



УДК 581.111.2:581.573.4

## Роль слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в устойчивости картофеля к кольцевой гнили

И. А. Граскова, Е. В. Кузнецова, В. К. Войников

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск.  
E-mail: [Graskova@sifibr.irk.ru](mailto:Graskova@sifibr.irk.ru)

**Аннотация.** Показано участие слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в формировании защитных механизмов картофеля при действии бактериального патогена. Обнаружены закономерности активации молекул исследуемых пероксидаз или их синтез *de novo* в зависимости от способности сортов картофеля проявлять устойчивость к патогену. Впервые обоснованы две стратегии защиты клеток картофеля от действия патогена. Одна из них присуща устойчивым генотипам и связана с быстрой и резкой активацией уже существовавших до инфицирования пероксидаз, другая – характерная для восприимчивых генотипов, обусловлена синтезом молекул фермента *de novo* на более поздних этапах инфицирования.

**Ключевые слова:** картофель, патогенез, слабосвязанная с клеточной стенкой пероксидаза.

Важной проблемой современной биологии является изучение механизмов индуцирования устойчивости растений к действию патогена. В последние годы появились данные о том, что на клеточной поверхности растительных клеток присутствуют слабосвязанные с клеточной стенкой пероксидазы, способные легко отделяться от клеточной стенки и циркулировать по апопласту целого растения, иницируя в месте контакта с патогеном «иммунный ответ» [6]. Вероятно, именно эти пероксидазы первыми сталкиваются с «атакой» патогена, вступают в борьбу с ним, « посылают » сигнал о появлении патогена в геном растительной клетки, иницируя тем самым ее защитную реакцию. Однако все эти вопросы, несмотря на свою важность, остаются изученными крайне слабо. Поэтому изучение вопросов формирования иммунного ответа растения с участием слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в самые первые моменты патогенеза представляется актуальным.

### Материал и методы

Объектом исследования являлись растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*. Растения выращивали из черенков на агаризированной среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением гормонов и витаминов [1] в климатической камере с контролируемым режимом выращивания. Растительные экстракты, содержащие слабосвязанную с клеточной стенкой пероксидазу, получали согласно Я. Х. Паду [7], а их активность определяли по методу Бояркина, в качестве суб-

страта использовали гваякол. За кинетикой пероксидазной реакции в суспензионных клетках картофеля следили, измеряя скорость окисления гваякола [2]. Кинетику снимали на спектрофотометре СФ-26. Кинетические константы рассчитывали по методу Лайнуивера – Берка. Для подавления синтеза пероксидазы использовали ингибитор белкового синтеза – циклогексимид (5 мг/л) и специфический ингибитор РНК-полимеразы II –  $\alpha$ -аманитин (0,01 мг/л) [3]. Электрофорез нативного белка проводили в блоках полиакриламидного геля в модифицированной системе Андерсон, Борг и Микаэльсон [4]. Для выявления ферментативной активности на полиакриламидном геле использовали диаминобензидиновый метод в модификации [5]. Вестерн-блоттинг проводили после электрофоретического разделения на нитроцеллюлозную мембрану в Towbin-буфере (25 мМ трис, 192 мМ глицин, 20%-ный метанол, рН 9,2). После окрашивания мембраны сканировали. Иммунизацию кроликов проводили препаратом пероксидазы хрена в смеси с адьювантом Фрейна. Повторность экспериментов была 3–6-кратная. Полученные результаты обработаны статистически с использованием компьютерных программ StatSoft (Statistica 6.0).

### Результаты и обсуждение

Была определена устойчивость 12 сортов картофеля к кольцевой гнили, вызываемой бактериальным патогеном *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) вирулентного штамма 5369. Было показано, что изученные сорта картофеля по степени устойчивости к данному па-

тогену разделяются на три группы: устойчивые, среднеустойчивые и восприимчивые. Активность слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы различалась в тканях корней, стеблей и листьев растений картофеля *in vitro*. Она была выше в тканях корней по сравнению с тканями стебля и листьев. Активность этой пероксидазы во всех тканях была выше у устойчивых сортов, чем у восприимчивых. Кроме того, активность этой пероксидазы выше в тканях корней, чем в других органах растений. Это связано с тем, что корни первыми сталкиваются с патогеном и первыми вступают в борьбу с ним. Вероятно, высокая активность слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы в корнях устойчивых сортов картофеля наряду с другими механизмами защиты, обеспечивает способность этих растений противостоять действию патогена.

Дикие виды картофеля обладают высокой адаптивной способностью против многих возбудителей болезней и служат источниками генов устойчивости ко всем основным заболеваниям и ряду неблагоприятных факторов среды. Были исследованы изменения активности слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы в тканях диких типов картофеля при заражении возбудителем кольцевой гнили. Заражение не вызывало появления характерных симптомов заболевания, таких как угнетение роста и хлороза листовых пластинок. Растения отличались высокой устойчивостью к действию патогена, и их использование в селекции на устойчивость к кольцевой гнили может быть перспективным. Активность исследуемого фермента в тканях контрольных растений дикого типа была примерно равной и в случае корней выше, чем в тканях стеблей и листьев, а также – чем в тканях картофеля культурных сортов.

Для изучения молекулярных механизмов, приводящих к изменениям в клетках во время действия различных стрессов, удобным объектом являются суспензионные культуры клеток. Были получены и использованы культуры клеток двух контрастных по устойчивости к кольцевой гнили сортов картофеля: Луговской (устойчивый) и Лукьяновский (восприимчивый). Использование именно такой модельной системы позволило изучить динамику активности слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы в самые первые моменты действия патогена.

Активность фермента у устойчивого сорта всегда была выше, чем у восприимчивого и резко возрастала при действии патогена. Исследования активности пероксидазы в культу-

ральной среде и в клетках патогена показали, что активность не детектировалась. Поиск в базе данных UniProtKB/NrEMBL показал отсутствие пероксидазы у *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Так как бактерии не имеют собственной пероксидазной активности, следовательно, их вклад в тестируемую активность фермента не было.

При культивировании клеток картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский с патогеном повышение активности исследуемого фермента наблюдали через 10 мин после начала и через 1,5–2,5 ч. Активность пероксидазы во втором пике была выше, чем в первом. Добавление ингибиторов циклогексимида и А-Аманитина привело к снижению уровня активности в течение первого часа инкубирования и полностью элиминировало увеличение активности через 1–2,5 ч. Добавление патогена к клеткам устойчивого сорта Луговской вызывало увеличение активности фермента примерно вдвое. Первое увеличение активности наблюдалось через 5 мин после начала заражения, второе – в промежутке от 1,5 до 2,5 ч, причем уровень активности был примерно равным. Добавление ингибиторов не влияло на активность фермента в первые минуты заражения и полностью снимало активирование фермента после первого часа культивирования. Изменение активности слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы во времени свидетельствует о двухфазном ответе на инфицирование. Причем второй пик активности (через 1,5–2 ч после инфицирования) у обоих сортов картофеля связан с синтезом новых молекул фермента, т. е. обусловлен изменением экспрессии генома при патогенезе. Первый пик активности (через 5–20 мин после инфицирования) исследуемой пероксидазы у устойчивого сорта не зависит от синтеза белка и, возможно, он обусловлен быстрой активацией слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы, которая уже имела на поверхности клеток до их инфицирования.

Фермент пероксидаза может менять свои каталитические свойства под влиянием заражения растения-хозяина патогенами, а снижение  $K_m$  для пероксидазы инфицированных растений может происходить в результате повышения ее сродства к субстрату. Были получены данные, которые показывали, что при патогенезе регуляция активности слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз суспензионных клеток картофеля осуществляется за счет изменения кинетических параметров этих ферментов. Причем в первые моменты инфицирования

клеток изменяются кинетические параметры уже существующих молекул ферментов. С увеличением длительности действия патогена, вероятно, синтезируются новые молекулы ферментов (возможно, другие их изоформы) с другими кинетическими параметрами.

Были получены данные о том, что слабосвязанные с клеточной стенкой пероксидазы устойчивого и восприимчивого сортов картофеля в отсутствие патогена конкурентно ингибированы. В первые моменты инфицирования резкое повышение активности ферментов устойчивого сорта происходит за счет увеличения их сродства к субстрату в результате снижения конкурентного ингибирования. У восприимчивого сорта картофеля не происходит резкого увеличения активности фермента из-за протекания одновременно двух разнонаправленных процессов: снижение  $K_m$  и снижение скорости образования  $V_{max}$  и распада фермент-субстратного комплекса.

Полученные ранее результаты позволяют сделать предположение о том, что слабосвязанные с клеточной стенкой пероксидазы играют важную роль в устойчивости картофеля к бактериальному патогену, вызывающему кольцевую гниль. Поэтому для выявления роли слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы в дальнейших экспериментах их активность блокировали кроличьими антителами к пероксидазе хрена.

Была проведена иммунизация кроликов препаратом пероксидазы хрена. Добавление кроличьих антител к пероксидазе хрена привело к уменьшению активности исследуемой пероксидазы. Оказалось, что блокирование слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы, выделенной из суспензионных клеток устойчивого сорта картофеля Луговской, приводит к значительному снижению активности этого фермента как в контроле, так и после действия патогена. Следовательно, слабосвязанные с клеточной стенкой пероксидазы картофеля имеют общие иммунохимические детерминанты с пероксидазой хрена, и их блокирование приводит к снижению активности фермента. В результате клетки погибали при культивировании с патогеном.

В дальнейшем представляло интерес выяснить, есть ли связь между устойчивостью сорта картофеля Луговской к данному патогену и блокировкой слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз поликлональными кроличьими антителами к пероксидазе хрена. Была определена корреляция между снижением активности

исследуемого фермента в присутствии антител и жизнеспособностью клеток картофеля устойчивого сорта при обработке антителами. Коэффициент корреляции составлял  $0,761597 \pm 0,14$ , достоверность 5,44. Также была определена корреляция между жизнеспособностью суспензионных клеток картофеля сорта Луговской при заражении патогеном и активностью слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы, выделенной из суспензионных тканей с добавлением патогена. Коэффициент корреляции составлял  $0,928895 \pm 0,05$ , достоверность 18,6. Полученные данные позволяют предположить, что устойчивость клеток картофеля сорта Луговской при заражении бактериальным патогеном в значительной степени зависит от активности слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз.

### *Заключение*

Полученные результаты позволяют предположить следующую модель взаимодействия патогена и растения-хозяина (рис.). У устойчивого сорта картофеля при контакте с патогеном на клеточной стенке активируются пероксидазы, связанные слабыми ионными силами – так называемые слабосвязанные с клеточной стенкой пероксидазы. При этом происходит одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода до супероксидного аниона и накопление перекиси водорода. Эта реакция протекает с высокой скоростью (она длится меньше 1 с) и вызывает окислительный взрыв и как результат – гибель патогена. При активировании слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз, ассоциированных с рецептором элизитора, происходит освобождение и активация G-белка и также активирование кальциевых каналов. Увеличение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  влияет на работу протеинкиназы и НАДФН-оксидазы. Накопление свободных форм кислорода и перекиси водорода активирует синтез защитных генов. В результате экспрессии этих генов начинается синтез новых белков, а также новых молекул пероксидазы.

Все это приводит к формированию защитной реакции клеток устойчивого сорта картофеля. У восприимчивого сорта, прежде всего, не происходит резкое активирование слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз и их количество значительно меньше. В результате вся реакция замедляется, увеличивается время прохождения сигнала на геном, вследствие этого патоген успевает повредить клетку.

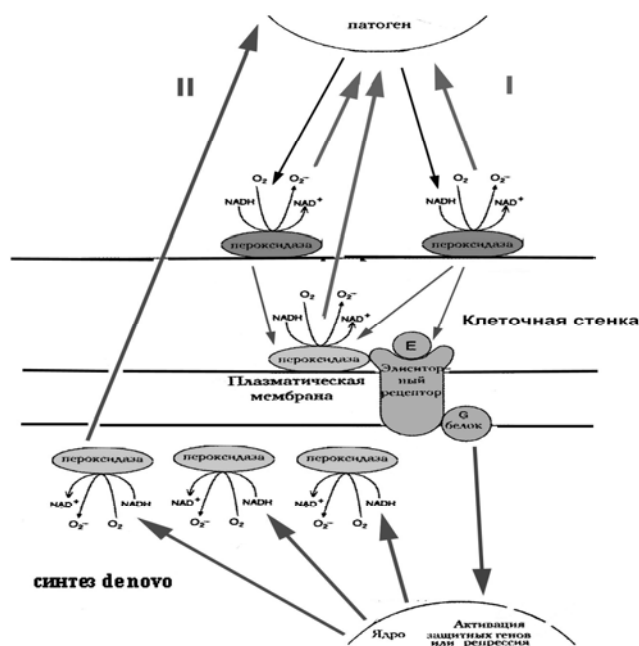


Рис. Схема предполагаемых путей активации слабосвязанной с клеточной стенкой пероксидазы при патогенезе кольцевой гнили. I – первый путь активации слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз устойчивого сорта картофеля; II – второй путь активации

Таким образом, можно, вероятно, говорить о существовании у картофеля двух стратегий защиты от инфицирования патогеном кольцевой гнили. Одна из них присуща устойчивым генотипам и связана с быстрой активацией уже существовавшей до появления патогена пероксидазы. Такая активация обусловлена быстрыми изменениями кинетических параметров и позволяет растению немедленно начать борьбу с патогеном, одновременно запуская сигнальную систему, направленную на инициацию защитных механизмов клетки. Такая система позволяет растению быстро реагировать на «нападение» патогена и организовать соответствующую «оборону». Другая стратегия реализуется восприимчивыми генотипами. Она направлена на передачу в геном информации о начале инфицирования для запуска механизмов защиты. При этом теряется время, не формируется быстрая «оборона», и патоген успевает паразитировать ткани растения.

#### Литература

1. Бутенко Р. Г. Методические указания по получению вариантных клеточных линий и растений

у различных сортов картофеля / Р. Г. Бутенко, Л. М. Хромова Г. В. Седнина. – М. : ВАСХНИЛ, 1984. – 28 с.

2. Войников В. К. Зависимость активности сукцинатдегидрогеназы митохондрий озимой ржи от температуры и концентрации сукцината / В. К. Войников М. А. Тимина // Физиол. растений. – 1983. – Т. 30(2). – С. 365–370.

3. Граскова И. А. Изменение активности пероксидазы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили / И. А. Граскова, С. В. Владимирова, А. В. Колесниченко и др. // Вестн. Харьков. нац. аграр. ун-та. Сер. биол. – 2002. – Т. 9(1). – С. 34–44.

4. Колесниченко А. В. Роль белка холодового шока БХШ310 и белков его семейства в защите растений от низкотемпературного стресса : дис. ... д-ра биол. наук / А. В. Колесниченко – Иркутск, 2002. – 436 с.

5. Лойда З. Гистохимия ферментов / З. Лойда, Р. Госсрау, Т. Шиблер – М. : Мир, 1982. – 279 с.

6. Минибаева Ф. В. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе / Ф. В. Минибаева, Л. Х. Гордон // Физиол. растений. – 2003. – Т. 50(3). – С. 459–464.

7. Паду Э. Х. Свойства пероксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы при образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы / Э. Х. Паду // Физиол. растений. – 1995. – Т. 42, № 3. – С. 408–415.

## The role of peroxidase weak-associated with cell wall under the roote infection in potato

I. A. Graskova, E. V. Kusnetsova, V. K. Voinikov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk

**Abstract.** Weak-associated with wall cell peroxidases take part in determination potato resistance to bacterial infection. There are two strategy for protection potato cells under infection. Weak-associated with wall cell peroxidases of sensitive potato were activated 1.5–2 hours after infection. Peroxidases activity in the resistant potato roses sharply in the first minutes of infection. The increase of weak-associated with wall cell peroxidase activity of resistant potato in the first moments of infection is not related to protein synthesis and is apparently conditioned by the change of kinetic parameters.

**Key words:** pathogenesis, weak-associated with wall cell peroxidases, potato

*Граскова Ирина Алексеевна*  
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории фитоиммунологии  
тел. (3952) 42–50–09, факс (3952) 51–07–54  
E-mail: graskova@sifibr.irk.ru.

*Graskova Irina Alekseevna*  
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.  
Ph.D. in Biology, senior research scientist, Laboratory of Phytoimmunology  
phone: (3952) 42–50–09, fax: (3952) 51–07–54  
E-mail: graskova@sifibr.irk.ru.

*Кузнецова Елена Вячеславовна*  
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317  
аспирант  
тел. (3952) 42–50–09, факс (3952) 51–07–54  
E-mail: elen@nextmail.ru

*Kuznetzova Elena Vyatcheslavovna*  
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.  
doctoral student  
phone: (3952) 42–50–09, fax: (3952) 51–07–54  
E-mail: elen@nextmail.ru

*Войников Виктор Кириллович*  
директор Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317  
доктор биологических наук, профессор  
тел. (3952) 42–50–09, факс (3952) 51–07–54  
E-mail: vvk@sifibr.irk.ru

*Voinikov Viktor Kirillovitch*  
Director of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS  
664033, Irkutsk, 132, Lermontova St.  
D.Sc. in Biology, Prof  
phone: (3952) 42–67–21, fax: (3952) 51–07–54  
E-mail: vvk@sifibr.irk.ru