

ORIGINAL ARTICLE

**PATHOGEN IMPACT ON THE ACTIVITY DYNAMICS OF POTATO
SUSPENSION CELLS EXTRA-CELLULAR PEROXIDASE**

I.A. Graskova, I.V. Antipina, O.Y. Potapenko, V.K. Voinikov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk

tel.: (395-2)42-50-09, fax: (395-2)51-07-54, e-mail: graskova@sifibr.irk.ru;

Received May 13, 2005

Received in revised form July 6, 2005

Abstract— Changes in the activity of extracellular peroxidases were measured in cell suspension cultures of potato infected by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kotth.) Skapt et Burkh. The total extracellular peroxidases activity of the resistant potato variety was higher than that of the sensitive variety both before and after infection. The enzyme of the resistant variety had a pH optimum of 6.2, while that of the sensitive variety was 5.4. Extracellular peroxidases of the sensitive potato variety were activated 10 minutes after infection, and displayed highest activity 1.5-2 hours later. In the resistant variety, peroxidase activity rose sharply in the first minutes of infection, and second peak of activity occurred 1.5-2 hours later. The increase of extracellular peroxidases activity of the sensitive potato variety under pathogenesis is connected with the change of genome expression and synthesis of proteins. The increase of enzyme activity of resistant potato variety in the first moments of infection is not related to proteins synthesis and is apparently conditioned by the change of kinetic parameters.

Key words: Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus – pathogenesis – extra cellular peroxidases – Solanum tuberosum.

ORIGINAL ARTICLE

**ВЛИЯНИЕ ПАТОГЕНА НА ДИНАМИКУ АКТИВНОСТИ
ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ СУСПЕНЗИОННЫХ КЛЕТОК
КАРТОФЕЛЯ****И.А. Граскова, И.В. Антипина, О.Ю. Потапенко, В.К. Войников***Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского Отделения
Российской Академии наук. 664033 Иркутск, а/я1243, ул. Лермонтова, 132*

tel.: (395-2)42-50-09, fax: (395-2)51-07-54, e-mail: graskova@sifibr.irk.ru;

Поступила в редакцию 13 мая 2005 г.

Изучали динамику активности внеклеточных пероксидаз картофеля при патогенезе *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kotth.) Skapt et Burkh. Установлено, что активность внеклеточных пероксидаз устойчивого сорта картофеля выше, чем восприимчивого как в контроле, так и после инфицирования. Наибольшую активность фермент устойчивого сорта имеет при pH 6.2, а восприимчивого – при pH 5.4. Через 10 мин после инфицирования происходит активация внеклеточных пероксидаз восприимчивого сорта картофеля. Наибольший пик активности фермента наблюдается через 1.5 – 2 часа после инфицирования. Резкое повышение активности фермента устойчивого сорта происходит в первые минуты инфицирования. Второй пик активности фермента наблюдается через 1.5 – 2 часа после инфицирования. Повышение активности внеклеточных пероксидаз восприимчивого сорта картофеля при патогенезе связано с изменением экспрессии генома и с синтезом соответствующих белков. Повышение активности фермента устойчивого сорта картофеля в первые моменты инфицирования не связаны с синтезом белков и обусловлено, вероятно, изменением кинетических параметров.

Key words: Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus – pathogenesis – extra-cellular peroxidases – Solanum tuberosum.

Действие патогена на растительный организм вызывает значительные изменения метаболизма растений. Одной из характерных реакций клетки на заражение является так называемый окислительный взрыв – образование активных форм кислорода (АФК) (H_2O_2 , супероксидных радикалов и др.). Быстрая продукция активных форм кислорода, связанная с окислительным взрывом, выступает одной из наиболее ранних ответных реакций растительных клеток на заражение патогеном (Аверьянов, 1991, Минибаева, Гордон, 2003). АФК сами по себе токсичны для патогена и, кроме того, могут служить вторичными мессенджерами при активации генов, экспрессирующих защитные белки (Аверьянов, 1991, Дмитриев, 2003). В образовании АФК при действии патогенов, кроме НАДФН – оксидазы, могут вносить вклад и другие ферменты, например, пероксидаза, локализованная в клеточной стенке (Минибаева, Гордон, 2003; Kawano, 2003). Усиленная активация пероксидазы в ответ на заражение наблюдается у разных видов растений и при разных по природе инфекционных процессах

(грибных, бактериальных, вирусных болезнях и т.д.). Ранее нами были получены данные, что увеличение активности пероксидазы в клетках картофеля зависело от восприимчивости сортов картофеля к патогену: в тканях устойчивого сорта фермент активировался в большей степени, чем в тканях восприимчивого сорта (Граскова и др., 2001). Известно, что в ответ на грибные (Bolwell et al., 1999), вирусные и бактериальные (Граскова и др., 2003) заражения происходит индукция защитной активности внеклеточной пероксидазы в растениях. Имеются сведения, что пероксидаза клеточной стенки ответственна за продукцию перекиси в реакции окислительного взрыва в ответ на действие элиситора из патогенного гриба в клетках фасоли (Bolwell et al., 1999). Данных об изменении активности внеклеточных пероксидаз в ответ на заражение бактериями очень мало, поэтому были проведены исследования слабо-связанных с клеточной стенкой пероксидаз в суспензионных клетках картофеля при их заражении патогеном. В настоящей работе была исследована динамика активности внеклеточных пероксидаз при заражении вирулентным штаммом 5369

кольцевой гнили двух контрастных по устойчивости сортов картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Эксперименты проводили на суспензионных культурах клеток картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сортов Луговской (устойчивый к патогену) и Лукьяновский (восприимчивый к патогену). Пробирочные растения выращивали из черенков на агаризированной МС-среде с добавлением гормонов и витаминов (Бутенко и др., 1984).

Суспензионные культуры клеток получали из каллусов, выращенных из листовых тканей тех же сортов картофеля. В 100 мл жидкой питательной МС-среды с добавлением гормонов и витаминов (Бутенко и др., 1984) помещали 2-5 мг каллусной ткани и выращивали при постоянном встряхивании до получения суспензионных культур.

Бактериальный материал. Использовали штамм 5369 (вирулентный, агрессивный) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kothh.) Skapt et Burkh., полученный из НИИ картофельного хозяйства (пос. Коренево, Московская обл.). Бактерии культивировали на картофельном агаре с 1.5% глюкозой 5-6 дней. Затем их культивировали стационарно в течение трех суток при 25°C на жидкой питательной среде, содержащей 10 % дрожжевого экстракта ("Sigma"), 1.5% глюкозы.

Сокультивирование суспензионных тканей клеток картофеля с бактериями. В первом варианте к суспензионным культурам тканей клеток картофеля добавляли 1 мл свежеприготовленной бактериальной суспензии (2×10^8 кл/мл) и культивировали в течение 3 часов при температуре 25°C. Во втором варианте вместе с бактериями добавляли циклогексимид (ингибитор белкового синтеза) в конечной концентрации 5 мг/л (Граскова и др., 2001). В третьем варианте – а-аманитин (специфический ингибитор РНК-полимеразы II) в конечной концентрации 0.01 мг/л. Контрольный вариант суспензионных культур (без патогена) также культивировали с ингибиторами. Отборы проб проводили через каждые 5 мин в течение первого часа и через 30 мин в последующие 2 часа.

Определение пероксидазной активности. Для экстракции внеклеточных пероксидаз навески по 1 г суспензионных тканей картофеля помещали в шприц, заливали 10 мл холодного цитратно-фосфатного буфера (0.1 М, pH 6.2- устойчивый сорт, pH 5.4 – восприимчивый сорт) и дважды выдерживали при вакуумной фильтрации в течение 1 мин. В фильтрате определяли пероксидазную активность (Паду, 1995). Для этого измеряли увеличение оптической плотности при 580 нм в реакционной смеси из 0.5 мл 0.1 М

цитратно-фосфатного буфера (pH 6.2 и 5.4), 0.5 мл 0.3% H_2O_2 и 0.5 мл 0.05% гваякола ("Sigma"). Активность фермента рассчитывали по методу Бояркина (Бояркин, 1954). Количество белка определяли по методу Lowry (Lowry et al., 1951).

Определение оптимума pH пероксидазной активности. Из суспензионных тканей обоих сортов картофеля брали навески по 1 г, выделяли внеклеточные пероксидазы в 10 мл 0.1 М цитратно-фосфатного буфера, варьируя pH от 4.0 до 7.0, и измеряли активность внеклеточной пероксидазы. Культивирование с патогеном проводили в течение двух часов и затем выделяли внеклеточные пероксидазы и измеряли их активность.

Было проведено три независимых эксперимента с пятью аналитическими повторностями в каждом. На рисунках указаны средние значения и стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Было установлено, что наиболее высокое значение активности внеклеточной пероксидазы у устойчивого сорта Луговской было при pH 6.2 (рис.1). Для клеток восприимчивого сорта Лукьяновский были установлены два небольших увеличения активности внеклеточной пероксидазы при pH 4.4 и 5.4 (рис.1).

При заражении суспензионных клеток устойчивого сорта Луговской уровень активности внеклеточных пероксидаз увеличивался примерно вдвое по сравнению с контролем, и наибольшая активность фермента отмечалась при pH 5.0 и 6.2. Так как уровень активности фермента при pH 6.2 был выше, то дальнейшие измерения проводили при pH 6.2.

При совместном культивировании клеток восприимчивого сорта Лукьяновский с вирулентным штаммом 5369 кольцевой гнили также наблюдали увеличение активности фермента, но она была значительно ниже, чем в случае с устойчивым сортом картофеля. Дальнейшие измерения активности внеклеточных пероксидаз сорта Лукьяновский проводили при pH 5.4.

Для изучения влияния *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* на активность внеклеточных пероксидаз был определен уровень их активности после трех часов культивирования клеток с вирулентным штаммом 5369 кольцевой гнили. Активность внеклеточных пероксидаз у обоих сортов картофеля в контрольном варианте не изменялась в течение трех часов (рис. 2, 3). При культивировании суспензионных клеток картофеля сорта Лукьяновский с патогеном повышение активности внеклеточного фермента наблюдали через 10 минут культивирования и

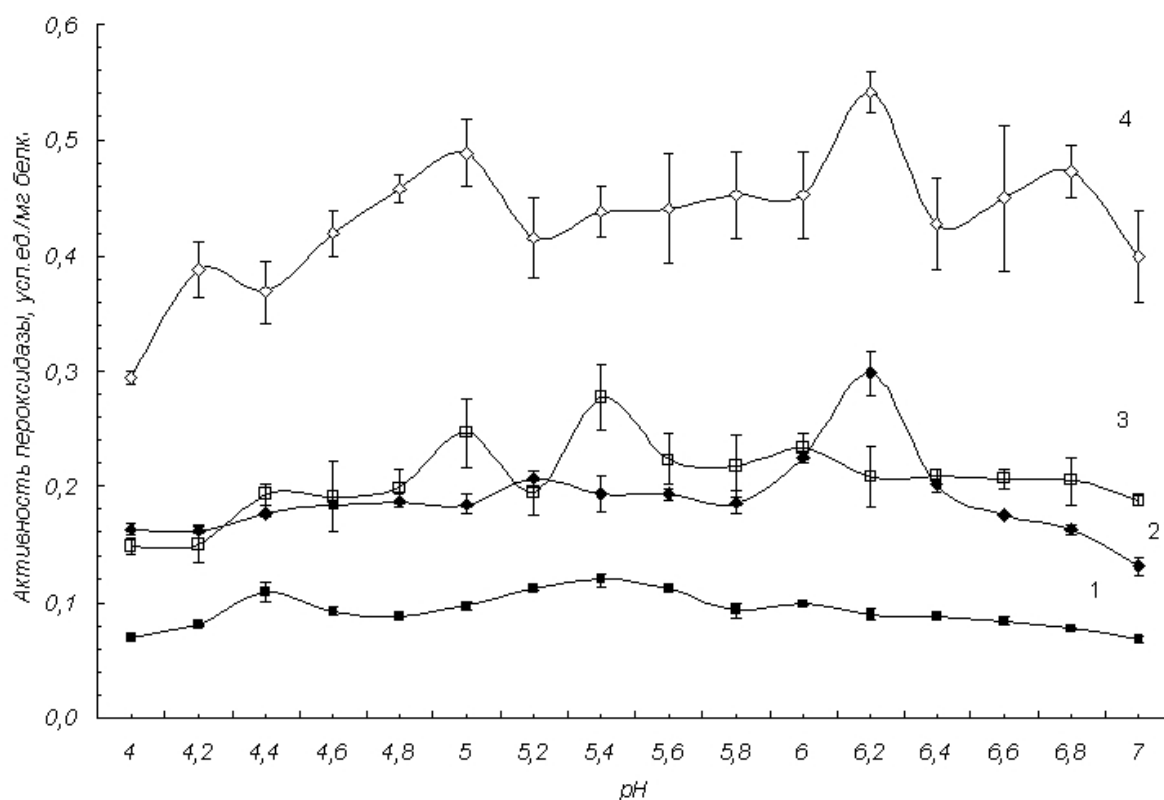


Рис. 1. Влияние pH буфера на активность внеклеточных пероксидаз суспензионных клеток картофеля. 1— Лукьяновский (восприимчивый сорт картофеля), контроль (без патогена); 2- Луговской (устойчивый сорт картофеля), контроль (без патогена); 3— Лукьяновский в присутствии патогена; 4- Луговской в присутствии патогена. Даны стандартные ошибки измерений.

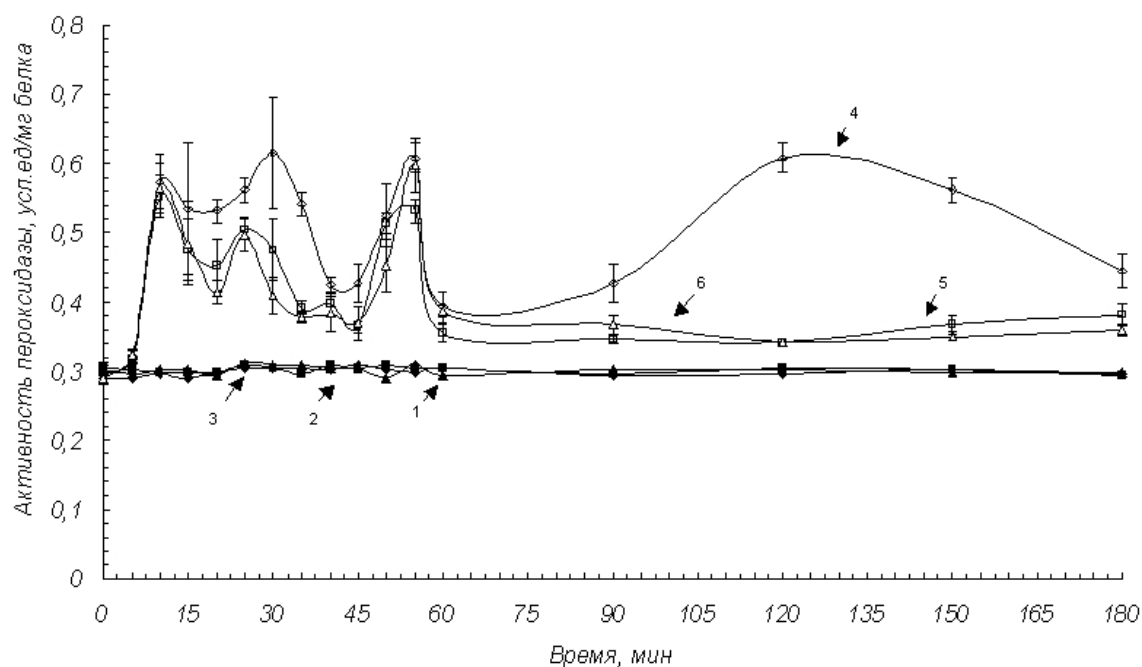


Рис. 2. Динамика активности внеклеточной пероксидазы суспензионных клеток картофеля восприимчивого сорта Лукьяновский.

1- контроль, без патогена и ингибиторов; 2- контроль, без патогена + циклогексимид; 3- контроль, без патогена + α-аманитин; 4- суспензионные клетки картофеля + патоген; 5- суспензионные клетки картофеля + патоген + циклогексимид; 6- суспензионные клетки картофеля + патоген + α-аманитин. Даны стандартные

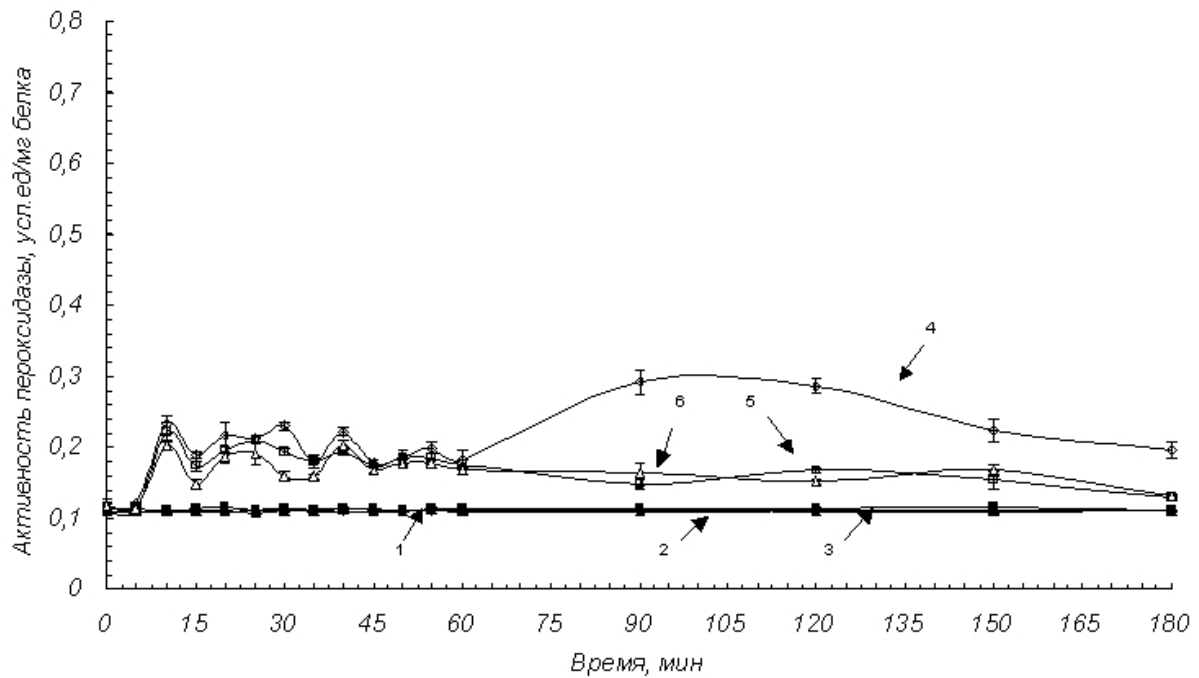


Рис. 3. Динамика активности внеклеточной пероксидазы суспензионных клеток картофеля устойчивого сорта Луговской.

1- контроль, без патогена и ингибиторов; 2- контроль, без патогена + циклогексимид; 3- контроль, без патогена + α-аманитин; 4- суспензионные клетки картофеля + патоген; 5- суспензионные клетки картофеля + патоген + циклогексимид; 6- суспензионные клетки картофеля + патоген + α-аманитин. Даны стандартные ошибки измерений.

через 1.5 – 2.5 ч. Активность пероксидазы во втором пике была выше, чем в первом.

Увеличение активности внеклеточной пероксидазы при заражении кольцевой гнилью может зависеть от синтеза фермента *de novo* (Граскова и др., 2001). Добавление ингибитора белкового синтеза (циклогексимид) и ингибитора синтеза мРНК (α-аманитин) в среду культивирования контрольных суспензионных клеток сорта Лукьяновский не влияло на уровень активности внеклеточной пероксидазы (рис.2). Совместное культивирование суспензионных клеток с патогеном и ингибиторами (циклогексимид, α-аманитин) привело к снижению уровня активности в течение первого часа инкубирования и полностью элиминировало увеличение активности внеклеточного фермента через 1-2.5 ч. Эти данные позволяют предположить, что в клетках восприимчивого сорта Лукьяновский увеличение активности внеклеточной пероксидазы при бактериальном заражении связано с синтезом фермента *de novo*.

Уровень активности в контрольных суспензионных клетках картофеля устойчивого сорта Луговской был значительно выше, чем в клетках восприимчивого сорта и в течение трех часов существенно не изменялся (рис.3). Добавление патогена в среду культивирования суспензии клеток картофеля вызывало увеличение активности внеклеточного фермента

примерно вдвое. Первое увеличение активности наблюдалось в течение первого часа, второе в промежуток от 1.5 до 2.5 ч, причем уровень активности в этих двух пиках был примерно равным.

Совместное культивирование клеток устойчивого сорта картофеля с бактериальным патогеном и ингибиторами синтеза белка (циклогексимид, α-аманитин) приводило к незначительному снижению активности фермента в течение первого часа и полностью снимало активирование фермента после первого часа культивирования (рис.3)

ОБСУЖДЕНИЕ

Контакт патогена и растения подразделяется на две фазы: первая, детерминатная, включает в себя распознавание патогена, быстрый окислительный взрыв, активирование ряда ферментов, локализованных в клеточных стенках и вторая, экспрессивная, при которой сигнал о заражении передается в геном и приводит к включению защитных механизмов растения (Минибаева, Гордон, 2003). Пероксидазы, как известно, участвуют в лигнификации и связывании белков клеточной стенки и в ответе растительной клетки на патогенез за счет генерации АФК (Аверьянов, 1991). Окислительный взрыв – это одна из самых быстрых реакций клеток на действие патогена

(Минибаева, Гордон, 2003; Kawano, 2003). Увеличение содержания АФК оказывает подавляющее действие на развитие патогенных микроорганизмов. Внеклеточная пероксидаза, обладающая способностью продуцировать АФК, связана с клеточной стенкой сравнительно слабыми связями и активируется при воздействии бактериальной инфекции (Минибаева, Гордон, 2003).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что при патогенезе картофеля кольцевой гнилью, активность внеклеточной пероксидазы различается у устойчивого и восприимчивого сортов. Можно предположить, что эти различия связаны с разной устойчивостью исследуемых сортов картофеля. В таком случае высокая активность внеклеточных пероксидаз, вероятно, может быть маркером устойчивости сорта к патогену.

Изменения активности внеклеточных пероксидаз во времени свидетельствуют о двухфазном ответе этих ферментов на инфицирование. Причем, второй пик активности (через 1.5 – 2 ч после инфицирования) у обоих исследованных сортов картофеля связан с синтезом новых молекул фермента, т.е. он обусловлен участием генома в реакции клеток на патогенез. Первый пик активности (через 10-20 мин после инфицирования) у устойчивого сорта картофеля не зависит от синтеза белка и можно предположить, что он обусловлен быстрой активацией внеклеточных пероксидаз, которые уже имелись на поверхности клеток до их инфицирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аверьянов А.А. (1991) Активные формы кислорода и иммунитет растений. Успехи совр. Биологии, **111**, №5, 722-737.
- Андреева В.А. (1988) Фермент пероксидаза. Наука, Москва, 130.
- Бояркин А.Н. (1951) Быстрый метод определения активности пероксидазы. Биохимия, **16**, Вып.4, 352-355.
- Бутенко Р.Г., Хромова Л.М., Седнина Т.В. (1984) Методические указания по получению вариантных линий и растений у разных сортов картофеля. ВАСХНИЛ, М, 28.
- Граскова И.А., Боровский Г.Б., Колесниченко А.В., Войников В.К. (2003) Различия в механизмах изменения активности пероксидазы устойчивого и восприимчивого сортов картофеля при патогенезе кольцевой гнили. Вестник ХНАУ. Серия Биология. №3(2), 70-71.
- Граскова И.А., Владимирова С.В., Рихванов Е.Г. (2001) Механизм активации пероксидазы при бактериальном патогенезе различается в клетках устойчивого и неустойчивого к патогену сортов картофеля. Доклады Академии Наук. **379**, №2, 267-269.
- Дмитриев А.П. (2003) Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в

ответ на биотический стресс. Физиология растений. **50**, №3, 465-474.

- Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. (2003) Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе. Физиология растений. **50**, №3, 459-464.
- Паду Э.Х. (1995) Свойства пероксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы при образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы. Физиология растений. **42**, №3, 408-415.
- Савич И.М. (1989) Пероксидазы - стрессовые белки растений. Успехи совр. биологии. **107**, Вып.3, 406-417.
- Bolwell G.P., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F., Rowntree E.G., Wojtaszek P. (1999) Recent Advances in Understanding the Origin of the Apoplastic Oxidative Burst in Plant Cells. Free Radical Res. **31**, 137-145.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
- Kawano T. (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. Plant Cell Rep. **21**, 829-837.