УДК: 581.132

Образование перекиси водорода и активность экстраклеточных пероксидаз при введении салициловой кислоты в апопласт листьев пшеницы

Н.Н.Максютова, Л.В.Викторова, Т.В.Трифонова, Е.И.Галеева

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук (Казань, Россия)
maksyutova@yandex.ru

Установлено, что при инфильтрации в листья проростков пшеницы (*Triticum aestivum* L.) салициловой кислоты (0,1 мМ) в апопласте увеличивается содержание перекиси водорода и активность пероксидаз. Выявлен полиморфизм экстраклеточных пероксидаз. Повышение активности пероксидаз происходит как за счет синтеза фермента de novo, так и в результате посттрансляционной активации существовавших молекул.

Ключевые слова: *Triticum aestivum L., листья, апопласт, салициловая кислота, перекись водорода, пероксидаза.*

Production of hydrogen peroxide and extracellular peroxidase activity following introduction of salicylic acid into apoplast of wheat leaves

N.N.Maksyutova, L.V.Viktorova, T.V.Trifonova, E.I.Galeeva

Infiltration of salicylic acid (0.1 mM) into the leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings increased the content of hydrogen peroxide and peroxidase activity in the leaf apoplast. Polymorphism of extracellular peroxidases has been shown. The increase of peroxidase activity was due to enzyme synthesis de novo as well as to the post-translational activity of the existing molecules.

Key words: *Triticum aestivum L., leaves, apoplast, salicylic acid, hydrogen peroxide, peroxidase.*

Введение

Развитие стрессовых воздействий в растительных клетках сопровождается каскадом ответных реакций: падением ионного потенциала, выходом ионов K^+ и Cl^- из клеток, увеличением pH внешнего раствора, изменениями дыхания, метаболизма структурных липидов, увеличением продукции активных форм кислорода (АФК) (Минибаева, Гордон, 1990). АФК, в частности супероксидный радикал $O_2^{\bullet -}$ и перекись водорода, принимают участие в регуляции метаболизма, морфологии и развития клеток растений в качестве сигнальных молекул (Gechev et al., 2006). Содержание АФК находится под многоуровневым контролем ферментов антиоксидантной системы. Основную роль в элиминации АФК играют супероксиддисмутаза, которая снижает концентрацию супероксида (Мерзляк, 1989), а также каталаза, пероксидаза и ферменты, включенные в аскорбат-глутатионовый цикл, устраняющие избыток перекисей (Scandalios, 1993). Вызвать окислительный стресс, характеризующийся повышением концентрации АФК, помимо инфекции и разнообразных абиотических факторов, могут также соединения, являющиеся внутриклеточными мессенджерами. В растительных клетках к таким эффектам может приводить, например, салициловая кислота (СК). СК способна изменять про–/антиоксидантное равновесие в результате активации пероксидаз, ответственных за стресс-индуцируемое образование АФК (Колупаев и др., 2004).

В отличие от достаточно подробно изученных внутриклеточных антиоксидантных ферментов, работающих в разных клеточных компартментах – хлоропластах, митохондриях, цитозоле, пероксисомах (Mitteler, 2002), защита от АФК в апопласте менее исследована, несмотря на огромную важность данного компартмента. Компоненты апопластной жидкости координируют события, имеющие место в клеточной стенке и на поверхности плазмалеммы, играя центральную роль в метаболизме и сигнальной трансдукции, регулируя физиологические процессы, такие как клеточное растяжение, дифференциацию, устойчивость к патогенной атаке (Diaz-Vivancos et al., 2006). Во многих случаях стимулы окружающей среды воспринимаются не напрямую клеткой, а через изменения в апопласте, являющимся в биохимическом отношении активной зоной.

Исходя из вышесказанного, целью данной работы являлось изучение образования перекиси водорода и активности экстраклеточных пероксидаз при введении салициловой кислоты в апопласт листьев пшеницы.

Материалы и методы

Объектом исследования служили листья 8-дневных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Дар Зерноградa, выращенные в кюветах при 23°С и 12-часовом светопериоде с освещенностью 100 W/м^2.

Срезанные под водой листья под давлением 80 кПа в течение 15 мин инфильтрировали раствором салициловой кислоты (0,1 мМ) или же выдерживали проростки на данном растворе в течение 24 часов с последующим инфильтрированием. В опыте с ингибитором синтеза белка растения выдерживали (24 ч.) на растворе, содержащем 0,1 мМ СК и 0,1 мМ циклогексимида. В качестве контроля использовались растения, листья которых инфильтрировались дистиллированной водой. pH вводимого раствора доводили до 6,0. Содержимое апопласта извлекали с помощью центрифугирования в течение 10 мин при + 4°С и 600 g (r_{cp} 6 см).

Содержание перекиси водорода определяли с использованием ксиленола оранжевого при длине волны 560 нм (Gay, Gebicki, 2000). Активность внеклеточных пероксидаз (КФ 1.11.1.7.) измеряли по увеличению оптической плотности при 590 нм в реакционной смеси, состоящей из равных частей 0,2 М ацетатного буфера (pH 5,2), 5 мМ бензидина, 90 мМ H_2O_2 и исследуемой апопластной жидкости. Реакцию начинали внесением H_2O_2. Контролем для измерений служила реакционная среда, где H_2O_2 заменяли дистиллированной водой. Активность пероксидаз рассчитывали по методу Бояркина (1951). Определение цитоплазматического загрязнения апопластной жидкости проводили по активности маркерного цитоплазматического белка глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы (Кочетов, 1980). Содержание белка измеряли по Бредфорд (Bradford, 1976).

Белки апопластной жидкости разделяли с помощью нативного электрофореза в вертикальном 6–16%-ном градиентном ПААГ по Laemmli (1970) (исключая из растворов Ds-Na и 2-меркаптоэтанол). Наличие изопероксидаз в геле выявляли путем его окрашивания 0,05 М бензидином в 0,2 М ацетатном буфере (pH 5,2) и 30 мМ перекисью водорода (Хавкин, Забродина, 1995). Белковая нагрузка на трек составляла 0,45 мкг.

Опыты проводили в 3 биологических повторностях, каждый вариант имел 4–5-кратную аналитическую повторность. Результаты были статистически обработаны с применением t-критерия Стьюдента (с проверкой на нормальность распределения). Данные представлены как средние значения и стандартные ошибки среднего. Различия считали значимыми при $P<0,05$.

Использованные реактивы: ксиленол оранжевый, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, персульфат аммония (Sigma, США), глицин, акриламид (Panreac, Испания), кумасси G-250 (AppliChem, Германия), остальные реактивы марки х.ч. или ч.д.а. (Россия).

Результаты и обсуждение

Продукция АФК и активация антиоксидантных ферментов является результатом быстрых сигнальных реакций. По времени они располагаются между самыми ранними процессами, такими как стимуляция ионных потоков через плазмалемму, и более поздними изменениями в экспрессии генов. Всплеск образования активных форм кислорода при действии элиситора или при инфицировании уже через 5–15 мин достигает 80% от максимального уровня (Тарчевский, 2002; Минибаева, Гордон, 2003).

Перекись водорода относят к вторичным мессенджерам, передающим сигнал от межклеточных сигнальных молекул и их мембранных рецепторов на внутриклеточные регуляторные системы, в результате чего индуцируется каскад защитных реакций растений (Гамалей, Клюбин, 1996). Введение салициловой кислоты в межклеточное пространство листьев проростков пшеницы в течение 15 минут повышало содержание перекиси водорода в апопласте более чем в 2 раза (рис. 1*А*), что может свидетельствовать о развитии окислительного стресса. Повышенное содержание H_2O_2 под влиянием СК показано на разных растительных объектах. Например, обработка суспензионных клеток соевых бобов (*Glycinea max* cv Williams 82) в отсутствие патогена экзогенной салициловой кислотой (10–100 мкМ) стимулировала накопление H_2O_2 (Shirasu et al., 1997), предобработка СК (0,05 мМ) вызывала увеличение концентрации перекиси водорода в среде инкубации корней проростков пшеницы (Сахабутдинова и др., 2004). Считается, что салициловая кислота перекрывает основной расходный канал баланса H_2O_2, ингибируя активность каталазы – фермента, детоксицирующего перекись водорода, и способствует ее накоплению и развитию окислительного взрыва (Тарчевский, 2002). Показано, что H_2O_2 и СК имеют близкие расстояния между водородными атомами гидроксильных групп – 2,62 и 2,56 Å соответственно, из чего следовало, что салициловая кислота может связываться с активным центром каталазы, выступая в роли конкурентного ингибитора в реакции разложения перекиси водорода (Тарчевский и др., 1999).

В результате 24-часового действия СК происходило значительное снижение содержания перекиси водорода в апопласте по сравнению с 15-минутным воздействием (рис. 1*А*). Как известно из

данных литературы, окислительный взрыв, вызванный действием элиситоров на клетки растений, носит преходящий характер, проявляющийся в постепенном возврате концентрации перекиси водорода к исходному уровню (Levine et al., 1994). Это может быть вызвано как снижением активности НАДФН-оксидазы, в результате чего уменьшается приходная часть баланса перекиси водорода, так и усилением расходной части этого баланса, в частности, использованием H_2O_2 в пероксидазных реакциях.

Благодаря своим свойствам и разнообразию молекулярных форм экстраклеточные пероксидазы (пероксидазы III класса) представляют собою одну из ключевых защитных систем, «спасающих» клетки от разрушительного влияния перекиси водорода при действии на растение различных стрессовых факторов. С другой стороны, пероксидазы апопласта могут проявлять оксидазную активность и генерировать супероксиданион или перекись водорода при физиологических pH (Minibayeva et al., 2009).

Окислительная функция пероксидаз реализуется при наличии соответствующего восстановителя и подщелачивании pH апопласта (Almagro et al., 2009). По имеющимся в литературе сведениям, доля пероксидаз во внеклеточном пространстве достаточно высока. Например, обнаружено, что среди белков, секретируемых во внешнюю среду культурой клеток табака, из шести мажорных белков три являлись изоферментами пероксидазы (Okushima et al., 2000). Свободные и слабосвязанные с клеточной стенкой пероксидазы являются наиболее чувствительными к различным стрессовым воздействиям формами фермента.

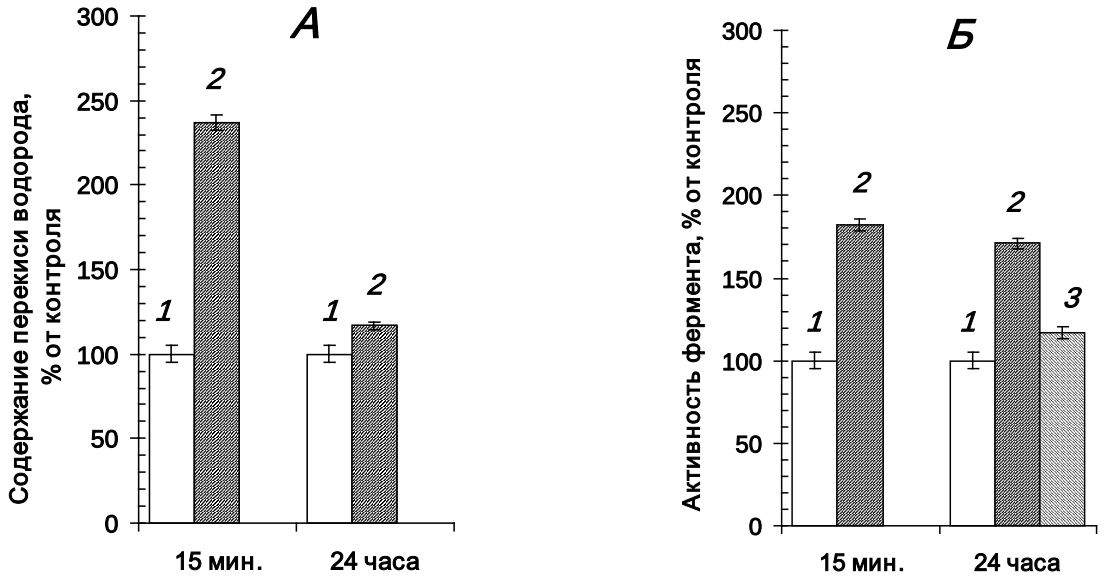

Рис. 1. Влияние салициловой кислоты на содержание перекиси водорода (*А*) и активность экстраклеточной пероксидазы (*Б*). *1* – контроль (H_2O), *2* – СК (0,1 мМ), *3* – СК (0,1 мМ) + ЦГ (0,1 мМ)

При 15-минутном введении в апопласт салициловой кислоты наблюдалось увеличение пероксидазной активности (рис. 1*Б*). Через 24 часа действия СК активность фермента немного снизилась, но продолжала оставаться на высоком по сравнению с контролем уровне. Учитывая наличие лишь следовых количеств цитоплазматического загрязнения (ниже 0,3%), мы полагаем, что изменение в активности экстраклеточных пероксидаз не обусловлено выходом ферментов из клетки при получении апопластной жидкости. Предполагается, что салицилат может действовать как слабый детергент, изменяющий электрический заряд плазмалеммы, способствуя освобождению слабосвязанных с клеточной стенкой изоформ пероксидазы в апопластное пространство корней пшеницы (Минибаева, Гордон, 2003).

По мнению многих авторов, пероксидаза представляет собой «семейство» генетически различающихся ферментов, выполняющих различные функции in vivo. Характерной особенностью пероксидаз является наличие множественных молекулярных форм, отличающихся по ряду физико-

химических свойств, локализации и др. При анализе спектра экстраклеточных пероксидаз было обнаружено 11 изоформ. По сравнению с контрольным вариантом салицилат увеличивал активность изоформ с электрофоретической подвижностью R_F 0,12, 0,21, 0,28, 0,78, 0,80, 0,82 и приводил к снижению активности компонентов 0,42, 0,47, 0,50 (рис. 2*А*). При 24-часовом воздействии элиситора наблюдалось усиление активности изоформ R_F 0,12, 0,21, 0,28, 0,36, 0,42, 0,47, 0,50 и некоторое уменьшение активности изоформ с высокой подвижностью R_F 0,78, 0,80, 0,82 (рис. 2*Б*).

Свободно-радикальные процессы, протекающие в межклеточном пространстве, могут изменять pH среды, и, соответственно, приводить к изменению активности ферментов в апопласте (Минибаева, Гордон, 2003). Необходимо учитывать, что изменение pH апопласта относится к числу ранних реакций в ответ на стрессовые воздействия (Otte et al., 2001). Одним из механизмов действия салициловой кислоты является ее способность быть протонофором и вызывать снятие протонного градиента на мембране (Скулачев, 1999), приводя к сдвигу pH в апопласте (Гордон и др., 2002). Изменение pH определяет соотношение пероксидазной и оксидазной активностей пероксидаз. Так, было показано, что пероксидаза клеточной стенки, способная к образованию перекиси водорода при нейтральном pH, восстанавливала свою пероксидазную функцию при смещении pH окружающего раствора в кислую сторону (Blee et al., 2001).

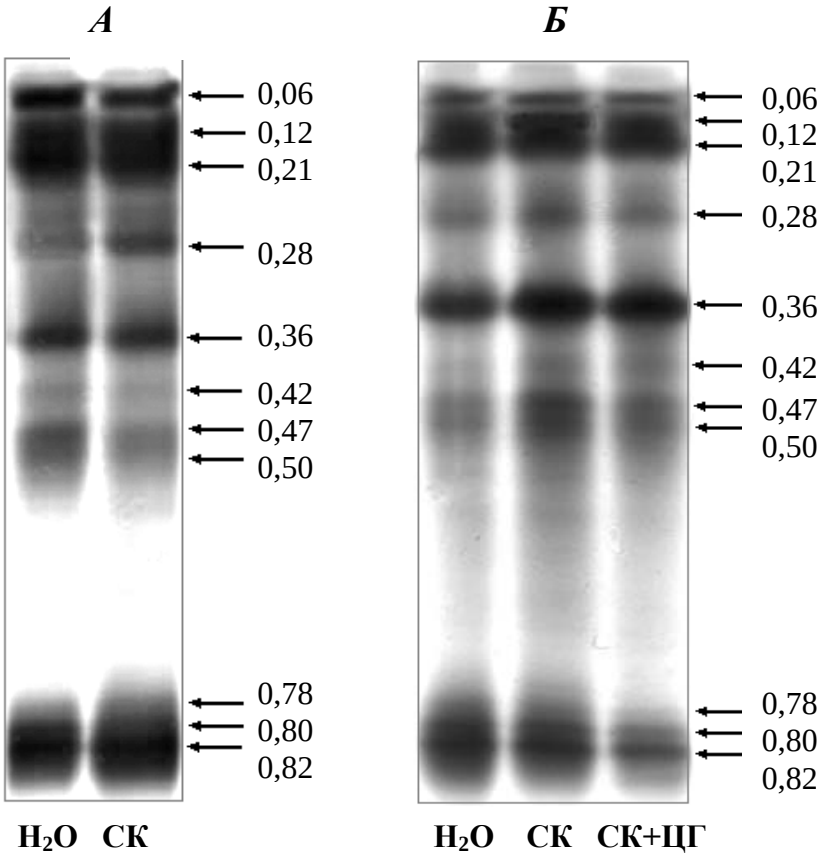

Рис. 2. Изменение спектра экстраклеточных пероксидаз при действии салициловой кислоты (0,1 мМ) и циклогексимида (0,1 мМ). *А* – 15 мин, *Б* − 24 ч. Стрелками указано положение на геле изоформ фермента с различной электрофоретической подвижностью

Обнаруженное увеличение пероксидазной активности при 15-минутном введении салицилата в апопласт может происходить за счет посттранскрипционной и посттрансляционной активации ранее синтезированных молекул фермента (Van Engelen et al., 1991). Наряду с этим при более длительном изменении состава апопластной жидкости салицилатом (24 часа), по-видимому, возможен и синтез ферментов de novo. Для проверки выдвинутого предположения использовался ингибитор синтеза белков – циклогексимид (ЦГ). Выращивание проростков на растворе салициловой кислоты с добавлением ЦГ (0,1 мМ) проводили в течение суток. Действительно, циклогексимид снимал

вызванное введением салициловой кислоты увеличение активности фермента, но не полностью (рис. 1*Б*).

Анализ изоферментного спектра выявил, что в присутствии циклогексимида интенсивность окрашивания некоторых полос изоэнзимов пероксидазы (R_F 0,12, 0,28, 0,36, 0,47, 0,50), усилившаяся при действии салициловой кислоты, была слабее (рис. 2*Б*), что, по-видимому, свидетельствует о возможности синтеза фермента de novo.

Таким образом, непосредственное введение в межклеточное пространство СК, являющейся индуктором неспецифической устойчивости растений, приводило к повышению содержания H_2O_2 и изменению пероксидазной активности в апопласте листьев, что играет важную роль в передаче сигнала и обеспечении протекания биохимических процессов, связанных с защитой растений при действии стрессоров различной природы.

Список литературы

Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. – 1951. – Т.16. – С. 352–357.

Гамалей И.А., Клюбин И.В. Перекись водорода как сигнальная молекула // Цитология. – 1996. – Т.38. – С. 1233–1247.

Гордон Л.Х., Минибаева Ф.В., Огородникова Т.И. и др. Салициловая кислота вызывает диссипацию протонного градиента на плазмалемме растительных клеток // ДАН. – 2002. – Т.387. – С. 839–841.

Колупаев Ю.Е., Акинина Г.Е., Карпец Ю.В., Паталах И.И. Зависимость влияния экзогенного салицилата на активность гваяколпероксидазы и теплоустойчивость колеоптилей пшеницы от состояния Ca^{2+}-каналов // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2004. – Вип.5, №5. – С. 52–56.

Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М.: Высшая школа, 1980. – 272с.

Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. – М.: ВИНИТИ, 1989. – Т.6. – С. 1–168.

Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Особенности действия ионов кальция и кальциевого ионофора А23187 на мембранный потенциал и дыхание клеток корней пшеницы // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1990. – Т.22. – С. 225–230.

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

Сахабутдинова А.Р., Фатхутдинова Д.Р., Шакирова Ф.М. Влияние салициловой кислоты на активность антиоксидантных ферментов у пшеницы в условиях засоления // Прикл. биохимия и микробиол. – 2004. – Т.40. – С. 579–583.

Скулачев В.П. Эволюция, митохондрия и кислород // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – №9. – С. 4–10.

Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. – М.: Наука, 2002. – 294с.

Тарчевский И.А., Максютова Н.Н., Яковлева В.Г., Гречкин А.Н. Янтарная кислота – миметик салициловой кислоты // Физиология растений. – 1999. – Т.46. – С. 23–28.

Хавкин Э.Е., Забродина М.В. Органоспецифичные спектры пероксидаз у кукурузы // Физиология растений. – 1995. – Т.42. – С. 281–289.

Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions // J. Exp. Bot. – 2009. – Vol.60. – P. 377–390.

Blee K.A., Jupe S.C., Richard G. et al. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (Phaseolus vulgaris L.) and related members // Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol.47. – P. 607–620.

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol.72. – P. 248–254.

Diaz-Vivancos P., Rubio M., Mesonero V. et al. The apoplastic antioxidant system in Prunus: response to long-term plum pox virus infection // J. Exp. Bot. – 2006. – Vol.57. – P. 3813–3824.

Gay C., Gebicki J.M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay // Anal. Biochem. – 2000. – Vol.284. – P. 217–220.

Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M. et al. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death // Bioessays. – 2006. – Vol.28. – P. 1091–1101.

Laemmli N.K. Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage // Nature. – 1970. – Vol.227. – P. 680–685.

Levine A., Tenkhaken R., Dixon R., Lamb C. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistase response // Cell. – 1994. – Vol.79. – P. 583–593.

Minibayeva F., Kolesnikov O., Chasov A. et al. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species // Plant Cell Environ. – 2009. – Vol.32. – P. 497–508.
Mitteler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sci. – 2002. – Vol.7. – P. 405–409.
Okushima Y., Koizumi N., Kusano T., Sano H. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis–related proteins // Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol.42. – P. 479–488.
Otte O., Pachten A., Hein F., Barz W. Early elicitor-induced events in chickpea cells: functional links between oxidative burst, sequential occurrence of extracellular alkalization and acidification, K^+/H^+ exchange and defence-related gene activation // Z. Naturforsch [C]. – 2001. – Vol.56 (1–2). – P. 65–76.
Scandalios J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases // Plant Physiol. – 1993. – Vol.101. – P. 7–12.
Shirasu K., Nakajima H., Krishnamachari Rajasekham V. et al. Salicylic acid potential an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms // Plant Cell. – 1997. – Vol.9. – P. 261–270.
Van Engelen F.A., Sterk P., Booji H. et al. Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells // Plant Physiol. – 1991. – Vol.96. – P. 705–712.

Представлено: О.В.Асафовою / Presented by: O.V.Asafova
Рекомендовано до друку: В.П.Комарістою / Recommended for publishing by: V.P.Komaristaya
Подано до редакції / Received: 9.07.2009.

© Н.Н.Максютова, Л.В.Вікторова, Т.В.Тріфонова, К.І.Галєєва, 2009
© N.N.Maksyutova, L.V.Viktorova, T.V.Trifonova, E.I.Galeeva, 2009