

## РОЛЬ АПОПЛАСТНЫХ ФОРМ ПЕРОКСИДАЗЫ В СВЁРТЫВАНИИ ЛИСТА У ПШЕНИЦЫ

*В работе исследуются биохимические механизмы изменения морфологии флагового листа пшеницы – свёртывания листовой пластинки. Установлены генотипические различия в пространственном распределении активности апопластных форм пероксидазы: ионно-связанной и ковалентно-связанной с клеточной стенкой. У сортов Отан и Альба высокая активность обеих форм пероксидазы пространственно совпадает с проявлением свёртывания листа. Увеличение активности апопластных форм пероксидазы в зонах 2-8 листьев сортов Отан и Альба сопровождается изменением термостабильности фермента. Свёртывание листовой пластинки пшеницы представляется сложным механизмом регуляции механо-биохимических свойств клеточной стенки, в который включена пероксидаза клеточной стенки.*

В последнее время особое внимание исследователей уделяется изучению функций растительной клеточной стенки при воздействии различных абиотических (засуха, низкая температура, осмотический стресс) и биотических (ранение, заражение патогенами) факторов среды (Ктиторова и др., 2002; McDougall, 1993; Vakon et al., 1997). Хорошо известно, что все эти факторы, в первую очередь, снижают скорость роста листьев и корней растений. Показано, что замедление роста листьев в зоне растяжения связано с изменением механических свойств клеточной стенки, а именно, с уменьшением её эластичности, что, в свою очередь, снижает способность клетки к росту растяжением (Passioura and Fry, 1992).

Растяжение или усиление клеточной стенки являются процессами, регулируемые ферментами. Наиболее важными из них являются пероксидаза клеточной стенки (ионно-связанная и ковалентно-связанная). Считается, что пероксидаза клеточной стенки является ключевым ферментом, регулирующим скорость роста растяжением листьев и корней растений (Thompson et al., 1997). Участие пероксидазы (ЕС 1.11.1.7) клеточной стенки в изменении её эластичных свойств обуславливается образованием фенольных соединений между компонентами клеточной стенки. Активность пероксидазы клеточной стенки в растительных тканях связана с различными биохимическими реакциями, такими как биосинтез лигнина и суберина (Fry 1979), окисление остатков тирозина в мономерах структурного белка экстенсина (Everdeen et al., 1988), образование мостиков между компонентами её полисахаридного матрикса путём окисления пектинов и гемицеллюлоз (Bruce and West, 1989).

Следует отметить, что в этих работах изучение ростовых процессов проводили на молодых, активно растущих органах (листьях, coleoptилях и корнях) растений. Для нас изучение активности пероксидазы клеточной стенки представляло интерес в связи с индуцируемым засухой изменением морфологии листовой пластинки у пшеницы. Таким образом, рабочая гипотеза состоит в том, что процессы свёртывания листовой пластинки в определённой мере обуславливаются изменением свойств клеточной стенки. Для проверки данной гипотезы был проведён эксперимент, задачами которого были:

а) определение пространственного распределения активности пероксидазы клеточной стенки во флаговом листе пшеницы; б) изучение термостабильности ионно-связанной и ковалентно-связанной пероксидазы клеточной стенки.

### Материалы и методы

Объектами исследования были родительский сорт: Омская 9 (обычная морфология листа) и сорта мягкой яровой пшеницы с введённым признаком «свёрнутый лист» Отан и Альба. Сорт Отан, отбор из пятого беккрасса, несёт два доминантных гена *R11* и *R12*, проявляет интенсивное свёртывание листа. Сорт Альба, отбор из третьего беккрасса, несёт один из доминантных генов, отвечающих за признак «свёрнутый лист» *R1*. Характеризуется слабым проявлением свёртывания листа.

Для определения активности пероксидазы клеточной стенки использовали растения, выращенные в полевых условиях. Пероксидазу клеточной стенки выделяли из 5-6 флаговых листьев в фазу цветения. Отбор растительных проб осуществляли в 12 ч. дня, когда признак свёртывания листа проявляется наиболее ярко.

Выделение ионно – связанной пероксидазы проводили по методу, описанному К.З. Гамбург с соавт. (1977). Сырой материал листьев гомогенизировали на льду с 5 мл Na-ацетатного буфера pH 4,5, содержащим 1 М ЭДТА, 15 ммоль CaCl<sub>2</sub> в соотношении 1:5. Осадок клеточных стенок после центрифугирования гомогената при 1000g промывали буфером выделения в 5-кратной повторности для отделения цитоплазматической пероксидазы. Для получения ионно - связанной пероксидазы материал клеточных стенок инкубировали в 2 мл 1 М KCl при 4°C в течение 2 ч при постоянном перемешивании. Надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования при 1000 g в течение 10 мин, использовали для определения активности ионно-связанной пероксидазы (ИСП). Осадок клеточных стенок дважды промывали буфером выделения и инкубировали в течение ночи в 1 мл 1% Тритон X-100 в 0,05 М ацетатном буфере pH=5,4 при 4°C. После центрифугирования супернатант использовали для определения активности ковалентно-связанной пероксидазы (КСП). Измерение активности форм пероксидазы клеточной стенки проводили по методу А.Н. Бояркина (1951). Реакционная смесь содержала 20-30  $\mu$ л ферментного препарата с добавлением 15мМ CaCl<sub>2</sub>. В качестве субстрата реакции использовали бензидин. Реакцию начинали добавлением 15мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Удельную активность пероксидазы рассчитывали в относительных единицах изменения плотности при 470 нм на г сырой массы в минуту.

Для изучения распределения пероксидазы клеточной стенки флаговые листья генотипов пшеницы в фазе цветения сегментировали на зоны длиной 1,5 см от основания листовой пластинки. Выделение и определение активности апопластной пероксидазы в каждой зоне проводили по вышеописанным методикам.

Для определения термостабильности формы пероксидазы ИСП и КСП прогревали в течение 2 часов на водяной бане при температурах 35°C, 45°C, 55°C и 65°C, после чего определяли активность фермента. В качестве контроля использовали активность фермента, определённую при 25°C.

На рисунках и в таблицах представлены средние арифметические данные и ошибка среднего отклонения ( $\pm$ SE). Статистическую значимость различий оценивали по t-тесту.

#### **Результаты и обсуждение**

Если разделить флаговый лист на зоны длиной 1,5 см, начиная от основания листа, то основное свёртывание листа у генотипа Отан приходится на 2-8 зоны, а у генотипа Альба – на 2-6 зоны. Если следовать идее о взаимосвязи локальной активности пероксидазы клеточной стенки и изменении механических свойств клеточной стенки (Thompson et al., 1997), то логичным представляется изучить пространственное распределение ПКС по листовой пластинке исследуемых генотипов. Итак, нашей следующей рабочей гипотезой служило предположение, что пространственное распределение активности ПКС может быть связано с локальным изменением механических свойств клеточной стенки и, как следствие, с различным проявлением свёртывания листа у исследуемых генотипов.

Пространственное распределение активности ИСП по зонам флагового листа показано на рисунке 1.

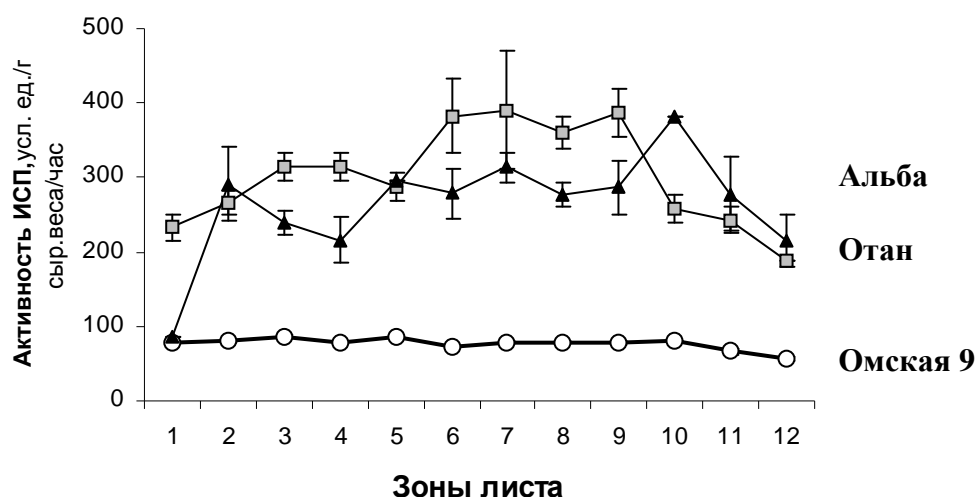


Рис. 1. Пространственное распределение ионно-связанной пероксидазы (ИСП) флаговых листьев сортов пшеницы с признаком свёртывания листа во флаговом листе генотипа Отан, проявляющего наибольшую степень свёртывания, небольшой, но отчётливый пик активности ИСП обнаруживался в 3-4 зонах (4,5-6 см) и более выраженный в 6-9 зонах (9-12,5 см). У генотипа Альба максимальная активность выявлялась в зоне 10, соответствующей 15 см длины листовой пластинки. У родительского сорта Омская 9, не несущего признак свёртывания листа, активность ИСП была значительно ниже чем у сортов Отан и Альба и распределена равномерно по всей длине листовой пластинки.

Пространственное расположение ковалентно-связанной пероксидазы в листьях показало характерный пик активности КСП у сорта Отан в зонах 2-6, в которых активность КСП достоверно превышала таковую сорта Омская 9 (рис. 2).

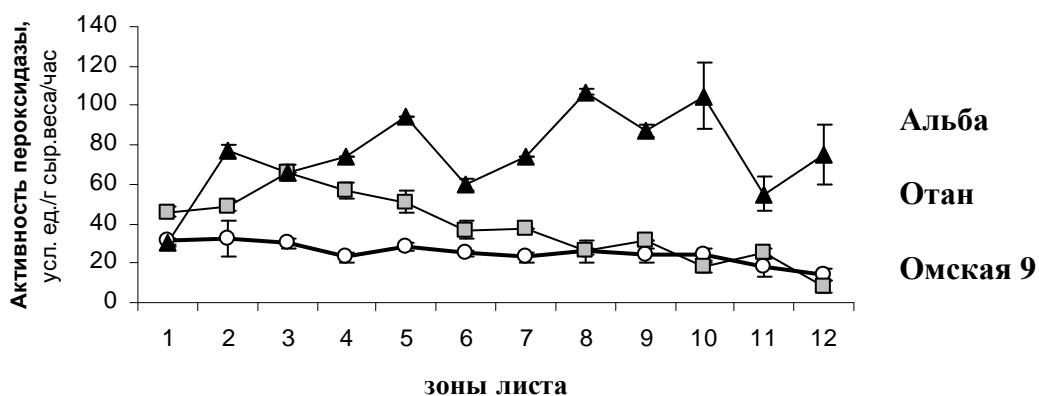


Рис. 2. Пространственное распределение ковалентно-связанной пероксидазы (КСП) флаговых листьев сортов пшеницы с признаком свёртывания листа у сорта Альба активность пероксидазы значительно превышала таковую сортов Отан и Омская 9 во всех зонах флагового листа (рис. 2).

Если следовать идее о взаимосвязи локальной активности пероксидазы клеточной стенки и жёсткости клеточной стенки, которую развивают S.C. Fry (1979), K. Mijamoto (1994), M.A. Vakon (1997), логично предположить, что в нашем случае повышение активности апопластных форм пероксидазы во 2-9 зонах генотипа Отан может быть связано с увеличением жёсткости КС в данных сегментах листа, что, в свою очередь, может быть связано со свёртыванием листовой пластинки. У сорта Альба со средне выраженной степенью свёртывания листа и родительского сорта Омская 9 не было выявлено характерных максимумов активности апопластных форм пероксидазы.

Далее нас интересовала термостабильность ИСП и КСП, выделенной из отдельных зон флагового листа, поэтому мы прогревали обе фракции пероксидазы клеточной стенки

при температурах 45°C и 55°C. Мы выбрали температуру прогрева ферментного препарата 45°C и 55°C, так как именно при этих температурах были выявлены наиболее явные генотипические различия по термостабильности апопластных форм пероксидазы (Sarijeva and Kenjebaeva, 2003). Результаты показали, что у генотипов со свёрнутыми листьями термостабильность ИСП при 45°C варьировала в зависимости от зоны выделения фермента (рис. 3).

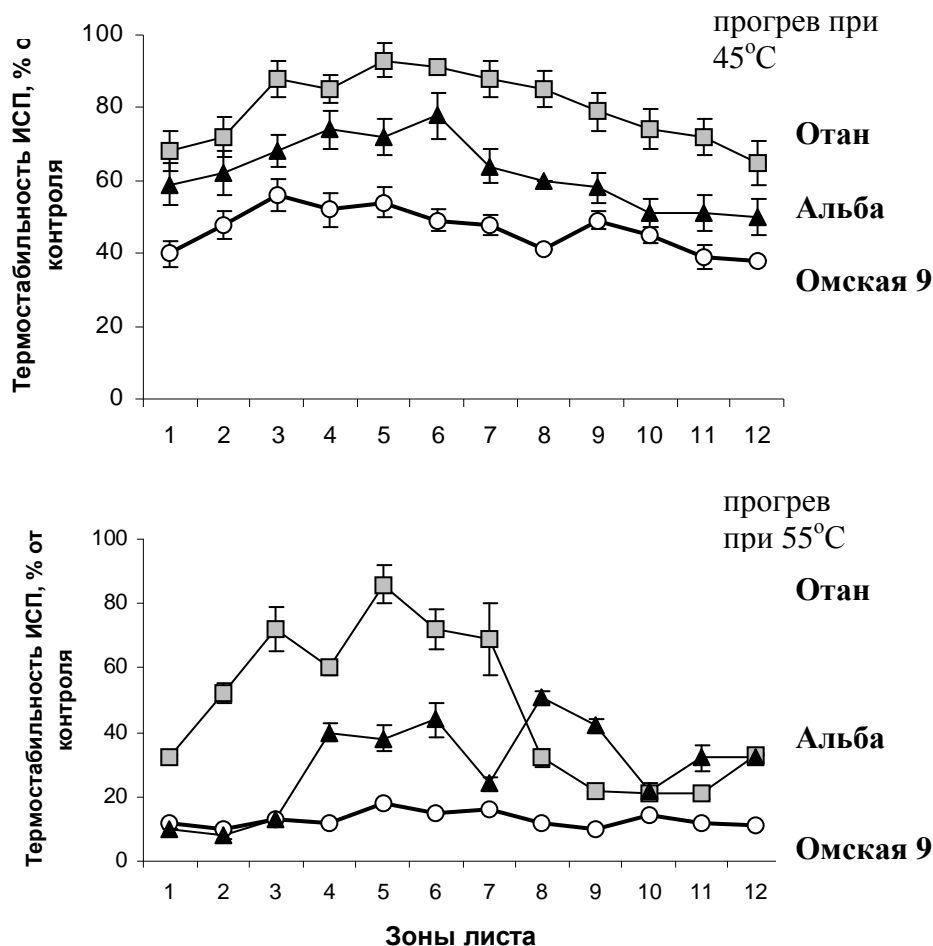


Рис. 3. Термостабильность ионно-связанной пероксидазы (ИСП) флаговых листьев сортов пшеницы с признаком свёртывания листа при температурах 45°C и 55°C

В то же время у родительского сорта различия по термостабильности ИСП между листовыми зонами были незначительными. Наиболее устойчивой к нагреванию у сорта Отан была ИСП, выделенная из 3-10 зон, а у сорта Альба – в 3-6 зонах (рис. 3).

Следующие генотипические различия по термостабильности ИСП были обнаружены после прогрева при 55°C (рис. 3): в некоторых зонах прогрев при 55°C резко снижал активность ИСП (в 1-4 зонах у генотипа Альба и 8-12 у генотипа Отан). В то же время в других сегментах листа высокая температура мало влияла на активность фермента. Вероятно, ИСП в различных зонах генотипов Отан и Альба представлена разнообразным набором изоферментов, которые по-разному реагируют на температурный фактор. Эти различия могут быть обусловлены различной экспрессией генов и физико-химическими свойствами изоферментов: уровнем гликозилирования (Wälti et al., 2002), аминокислотным составом (Савич 1991).

По-видимому, высокая термостабильность общей ИСП генотипа Отан (80% от исходной) при температуре 55°C была обусловлена в основном ИСП, выделенной из 3-7 зон. Вероятно, некоторые изоформы ИСП, представленные в этих зонах, обладают

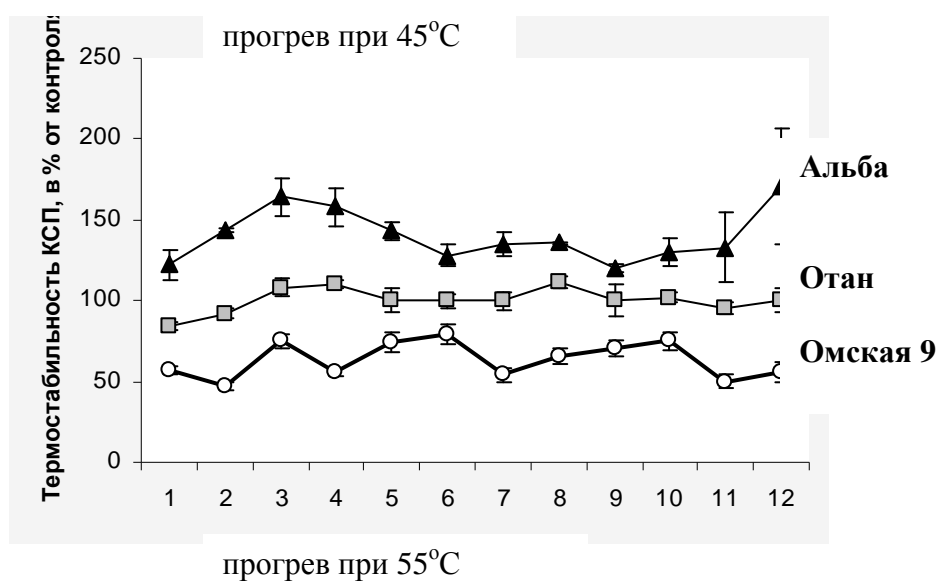
экстремальной устойчивостью к действию высокой температуры. Как уже сказано выше, в литературе имеются сведения о высокой стабильности некоторых изоферментов растворимой пероксидазы томата при температуре 45°C (Ивакин и Грушин, 1986). Сейчас мы не можем утверждать, какими свойствами обусловлена такая термостабильность фермента. Эта проблема требует отдельного изучения.

Несколько иную картину мы получили при прогреве КСП: зональная гетерогенность, характерная для ИСП, была в них не так ярко выражена (рис. 4). Активность КСП при 45 и 55°C была почти равномерно распределена по длине листа у всех генотипов (рис. 4). В то же время КСП, выделенная из листьев генотипов Отан и Альба, была более термостабильной при 45°C, чем ИСП. Увеличение активности КСП на 40 и 16% (рис. 4), по-видимому, связано с изменением физико-химических свойств фермента и может вносить определённый вклад в изменение механических свойств клеточных стенок.

Таким образом, выявлено, что для сортов с введённым признаком свёртывания листа Отан и Альба характерна высокая активность апопластных форм пероксидазы в зонах 3-9. Устойчивость апопластных форм пероксидазы к действию высокой температуры различается в зависимости от зоны выделения. Степень падения активности ионно- и ковалентносвязанных форм пероксидазы при нагреве в интервале температур 35°C - 55°C значительно выше у пероксидазы из листьев сорта Омская 9, не имеющего признак свёртывания листа, по сравнению с сортами Отан и Альба.

Результаты, полученные при определении термостабильности, свидетельствуют, что конформация ферментов, выделенных из листьев сортов пшеницы Отан и Альба с различной степенью свёртывания, такова, что обеспечивает более высокую стабильность в зонах, характеризующихся наибольшим свёртыванием. Увеличение активности апопластных форм пероксидазы в зонах 2-8 листьев сортов Отан и Альба сопровождается изменением термостабильности, что свидетельствует об адаптационной перестройке фермента.

Свёртывание листовой пластинки пшеницы представляется нам сложным механизмом регуляции механо-биохимических свойств клеточной стенки, который, возможно, включает изменение активности и физико-химических свойств пероксидазы клеточной стенки.



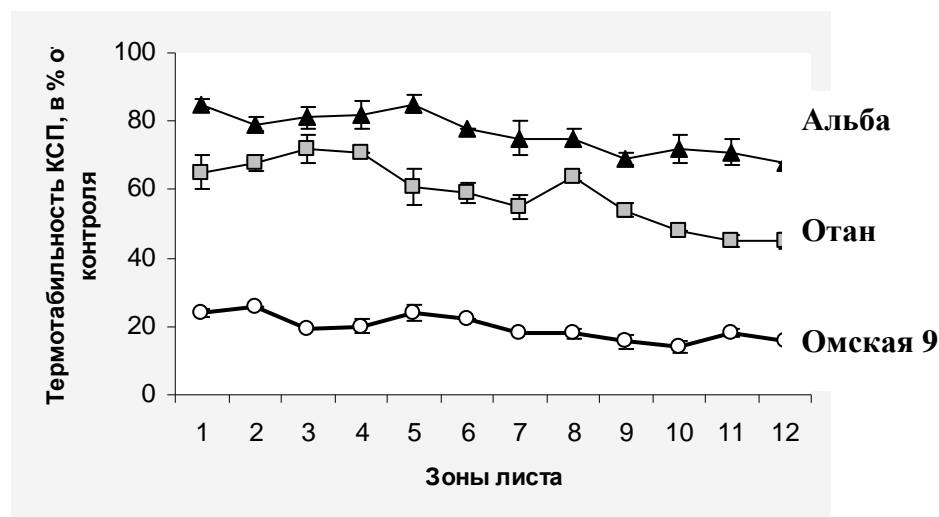


Рис. 4. Термостабильность ковалентно-связанной пероксидазы (КСП) флаговых листьев сортов пшеницы с признаком свёртывания листа при температурах 45°C и 55°C

### Литература

1. Ктиторова И.Н., Скобелева О.В., Шарова Е.И., Ермаков Е.И. Перекись водорода как возможный посредник в снижении гидравлической проводимости корней пшеницы при солевом стрессе // Физиол. Раст., 2002, Т. 49, №3, С. 412-424.
2. McDougall C.I. Accumulation of wall-associated peroxidases during wound-induced suberization of Flax // J. Plant Physiol., 1993, Vol. 142, P. 651-656.
3. Bacon M.A., Thompson D.S., Davies W.I. Can cell wall peroxidase activity explain the leaf growth response of *Lolium t. L.* during drought? // J. Exp. Bot., 1997, Vol. 48, №317, P. 2075-2085.
4. Passioura J.B., Fry S.C. Turgor and cell expansion: beyond the Lockhart equation // Aust. J. Plant Physiol., 1992, V. 19, P. 565-576.
5. Thompson D.S., Wilkinson S., Bacon M.A., Davies W.J. Multiple signals and mechanisms that regulate leaf growth and stomatal behaviour during water deficit // Physiol. Plant., 1997, V. 100, P. 303-313.
6. Fry S.C. Phenolic compounds of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth // Planta, 1979, V. 146, P. 343-351.
7. Everdeen D.S., Kiefer S., Willard J.J., Muldoch E.P., Dey P.M., Lix and Lamport D.T.A. Enzymic cross-linkage of monomeric extensin precursors in vitro // Plant Physiol., 1988, V. 87, P. 616-621.
8. Bruce R.I., West C.A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures of castor bean // Plant Physiol., 1989, V. 91, P. 889-897.
9. Гамбург К.З., Подолякина Л.А., Ситнева В.М. Изучение активности пероксидазы и ИУК-оксидазы в суспензионных культурах тканей табака и сои // Физиол. раст., 1977, Т. 24, № 3, С. 542-548.
10. Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия, 1951, Т.16, С. 4.
11. Mijamoto K., Ueda J., Takeda S., Ida K., Hoson T., Masuda Y., Kamisaka S. Light-induced increase in the contents of ferulic and diferulic acids in cell walls of *Avena coleoptiles*: its relationship to growth inhibition by light // Physiol. Plant., 1994, V. 92, P. 350-355.
12. Sariyeva G.E., Kenjebaeva S.S. Ecophysiological approach of peroxidase activity and thermostability of cell-bound forms in wheat leaves of different morphology // Acta Botanica Hungarica, 2003, V.45, № 3-4, P. 399-407.
13. Wälti M., Samuel R., Feller U. Effects of pH, light and temperature on (1-3, 1-4)- $\beta$ -glucanase stability in wheat leaves // Plant Physiol Biochem., 2002, V. 40, P. 363-371.

14. Савич И.М. Изопероксидазы и полипептиды запасных белков как биохимические маркеры кукурузы, риса и сорго. Автореф. докт. дисс., 1991, Москва, 35 с.
15. Ивакин А.П., Грушин Ф.Ф. Термостабильность пероксидазы у сортов томата, различающихся по жароустойчивости // Физиол. Раст., 1986. -Т. 33, №2, С. 226-234.