

УДК 581.1

**ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ
И ИУК-ОКСИДАЗЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ**

© 2007 г.

А.Г. Орлова, Л.Н. Олюнина, В.П. Французова, А.П. Веселов

Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

vpfrantsuzova@rambler.ru*Поступила в редакцию 12.04.2007*

Используя метод вертикального электрофореза в ПААГе, исследовали активность изоформ пероксидазы и ИУК-оксидазы проростков пшеницы в норме и при гипертермическом воздействии. В корнях активность пероксидазы была выше, в составе пероксидазного спектра выделено 7–8 изоформ, в листьях – 6. В условиях повышенных температур активность фермента увеличивалась в корнях и снижалась в листьях. ИУК-оксидазная активность зафиксирована только в корнях проростков, повышение активности наблюдалось при 15- и 60-минутном тепловом шоке.

В естественных условиях растения подвергаются действию постоянно меняющихся экологических факторов, активно реагируя на их отклонения от оптимума. Важное адаптивное значение имеет способность растений изменять концентрацию фитогормонов в тканях. В последнее время все больший интерес привлекают быстрые реакции гормональной системы растений на резкие изменения температурного режима [1,2]. Показано, что перестройки в обмене фитогормонов и, в частности, в метаболизме индолил-3-уксусной кислоты (ИУК), происходят уже в первые минуты гипертермического воздействия. Механизм этих изменений не ясен.

Согласно мнению большинства исследователей, распад ИУК инициируется реакциями окислительного декарбокислирования, которые осуществляют растительные пероксидазы [3, 4]. Целью настоящей работы было исследование изоферментного спектра пероксидазы проростков пшеницы и выявление участия отдельных изоформ в окислении ИУК при гипертермии.

Температурной обработке (42°C, время воздействия 5–60 мин) подвергали 5-дневные этиолированные проростки пшеницы сорта «Московская – 35». Сырой растительный материал фиксировали жидким азотом и после гомогенизации (трис-глициновый буфер, pH 7,4) центрифугировали при 6000 об/мин. 30 минут. Ферментативный белок осаждали сульфатом аммония (90% насыщения), повторно центрифугировали; затем осадок растворяли трис-глицино-вым буфером (pH 7,4) и проводили диализ против этого же буфера в течение ночи. Количество белка определяли по

методу Лоури. Изоферменты пероксидазы разделяли методом вертикального электрофореза в ПААГе. Использовали 3,5%-ный центрирующий гель (pH 6,8) и 7,5%-ный разделяющий гель (pH 8,8). Концентрация белка, вносимого в лунки, 35 мкг/мкл для пероксидазы (ПО) и 100–300 мкг/мкл – при определении ИУК-оксидазы (ИУКО). Средняя продолжительность электрофореза – 5 часов.

Определение активности ПО и ИУКО в полиакриламидном геле осуществляли методом Endo [5]. Полученные электрофореграммы ПО и ИУКО сканировали и обрабатывали с помощью компьютерной программы ONE-Dscan.

Схема электрофореграмм пероксидазы и ИУКО представлены на рисунке 1. Как видно из схемы, в листьях пшеницы было выявлено 6 зон, обладающих пероксидазной активностью, в корнях – 7–8. У корней наибольшее число зон приходится на область медленно движущихся фракций белков с относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП) от 0,11 до 0,35. В этой области спектра для пероксидазы корней выявлено 5 зон, в листьях – 2. По величине их относительной активности (процент от суммарной активности всех фракций) в корнях указанные зоны составляют 92%, в листьях – 42%. Кроме того, для листьев характерна повышенная активность пероксидазы (58%) в зоне белков с высокой электрофоретической подвижностью (ОЭП 0,5–0,87), тогда как у корней активность в этой зоне составляет 8%.

Известно, что на активность пероксидазы влияют различные внешние факторы [6, 7]. Согласно полученным в нашей работе данным, экспонирование проростков пшеницы при

повышенной температуре вызывало увеличение активности пероксидазы в корнях, однако в тканях листьев реакция была противоположной: активность фермента снижалась либо оставалась на уровне контроля (рис. 2). Наиболее низкие значения зарегистрированы во

всех фракциях при 10- и 30-минутной экспозиции теплового шока. В корнях гипертермия вызывала более сложную реакцию (рис. 2, В). Удалось зафиксировать появление новых минорных фракций с ОЭП 0,5 (10–15-минутный тепловой шок) и 0,6 (5, 30 мин).

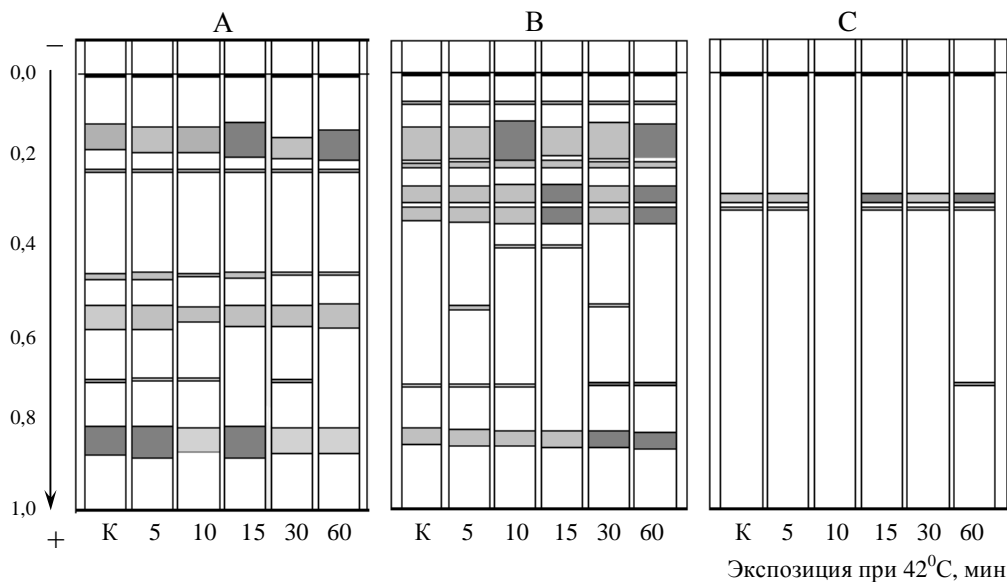


Рис. 1. Электрофоретический спектр изоформ пероксидазы листьев (А) и корней (В) и изоформ ИУК-оксидазы у корней (С) проростков пшеницы при гипертермии

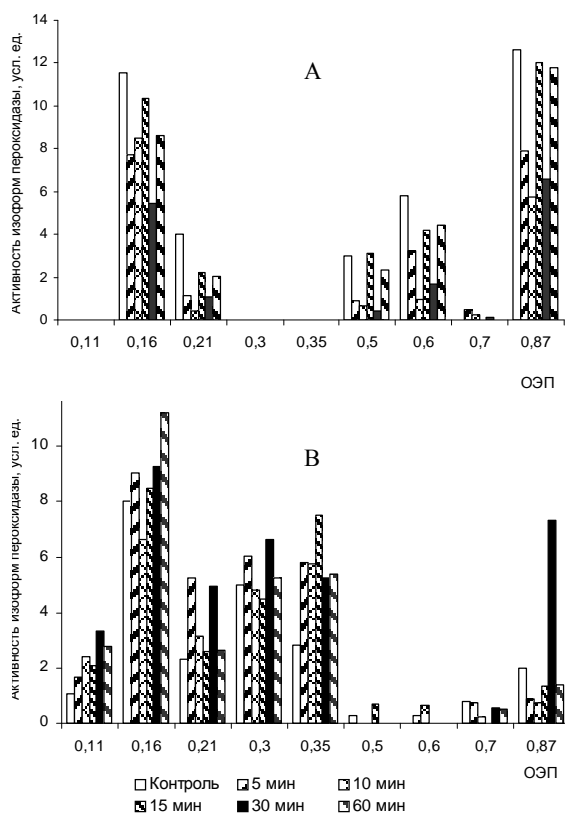


Рис. 2. Активность отдельных изоформ пероксидазы в листьях (А) и корнях (В) проростков пшеницы при гипертермии

Основная роль в повышении общей активности фермента в корнях принадлежит зонам белков с низкой электрофоретической подвижностью (0,16, 0,21, 0,30 и 0,35), для которых характерна и наибольшая активность.

Общеизвестно, что при действии различных стрессирующих агентов в тканях растений повышается концентрация H_2O_2 . Можно предположить, что снижение активности пероксидазы, наблюдаемое в наших опытах в тканях корня после 10-минутной экспозиции, а в листьях на протяжении всего эксперимента, вероятно, может привести к накоплению H_2O_2 . Гидропероксид в определенной концентрации способен действовать как активатор протеинкиназного каскада, инициирующего фосфорилирование белков, и, таким образом, индуцировать экспрессию ферментов защиты при действии стрессора [8].

В литературе имеются данные, что на синтез пероксидазы оказывают влияние изменения в гормональной системе растений [9, 10]. Предполагают, что фитогормоны участвуют в регуляции экспрессии генов пероксидазы при действии стрессоров и, в частности, при гипертермии. Согласно данным G.K. Agawal et al. (2002), такая регуляция зависит от условий освещения, времени воздействия и включает

обязательное присутствие *de novo* синтезированных белковых факторов.

ИУК-оксидазную активность удалось выявить только в корнях проростков пшеницы. По-видимому, это связано с тем, что для корней характерна бóльшая общая активность пероксидазы, чем для листьев. Способностью окислять ИУК обладают фракции белков с ОЭП 0,3 и 0,35. Интересно, что и при определении пероксидазы эти фракции обнаружены только в корнях пшеницы. Исходя из данных эксперимента по определению ИУК-оксидазы, можно говорить о тенденции к увеличению активности ИУКО при 15- и 60-минутном тепловом шоке. Кроме того, после 60 минут прогрева обнаружена новая минорная фракция с ОЭП 0,7.

В целом, исходя из полученных нами данных, можно заключить, что по крайней мере 2 изоформы пероксидазы пшеницы проявляют ИУК-оксидазную активность. При гипертермии пероксидаза и ИУК-оксидаза участвуют в развитии ответной реакции растений на стрессирующее воздействие. Изменения изоферментного спектра происходят быстро, уже в первые минуты воздействия и, как показал сравнительный анализ, более выражены в клетках корня.

Список литературы

1. Веселов, А.П. Изменение в содержании фитогормонов в ответной реакции растений при тепловом шоке и в период его последствий / А.П. Веселов, В.П. Лобов, Л.Н. Олюнина // Физиол. раст. – 1998. – Т. 45, № 5. – С. 709–715.
2. Веселов, Д.С. Роль гормонов в быстром ростовом ответе растений пшеницы на осмотический и тепловой шок / Д.С. Веселов, И. Сабиржанова, Г. Ахиярова, С.В. Веселова и др. // Физиол. раст. – 2002. – Т. 49, № 4. – С. 572–576.
3. Gazaryan, I.G. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases / I.G. Gazaryan, L.M. Lagrimini, G.A. Ashby, R.N.F. Thorneley // Biochem. J. – 1996. – V. 313. – P. 841–847.
4. Ghosh, S. Production and metabolism of indol acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo* / S. Ghosh, P.S. Basu // Microbiological Research. – 2006. – V. 161. – P. 362–366.
5. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по физиологии растений / В.Ф. Гавриленко, М.Е. Ладыгина, Л.М. Хандобина. – М., 1975. – С. 284–285.
6. Chaitanya, K.V. Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars / K.V. Chaitanya, D. Sundar, S. Masilamani, A. Ramachandra Reddy // Plant Growth Regulation. – 2002. – V. 36, № 2. – P. 175–180.
7. Rivero, R.M. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants / R.M. Rivero, J.M. Ruiz, P.C. Garcia, L.R. Lopez-Lefebvre, E. Sanchez, L. Romero // Plant Sci. – 2001. – V. 160. – P. 315–321.
8. Blokhina, O.B. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells / O.B. Blokhina, T.V. Chirkova, K.V. Fagestedt // J. Exp. Botany. – 2001. – V. 52, № 359. – P. 1179–1190.
9. Kim, K.-Y. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon / K.-Y. Kim, H.-K. Kwon, S.-Y. Kwon, H.-S. Lee, Y. Hur, J.-W. Bang, K.-S. Choi, S.-S. Kwak // Phytochemistry. – 2000. – V. 54. – P. 19–22.
10. Agrawal, G.K. Cloning and characterization of a jasmonate inducible rice (*Oryza sativa* L.) peroxidase gene, OsPOX, against global signaling molecules and certain inhibitors of kinase-signaling cascade(s) / G.K. Agrawal, R. Rakwal, N.-S. Jwa // Plant Sci. – 2002. – V. 162. – P. 49–58.

EFFECT OF HYPERTHERMIA ON THE PEROXIDASE AND IAA-OXIDASE ACTIVITY IN *TRITICUM AESTIVUM* L.

A.G. Orlova, L.N. Olyunin,, V.P. Frantsuzova, A.P. Veselov

The peroxidase and IAA-oxidase isoenzyme activity in normal and hyperthermally stressed wheat seedlings was studied with the use of PAAG electrophoresis. The peroxidase activity in the roots was higher than in the leaves with, respectively, 7–8 versus 6 isoenzymes identified in the peroxidase spectra. As a result of hyperthermia, peroxidase activity was found to increase in the roots and to decrease in the leaves. The IAA-oxidase activity was observed to increase only in the seedling roots after 15- and 60-min heat shock.