



УДК 581.1

Влияние света на активность, изоферментные спектры пероксидазы и фенолоксидазы в проростках яровой пшеницы

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

Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород

E-mail: kfr@bio.unn.ru

Аннотация. Исследовали влияние света на активность пероксидазы (ПО), фенолоксидазы (ФО) в корнях и побегах 5–6-дневных проростков пшеницы. Обнаружена высокая гетерогенность изоферментных спектров ПО, ФО и совпадения по электрофоретической подвижности их изоформ в побегах (R_f 0,38; 0,49) и в корнях (R_f 0,44; 0,54). Выявлена светозависимость и органоспецифичность распределения активности данных ферментов между растворимой и ионносвязанной фракциями.

Ключевые слова: проростки пшеницы, пероксидаза, фенолоксидаза, изоферменты.

В формировании устойчивости растений к воздействию экологических факторов большую роль играют пероксидазы и фенолоксидазы, активность и изоферментный состав которых существенно варьирует в зависимости от природы, продолжительности и силы действия стрессора [8; 1; 9]. Участие этих ферментов в защитных реакциях продолжает привлекать внимание исследователей, так как показано, что повышение активности отдельных изоформ пероксидазы, фенолоксидазы коррелирует с устойчивостью растений [12; 3; 4]. Ранее в наших экспериментах [6] было выявлено, что присущие растительным организмам защитные реакции, которые возникают на экстремальные воздействия, светозависимы. Не исключено, что механизм светового контроля устойчивости растения осуществляется с участием ПО, ФО. Цель настоящей работы – выяснить влияние света на активность данных ферментов.

Материал и методы

Объектом исследования служили растения яровой пшеницы *Triticum aestivum* сорта «Московская 35» (водная культура). Эксперименты проводились с 5–6-дневными этиолированными (выращенными в темноте) и зелеными (14 часовая световая день) проростками.

Растительный материал (корни или побеги) фиксировали жидким азотом и затем гомогенизировали в фосфатном буфере (pH 8,0), содержащем цистеин (0,1 %). Растворимую фракцию исследуемых ферментов получали центрифугированием гомогената при 7000 об/мин в течение 15 мин. Для выделения ионсвязанной

с клеточной стенкой фракции – осадок, после промывания средой выделения суспензировали в 1М растворе NaCl. Затем снова центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин.

Экстракты белков в дальнейшем анализировали на ПО и ФО-активность после проведения нативного вертикального диск-электрофореза в полиакриламидном геле. Для электрофореза использовали 3,5 % концентрирующий гель (pH 6,8) и 7,5 % разделяющий гель (pH 8,8). Состав электродного буфера: 250мМ глицин, 25мМ трис (pH 8,3) [5]. Концентрация белка, вносимого в лунки — 35 мкг/мкл. Пластинки геля использовали для проявления ферментативной активности. Активность ПО и ФО выявляли, используя методические рекомендации, приведённые в публикациях В. Ф. Гавриленко и др. [2].

Для определения ПО-активности гели инкубировали в ацетатном буфере pH 5,4 в течение 30 мин. В качестве субстрата использовали бензидин (0,005 М) и раствор 0,015 % H_2O_2 . После появления окрашенных полос гели фиксировали раствором 7 % уксусной кислоты.

Для определения ФО-активности гели инкубировали в течение 30 мин 0,01 % растворе о-фенилендиамина, содержащего щавелевую кислоту (0,01 N). Затем гели погружали в 1 %-ный раствор пирокатехина до появления окрашенных полос.

Все полученные электрофореграммы фотографировали и обрабатывали на компьютере с помощью программы ONE-Dscan.

Результаты и обсуждение

Электрофоретический анализ позволил выявить высокую активность ПО в корнях и ФО в побегах как зелёных, так и этиолированных проростков пшеницы. Это различие в распределении по органам наиболее чётко обнаруживается при определении активности растворимых (цитоплазматических) в сравнении с ионсвязанными (связанных с клеточной стенкой) фракциями данных ферментов (рис.). Кроме того, для растворимых фракций отмечена большая гетерогенность изоферментных спектров. На электрофореграммах экстрактов растворимых фракций для ПО идентифицировано от 4 до 6, у ФО 4–5, тогда как в составе ионсвязанных фракций 2–5 ПО и 2–3 ФО активных белковых зон.

В наших исследованиях зафиксировано влияние света как на общую активность ПО и ФО, так и на отдельные их изоформы. Следует отметить, что активность этих ферментов (обе фракции ПО и растворимая фракция ФО) повышалась по сравнению с темновым вариантом (этиолированные проростки пшеницы) весьма существенно: в 2–3 раза (рис. 1). Соотношение растворимая/ионсвязанная фракции в световом варианте составляло 0,75 (побеги); 2,75 (корни); для проростков, выращенных в темноте – 3,33 (побеги); 8,5 (корни). Таким образом, свет активировал в большей мере ионсвязанную фракцию, т. е. фракцию ПО в составе клеточной стенки проростков пшеницы. У ФО индуцированные светом эффекты проявились в избирательном увеличении активности растворимых фракций; активность ионсвязанных была почти в два раза ниже, чем в экстрактах, полученных из этиолированных проростков пшеницы.

Отмеченная светозависимость активности ПО и ФО, вероятно, связана с ингибирующим действием света на рост проростков. Последнее может быть вызвано снижением концентрации эндогенной ИУК, играющей важную роль в стимуляции роста. Известно, что ПО и ФО способны окислять ИУК и индуцированное светом повышение их активности может привести к замедлению роста. Этот вывод подтверждается данными об ингибирующем действии света на ростовые процессы [10; 11], а также исследованиями, выполненными на нашей кафедре. В этих исследованиях было показано, что действительно, в зелёных, выращенных при 14-часовом фотопериоде проростках пшеницы, уровень свободной ИУК снижен [7].

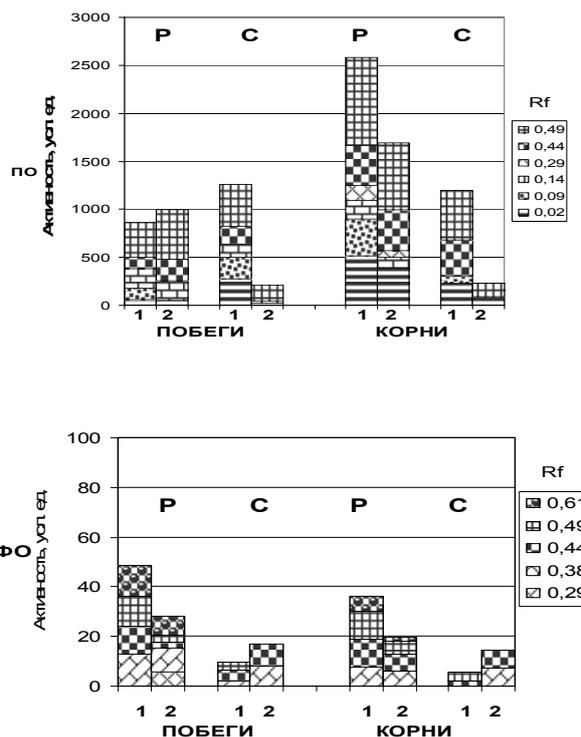


Рис. Электрофоретические характеристики спектров ПО, ФО побегов и корней проростков пшеницы, выращенных при 14-часовом фотопериоде – (1) и в отсутствие света – (2). P – растворимая, C – связанная фракции

Обнаружена светозависимость изоферментных спектров как ПО, так и ФО. В частности, на электрофореграммах, полученных для растворимых и ионсвязанных фракций ПО, белковая зона с Rf 0,09 присутствует в зелёных и отсутствует в этиолированных проростках пшеницы. При этом она очень активна в корнях (растворимая фракция) и в побегах (ионсвязанная фракция). Можно предположить, что именно зона с Rf 0,09 возможно проявляет ИУК-оксидазную функцию. Известно, что отдельные изоформы ПО обладают ИУК-оксидазной активностью. Не исключено, что под действием света происходит переключение с пероксидазной на ИУК-оксидазную активность. Ранее в экспериментах на проростках пшеницы сравнительный анализ позволил выявить в корнях и побегах 3 изоформы ПО, обладающие ИУК-оксидазной активностью – это зоны с Rf 0,10; 0,15 и 0,30 [7]. В наших исследованиях близкими по относительной электрофоретической подвижности были изоформы ПО с Rf 0,09; 0,14 и 0,29.

Кроме описанных выше изоформ, были обнаружены и другие изоэнзимы ПО, которые имели общие белковые зоны на электрофореграммах экстрактов побегов и корней обоих

сравниваемых типов растений. Однако есть изоформы ПО, характерные только для корней – это белковая зона с Rf 0,29. Для изоформ ФО индуцированные светом различия проявились при анализе экстрактов побегов. Белковая зона с Rf 0,29 обнаружена у этиолированных и только в составе растворимой фракции.

Хорошо известно, что свет способствует накоплению фенольных соединений [10]. В наших исследованиях удалось установить, что влияние света на фенольный метаболизм шире и включает не только стимуляцию биосинтеза, но и активирует окисление фенольных соединений за счёт повышения активности отдельных изоформ ПО и ФО. Таким образом, можно сделать вывод, что изоферментные спектры ПО и ФО светозависимы и органоспецифичны; отмечено также, что свет влияет на распределение между растворимой и ионносвязанной фракциями ферментов. Активность растворимых фракций ПО и ФО повышена в экстрактах зелёных проростков пшеницы; различия в ионносвязанных фракциях были неоднозначными: выявлено снижение активности ФО и светозависимая стимуляция данной фракции ПО. Последнее представляет особый интерес в связи с гипотезой о приоритетном значении апопластных изменений в адаптации растений к воздействию различных экологических факторов.

Литература

1. Андреева В. А. Фермент пероксидаза / В. А. Андреева. – М. : Наука, 1988. – 127 с.
2. Гавриленко В. Ф. Большой практикум по физиологии растений / В. Ф. Гавриленко, М. Е. Ладыгина, Л. М. Хандобина. – М. : Высш. шк., 1975. – 327 с.

3. Граскова И. А., Боровский Г. Б., Колесниченко А. В. Пероксидаза как компонент сигнальной системы клеток картофеля при патогенезе кольцевой гнили // Физиол. раст. – 2004. – Т. 51. – С. 692–697.

4. Максимов И. В. Про-/Антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам / И. В. Максимов, Е. А. Черепанова // Успехи соврем. биол. – 2006. – Т. 126. – С. 250–261.

5. Маурер Г. Диск – электрофорез: теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле / Г. Маурер. – М. : Мир, 1971. – 242 с.

6. Олюнина Л. Н. Оценка устойчивости проростков пшеницы к действию теплового шока / Л. Н. Олюнина, А. Г. Орлова // Вест. ННГУ. Сер. Биол. – 2004. – Вып. 3(5). – С. 153–157.

7. Орлова А. Г. Роль индолилуксусной кислоты в развитии ответной реакции зелёных и этиолированных проростков пшеницы на тепловой шок : автореф. дис. ... канд. биол. наук / А. Г. Орлова. – Нижний Новгород. – 2004. – 24 с.

8. Рубин Б. А. Биохимия и физиология иммунитета растений / Б. А. Рубин, Е. В. Арциховская, В. А. Аксенова. – М. : Высш. шк., 1975. – 320 с.

9. Савич И. М. Пероксидазы – стрессовые белки растений / И. М. Савич // Успехи современ. биол. 1989. – Т. 107. – С. 406–417.

10. Liu Z. H. Effect of light on endogenous indole-3-acetic acid, peroxidase and indole-3-acetic acid oxidase in soybean hypocotyls / Z. H. Liu, H. Y. Liu, H. Y. Wang // Bot. Bull. Acad. Sci. – 1996. – Vol. 37. – P. 113–119.

11. Schopfer P. 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 / P. Schopfer, C. Plachy, G. Frahry // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 141. – P. 137–145.

12. Yoruk R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase : a Rev. / R. Yoruk, M. R. Marshall // J. Food Biochem. – 2003. – Vol. 27. – P. 361–422.

The light influence on activity and enzymatic spectra of peroxidases and phenoloxidases in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings

L. N. Oljunina, M. V. Tomilin, A. P. Veselov

N. I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

Abstract. The influence of light on peroxidase (PO) and phenoloxidase (PHO) activity in wheat shoots and roots in days 5–6 was investigated. High heterogeneity of PO and PHO enzymatic spectra and coincidence in electrophoretic mobility of their isoforms (Rf 0.38–0.49 in shoots; 0.49–0.54 in roots) was revealed. The light-dependence and organospecificity of distributions between soluble and ion-connected fractions for these enzymes was obtained.

Key words: wheat sprouts, peroxidase, phenoloxidase, isoenzymes.

Олюнина Любовь Николаевна
Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, кор. 1,

Olyunina Lubov Nikolaevna
State University of Nizhny Novgorod
603950, Nizhny Novgorod, 23, Gagarina Av.
Ph.D. in Biology, ass. prof, Department of Plant

кандидат биологических наук
доцент кафедры биохимии и физиологии растений
тел. (831) 465–20–40, факс (831) 462–30–85
E-mail: kfr@bio.unn.ru

Biochemistry and Physiology
phone: (831) 465–20–40, fax: (831) 462–30–85
E-mail: kfr@bio.unn.ru

Томилин Михаил Викторович
Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, кор. 1,
аспирант кафедры биохимии и физиологии растений
тел. (831) 465–20–40, факс (831) 462–30–85

Tomilin Mikhail Viktorovitch
State University of Nizhny Novgorod
603950, Nizhny Novgorod, 23, Gagarina Av.
doctoral student, Department of Plant
Biochemistry and Physiology
Phone: (831) 465–20–40, fax: (831) 462–30–85

Веселов Александр Павлович
Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского
603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, кор. 1,
доктор биологических наук, профессор,
зав. кафедрой биохимии и физиологии растений
тел. (831) 465–20–40, факс (831) 462–30–85,
E-mail: veselov@bio.unn.ru

Veselov Aleksandr Pavlovitch
State University of Nizhny Novgorod
603950, Nizhny Novgorod, 23, Gagarina Av.
D.Sc. in Biology, Prof., Head of Department
of Plant Biochemistry and Physiology
Phone: (831) 465–20–40, fax: (831) 462–30–85
E-mail: veselov@bio.unn.ru