в сумме обеих фракций активность ионсвязанной составляла 60.47%, у шестидневных – 33.26% (рис. 2а). Свет снижал суммарную пероксидазную активность в тканях побега. Как следует из данных, представленных на рис. 1, максимальный светоингибирующий эффект характерен для шестидневных проростков и обусловлен более выраженным снижением активности ПО растворимой фракции. В частности, отмечено пятикратное уменьшение активности в составе данной фракции и двукратное снижение под действием света активности фермента во фракции, связанной с клеточной стенкой (рис. 1).

В последние годы активно развивается представление об участии пероксидаз в регуляции роста. В наших исследованиях скорость нарастания биомассы у побегов пяти- и восьмидневных проростков пшеницы в «световом» варианте составляла 16.2 и 5.9 мг в сутки; у этиолированных проростков, соответственно – 6.1 и 10.3 мг на растение в сутки (рис. 2б). Как следует из представленных выше результатов, через восемь дней после замачивания семян у зелёных проростков происходило замедление, у этиолированных – увеличение нарастания биомассы. Аналогично, свет вызывал активацию роста корней на начальных этапах и более быстрый переход к замедлению ростовой активности. В целом, динамика роста корней носила сложный характер: зафиксировано снижение и последующее возобновление увеличения биомассы – скорее всего, за счёт образования придаточных корней, т. к. увеличения их длины не было выявлено (данные не приводятся). На ингибирующую роль света в отношении роста ряда сельскохозяйственных культур указывается в публикации Z.H. Liu et al. [6]. Следует отметить, что низкая скорость роста у облучённых красным светом проростков кукурузы в опытах этих авторов коррелировала с увеличением пероксидазной активности.

Сопоставление динамики роста и изменения процентного соотношения растворимая – ионсвязанная ПО в наших экспериментах (рис. 2а, б) позволило выявить, что активный рост проростков пшеницы совпадал с увеличением доли цитоплазматической ПО в сумме пероксидазной активности обеих фракций. С замедлением роста, напротив, имел место сдвиг активности в сторону ионсвязанной ПО, что соответствует, по видимому, изменениям, происходящим в структуре клеточной стенки. Известно, что именно

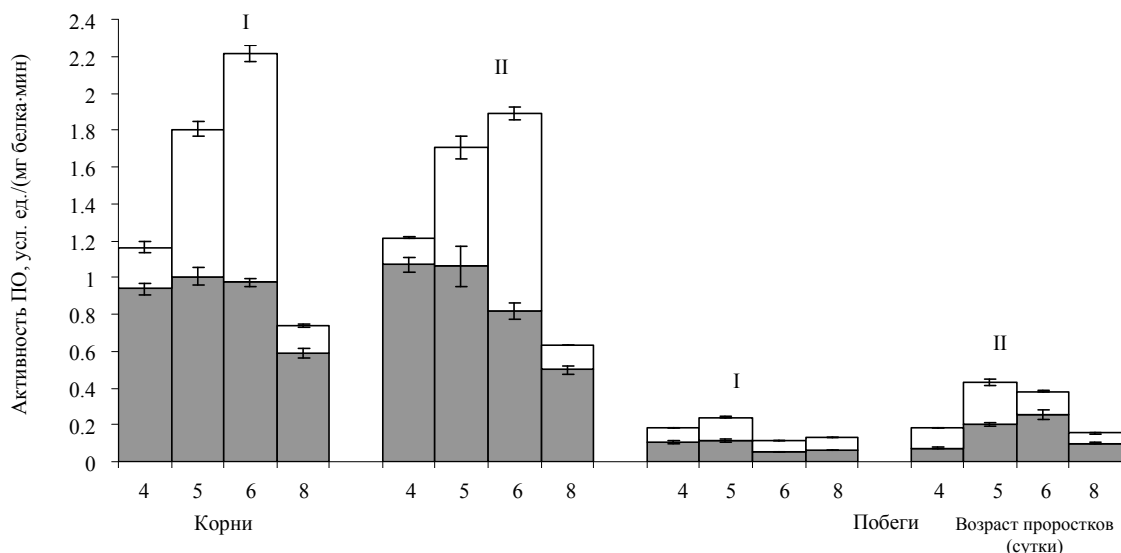


Рис. 1. Динамика активности цитоплазматической (□) и ионсвязанной с клеточной стенкой (■) пероксидазы в зелёных (I) и этиолированных (II) проростках пшеницы на ранних стадиях роста

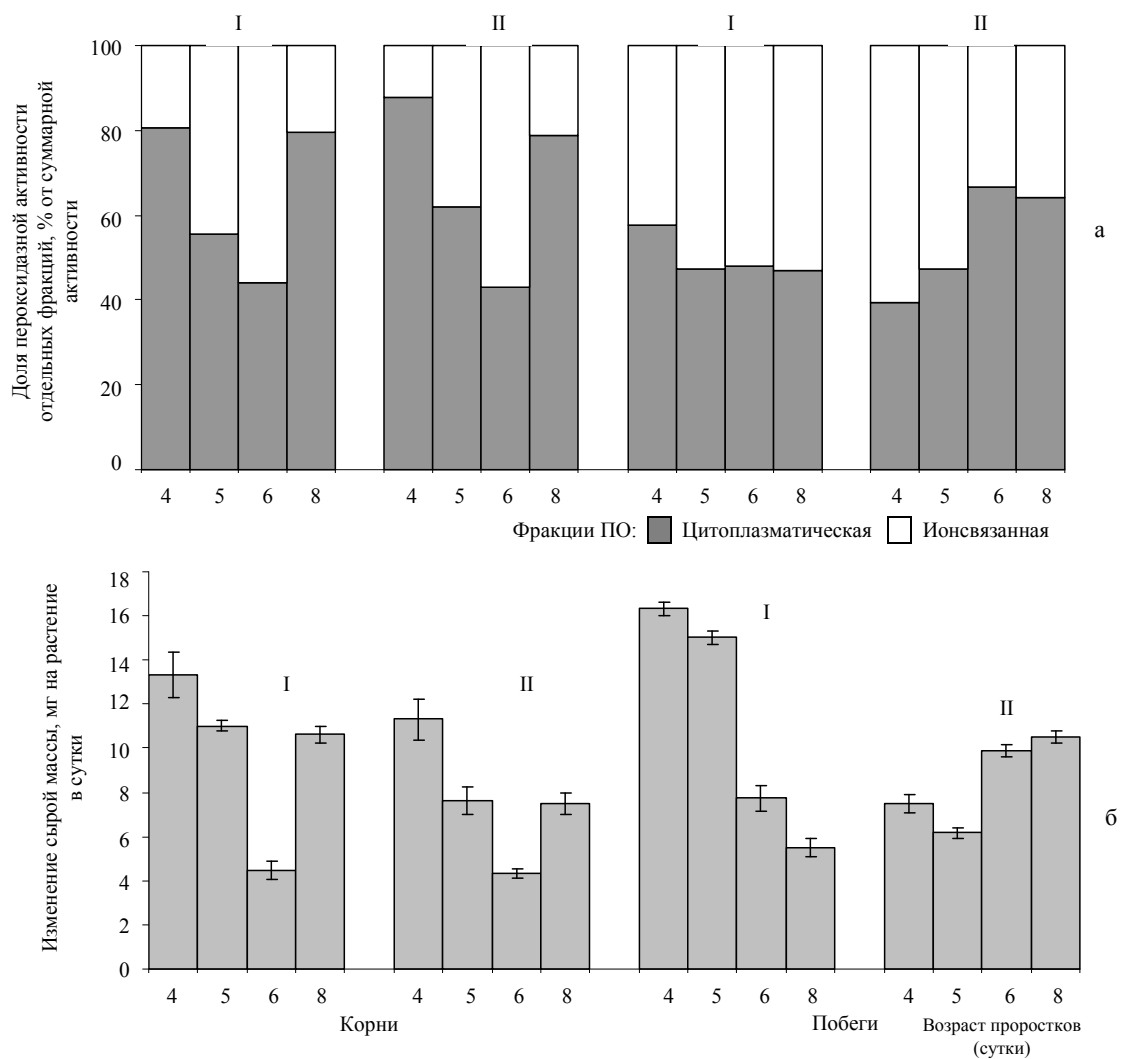


Рис. 2. Распределение активности пероксидазы между отдельными фракциями (а) и изменение биомассы (б) в процессе роста зелёных (I) и этиолированных (II) проростков пшеницы

ПО (клеточной стенки) вовлечена в синтез лигнина, утилизацию H_2O_2 , полимеризацию экстенсина и его сшивание с полисахаридными компонентами клеточной стенки, суберинизацию. Наконец, ПО, проявляя оксидазную функцию, может окислять ИУК и некоторые другие соединения [2, 7].

Прорастание семян начинается с роста корня, поэтому вполне вероятно, что заключительные этапы формирования его проводящей системы происходят гораздо раньше, чем у побега. Возможно, этим объясняется более выраженный в процессе роста корней градиент увеличения доли ионсвязанной фракции ПО, как и, в целом, характерная для данного органа повышенная пероксидазная активность в сравнении с побегом. Под действием света этот сдвиг в пероксидазной системе в пользу ионсвязанной фракции происходил быстрее (рис. 2а). Также довольно чётко прослеживались антагонистические отношения между ростовой активностью и активностью ионсвязанной ПО у побегов. В полном соответствии с выявленной закономерностью происходило повышение доли ионсвязанной фракции при торможении роста зелёных побегов и снижение, в условиях активации, нарастания скорости роста побегов этиолированных проростков пшеницы.

Обратная корреляция между ростом и активностью пероксидаз отмечена в работах [2, 8]. Интересно, что ингибиторы клеточного деления ускоряли секрецию ПО в клеточную стенку и, наоборот, ингибирование секреции ПО вызывало активацию клеточного роста [6]. В наших исследованиях установлены приоритетное значение перехода в пероксидазной системе «ионсвязанная – цитоплазматическая активность» и неоднозначность роли этих фракций в регуляции ростовой активности. Выявлена органоспецифичность, онтогенетическая и световая зависимость фракционного состава пероксидазы. Свет усиливал сдвиг в сторону ПО, ассоциированной с клеточной стенкой, что совпадало со светозависимым снижением скорости роста как побегов, так и корней проростков пшеницы.

Механизм влияния света на активность пероксидаз неизвестен. Поскольку ответ растений на свет опосредован через систему фоторецепторов, их возбуждение может вызвать: 1) изменения в окислительно-восстановительном режиме, одним из компонентов которого является ПО; 2) каскад реакций, которые приведут к из-

менению активности регулируемых светом генов (и, соответственно, количества фермента). 3) Выявлено, что активированные формы фоторецепторов, в частности фототропина, могут участвовать в регуляции транспорта индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и, вызывая перераспределение её градиента, инициировать разную скорость роста побега и корня [9]. Зависимость активности ПО от присутствия ИУК была продемонстрирована в модельной системе [10], а также показана в наших экспериментах, выполненных по схеме и с растительными объектами, аналогичными представленным в настоящей публикации [11].

Список литературы

1. Граскова И.А., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Войников В.К. Пероксидаза как компонент сигнальной системы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили // Физиол. раст. 2004. Т. 51. С. 692–697.
2. Максимов И.В., Черепанова Е.А. Про-/Антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам // Успехи соврем. биол. 2006. Т. 126. С. 250–261.
3. Олюнина Л.Н., Орлова А.Г. Оценка устойчивости проростков пшеницы к действию теплового шока // Вестник ННГУ. Сер. Биология. 2004. Вып. 3(5). С. 153–157.
4. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A., Randall R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
5. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа, 1975. 327 с.
6. Liu Z.H., Liu H.Y., Wang H.Y. Effect of light on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase in soybean hypocotyls // Bot. Bull. Acad. Sci. 1996. V. 37. P. 113–119.
7. Газарян И.Г. Биотехнология пероксидаз растений и грибов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 36. М.: ВИНТИ, 1992. С. 4–54.
8. Schopfer P., Plachy C., Frahy G. Release of Reactive Oxygen Intermediates (Superoxide Radicals, Hydrogen Peroxide, and Hydroxyl Radicals) and Peroxidase in Germinating Radish Seeds Controlled by Light, Gibberellin, and Abscisic Acid // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 1591–1602.
9. Зитте П., Вайлер Э.В., Кадерайт Й.В. и др. Ботаника. Т. 2. Физиология растений. М.: Академия, 2008. 496 с.
10. Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Рогожина Т.В. Пероксидаза: строение и механизм действия. Иркутск: ИГТУ, 2004. 199 с.
11. Томилин М.В., Олюнина Л.Н. // I Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных. Донецк, 2009 (в печати).

**PEROXIDASE ACTIVITY DYNAMICS AT EARLY ONTOGENETIC STAGES OF GREEN AND ETIO-
LATED WHEAT (*Triticum aestivum* L.) SEEDLINGS***L.N. Olyunina, M.V. Tomilin, A.P. Veselov*

The effect of light on the activity of peroxidase (PO) cytoplasmic (soluble) and ion-bound cell wall fractions of 4–8 day wheat seedlings has been investigated. Ontogenetic changes have been revealed in the dynamics of intracellular and extracellular PO, as well as a light-dependent shift towards the ion-bound fraction. It has been proposed that these PO forms are most closely connected with the modifying light influence on the wheat seedling growth activity.

Key words: *Triticum aestivum* L., growth, peroxidase, light-dependent.