

ORIGINAL ARTICLE

**Activity and isoenzyme spectrum of peroxidases and dehydrins of
some plant species, growing on the shores of lake Baikal, under
abiotic stress**

M.A. Zhivet'ev*, E.I. Rachenco, T.E. Putilina, V.A. Krasnobaev,
I.A. Graskova, V.K. Voinikov

*Siberian Institute of Plant Physiologi and Biochemistry, Siberian Division of the Russian
Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

*Corresponding Author: nik.19@mail.ru

Tel.: (395-2)42-50-09

Fax: (395-2)51-07-54

Received October 30, 2010

Thermostability and optimal pH of weak-associated with plant cell wall and soluble peroxidases was shown to change in relation to natural conditions and season of year. Also the activity of peroxidase was variable during vegetation period. Dehydrine expression was followed by spike of peroxidase activity (and, a priori, an increase of hydrogen peroxide concentration).

key words: weak-associated with cell wall peroxidases, soluble peroxidases, dehydrine, Taraxacum officinale, Achillea milleforium, Plantago major L., Veronica chamaedrys L., Alchemilla vulgaris

ORIGINAL ARTICLE

**Активность, изоферментный спектр пероксидаз и дегидринов
некоторых видов растений, произрастающих на берегах озера
Байкал, при абиотическом стрессе**

М.А. Живетьев*, Е.И. Раченко, Т.Е. Путилина, В.А. Краснобаев,
И.А. Граскова, В.К. Войников

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

*E-mail: nik.19@mail.ru

Поступила в редакцию 30 октября 2010

Термостабильность и оптимум pH слабосвязанной с клеточной стенкой и растворимой пероксидазы изменяется в зависимости от природных условий и сезонов вегетации. Активность пероксидазы тоже варьирует во времени. После пика пероксидазной активности (и, априори, возрастания концентрации пероксида водорода) следует увеличение экспрессии дегидринов.

Ключевые слова: weak-associated with cell wall peroxidases, soluble peroxidases, dehydrinase, Taraxacum officinale, Achillea millefolium, Plantago major L., Veronica chamaedrys L., Alchemilla vulgaris

Температура является важным фактором внешней среды, и изучение механизмов толерантности и адаптации высших растений к гипер- и, особенно, к гипотермии, имеет большое научное и практическое значение. Поскольку у растений отсутствуют поведенческие механизмы защиты от действия неблагоприятной температуры, основные адаптивные изменения происходят на

морфологическом и, в первую очередь, на биохимическом уровнях (Beck E. et al., 1990). К настоящему времени выявлена группа неспецифических реакций на холод, к которым относят, прежде всего, изменение проницаемости клеточных мембран, внутриклеточного pH, а также накопление защитных веществ, в частности, стрессовых белков, липидов, растворимых углеводов

(Пятыгин С.С., 2004; Тарчевский И.А., 2001; Трунова Т.И., 2007). При этом показано, что одним из самых ранних эффектов при охлаждении растений является окислительный стресс, обусловленный накоплением активных форм кислорода (АФК). Для защиты от него в растениях существует антиоксидантная система, состоящая из ферментов (супероксиддисмутаза, каталазы, пероксидазы и др.) и низкомолекулярных антиоксидантов (Рогожин В.В., 2004). В связи с открытием сигнальной и защитной роли активных форм кислорода, большое внимание уделяется оксидоредуктазам, регулирующим их уровень в клетке. Среди них особый интерес представляют пероксидазы, активность которых коррелирует с развитием устойчивости растений к абиотическим стрессам (Рогожин В.В., 2004). Являясь конституционно необходимым, этот фермент участвует в различных биохимических реакциях (Рогожин В.В., 2004). Роль пероксидазы высока при окислительном стрессе, и ее активность и изоформный состав сильно зависят от влияния множества внешних факторов, как абиотической так и биотической природы: температуры, влажности, радиации, освещенности. Пероксидаза чувствительна к изменению состава почв, к загрязнению и засолению. Она откликается на воздействия вирусных и бактериальных агентов, на нее влияют выделения мицелия различных грибов, фитонциды окружающих растений других видов. Пероксидаза участвует в ответе на раневой стресс и реагирует на поедание растения насекомыми-вредителями. Также активность пероксидазы повышается при усилении метаболизма – во время весеннего активного роста и в период цветения (при закладке генеративных органов и образовании

плодов) (Рогожин В.В., 2004).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовались растения пяти видов: одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale*), тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium*), подорожник большой (*Plantago major* L.), вероника дубравная (*Veronica chamaedrys* L.) и манжетка обыкновенная (*Alchemilla vulgaris*). Растения для исследования отбирались на левом берегу реки Выдринная в 600 м от уреза озера Байкал (стационар СИФИБРа) и в городе Иркутске на территории СИФИБРа 25 июня, 10 и 31 августа, 9 и 19 октября. В день отбора фиксировалась среднесуточная, максимальная и минимальная температура атмосферного воздуха в местах отбора проб и температура почвы на глубине 5 см.

Для выделения пероксидаз слабосвязанных с клеточной стенкой, навеску (1 г) ткани листьев помещали в шприц с 5 мл холодного цитратно-фосфатного буфера (рН 5,5) и выдерживали при разреженном давлении 2–3 раза по 1 мин (Паду Э.Х., 1995). Полученный раствор слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз центрифугировали 15 мин при 3 тыс. об./мин., отделяя от частиц ткани, и супернатант использовали для дальнейшего определения активности. Навеску ткани после экстракции слабосвязанных пероксидаз помещали в 5 мл холодного цитратно-фосфатного буфера и растирали в фарфоровой ступке при 4 °С (Паду Э.Х., 1995) для выделения растворимых пероксидаз. Полученный гомогенат центрифугировали при 3 тыс. об./мин. в течение 15 мин, в супернатанте определяли активность фермента.

Активность пероксидаз в листьях растений определяли при 25 °С сразу после выделения ферментов из образцов по изменению оптической плотности (длина волны 580 нм) в реакционной смеси следующего состава: 0,5 мл 0,1 М цитратно-фосфатного буфера (рН 5,5), 0,5 мл 0,3 % перекиси водорода («Реахим», Россия), 0,5 мл 0,05 % гваякол (Sigma, США) и 0,5 мл пробы.

Активность фермента рассчитывали по методу Бояркина (Бояркин А.Н., 1951) и выражали в условных единицах на мг сырого веса ткани.

Термостабильность пероксидазы определяли по активности фермента при разной температуре реакционной смеси (шаг 5 °С).

Выделение слабосвязанных и растворимых пероксидаз для последующего электрофоретического разделения проводили в 2 мл холодного Sample-буфера, содержащего трис, глицерин и меркаптоэтанол.

Электрофорез проводили в блоках полиакриламидного геля в модифицированной системе Лэммли (Laemmli U.K., 1970), на приборе Mini-PRONEAN III Electrophoretic Cell фирмы Bio-Rad (USA) согласно инструкции (Побежимова Т.П. и др., 2004). Для выявления ферментативной активности полиакриламидный гель окрашивали диаминобензидином.

Выделение белка для электрофореза проводили по стандартной методике с использованием 0,1 М Sample-буфера, содержащего трис, ЭДТА и SDS. Перенос белков после электрофоретического разделения на нитроцеллюлозную мембрану проводили в буфере, содержащем 25 мМ трис, 192 мМ глицин и 20% метанол, рН 9,2 (Побежимова Т.П. и др., 2004). Мембрану после переноса инкубировали в первичных и вторичных

антителах на дегидрины и окрашивали раствором ВСIP и NBT в буфере (рН 9,5). О содержании дегидринов судили по степени развития окраски мембраны.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У исследуемых растений были определены оптимальные значения активности и термостабильности растворимой пероксидазы. Во всех изученных видах, кроме манжетки обыкновенной, наблюдалось смещение оптимума рН для пероксидазы, что связывают с преобладанием разных форм фермента на разных периодах жизни растения. Это может быть обусловлено как естественной сменой стадий онтогенеза растений так и влиянием внешних экологических условий. Также наблюдалось изменение термостабильности исследуемого фермента у всех изучаемых растений. Изменение этого показателя может свидетельствовать о том, что температура окружающей среды в месте произрастания растений оказывает существенное влияние на физико-химические свойства фермента.

Были проведены измерения температуры воздуха и почвы в местах отбора проб. В пойме реки Выдринная среднесуточная температура воздуха в дни отбора проб была ниже, чем в городе Иркутск на 1-2 °С. Температура почвы на глубине 5 см также существенно различалась по сравнению с данными, полученными в г. Иркутске: 25 июня температура была выше на 5,5°С в пойме реки Выдринная и на 1-2°С выше 10 августа и 31 августа. В октябре температура почвы, наоборот, была ниже на 2-3°С в пойме реки Выдринная, чем в г. Иркутске. Таким образом, верхние слои почвы в пойме Выдринной быстрее прогревались летом и сильнее охлаждались осенью.

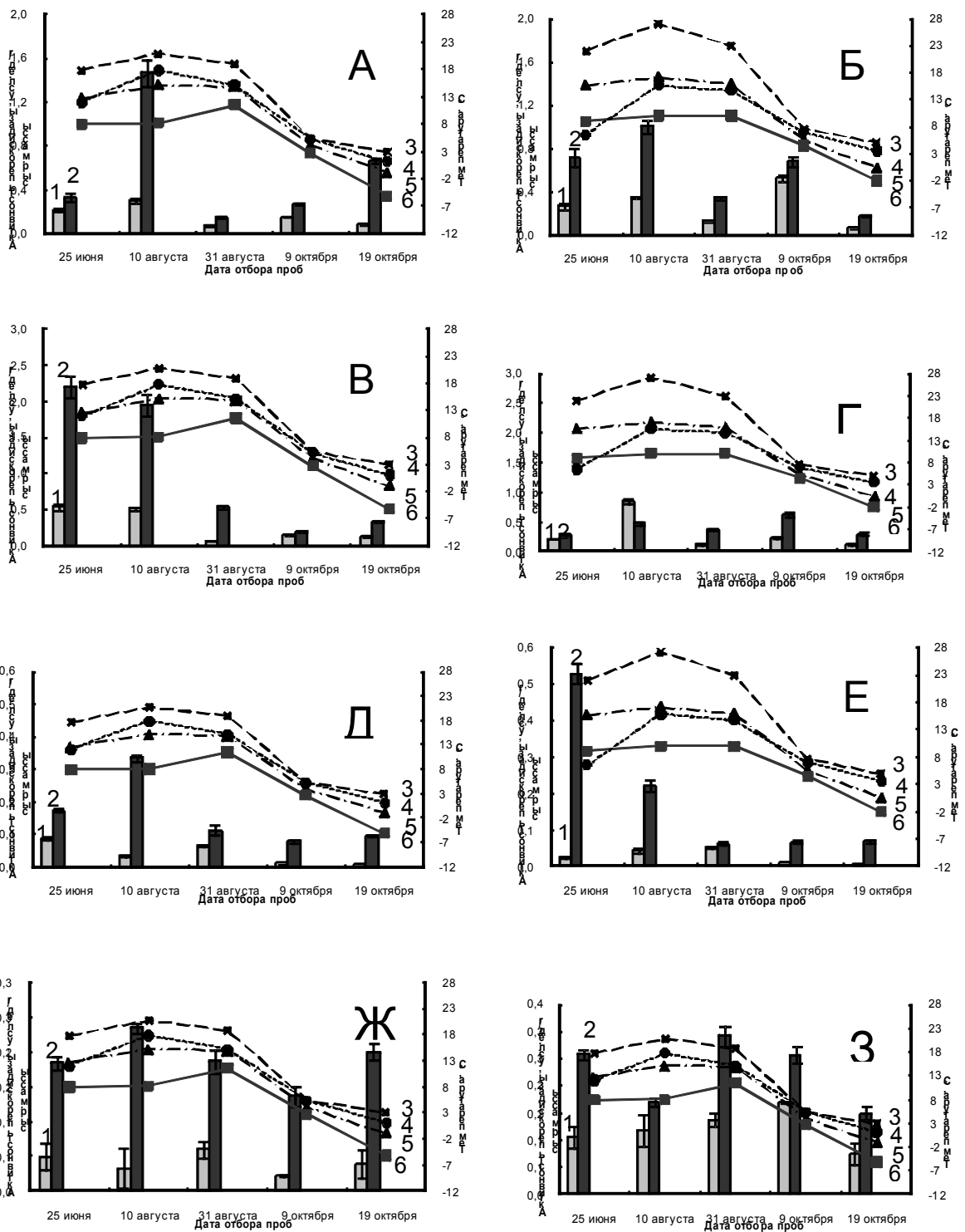


Рис. 1. Изменение активности растворимых и слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз, выделенных из тканей исследуемых растений в течение вегетации. 1 – активность слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз; 2 – активность растворимых пероксидаз; 3 – максимальная температура воздуха в день отбора проб; 4 – среднесуточная температура воздуха; 5 – минимальная температура воздуха в день отбора проб; 6 – температура почвы на глубине 5 см;. А – одуванчик лекарственный, Выдрино; Б – одуванчик лекарственный, Иркутск; В – тысячелистник обыкновенный, Выдрино; Г – тысячелистник обыкновенный, Иркутск; Д – подорожник большой, Выдрино; Е – подорожник большой, Иркутск; Ж – вероника дубравная, Выдрино; З – манжетка обыкновенная, Выдрино.

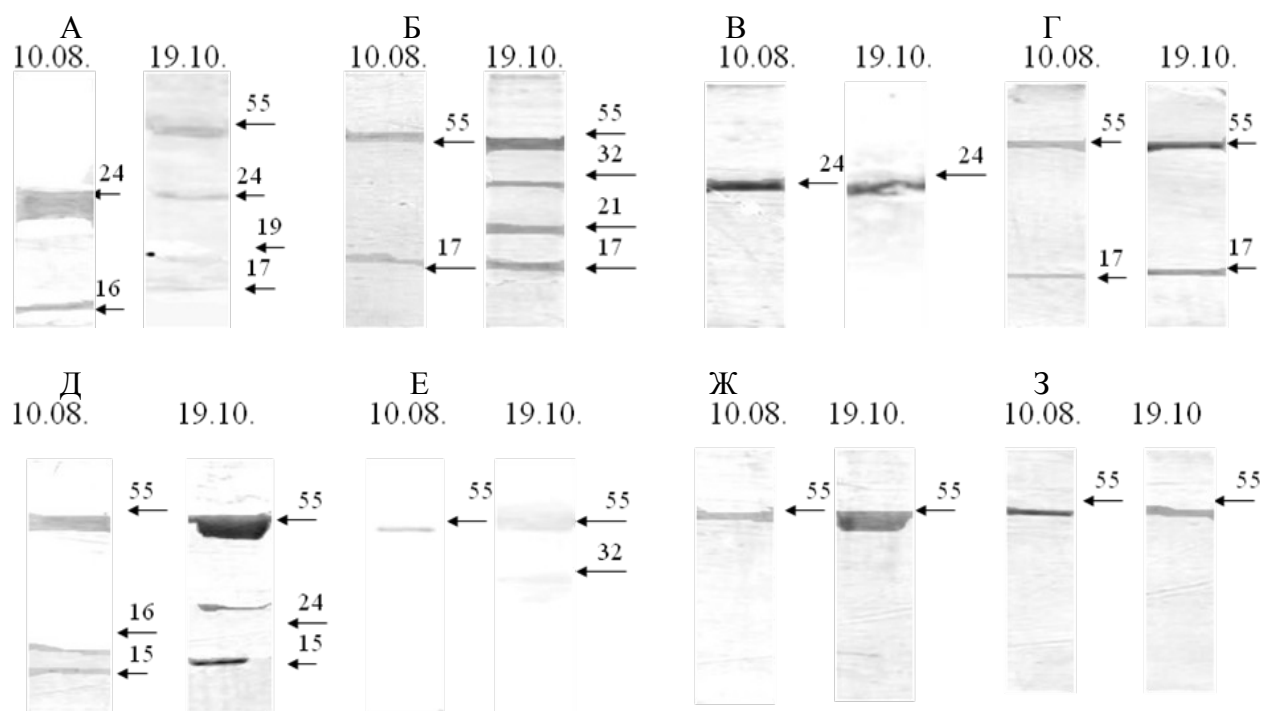


Рис 2. Идентифицированные дегидрины в начале августа и октябре 2009 года

А – одуванчик Выдрино; Б – одуванчик Иркутск; В – тысячелистник Выдрино; Г – тысячелистник Иркутск; Д – подорожник Выдрино; Е – подорожник Иркутск; Ж – вероника Выдрино; З – манжетка Выдрино

Была изучена активность растворимых и слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в исследуемых растениях с учетом температурного режима точек сбора (Рис. 1).

Отмечено, что для тысячелистника обыкновенного и одуванчика лекарственного характерны более высокие значения активности пероксидазы, чем для других изучаемых видов. Также наблюдаются два пика активности пероксидаз – летом и осенью. Причем осенний пик у иркутских растений смещен на начало октября, а на Байкале он приходится на конец октября, за исключением манжетки обыкновенной, у которой второй пик активности пришелся на конец августа – начало октября.

Осенью наступление отрицательных температур в октябре приводило в Иркутске к

спадку активности пероксидазы у всех пяти видов растений, а на Байкале, наоборот, к усилению (за исключением манжетки обыкновенной). Это может быть связано как с температурными особенностями районов произрастания растений, так и с тем, что глубокой осенью на Байкале наступает повторное цветение изучаемых растений, которое может сопровождаться усилением метаболизма и, следовательно, увеличением пероксидазной активности.

Также были изучены молекулярные формы пероксидазы в исследуемых травянистых растениях. Максимальное число форм фермента показано у Тысячелистника обыкновенного 31 августа в Иркутске: 13 молекулярных форм, из которых 6 – слабосвязанных с клеточной

стенкой и 7 – растворимых. Минимальное количество изоформ отмечалось также в Иркутске 25 июня. Среднее содержание молекулярных форм в тканях листьев тысячелистника было 9 (4 и 5 соответственно слабосвязанных и растворимых) У подорожника большого максимум отмечалось девять форм пероксидазы (3 и 6 соответственно), у вероники лекарственной – восемь (4 и 4), у манжетки обыкновенной 7 (3 и 4 соответственно), и у одуванчика 5 (1 и 4). Среднее число молекулярных форм фермента для перечисленных четырех видов растений отмечено 6, 8, 6 и 3 соответственно. При этом изоферментный спектр пероксидазы изучаемых видов растений был очень изменчив в течение периода вегетации и содержал лишь по 1-3 стабильных фракции.

Разнообразие молекулярных форм фермента можно объяснить изменением аминокислотного состава белковой части молекулы фермента, состава сахаров углеводной части или агрегацией низкомолекулярных форм. Изменения в количестве молекулярных форм пероксидазы по всей вероятности обеспечивают устойчивость этих растений к воздействию всего комплекса факторов внешней среды.

Также нами были изучены стрессовые белки изучаемых растений на примере дегидринов.

Известно, что при действии гипотермии в клетках растений накапливаются различные стресс-индуцируемые белки, такие как белки теплового шока (БТШ) и COR-белки. Они могут синтезироваться специфически на холод, либо участвовать в неспецифическом ответе на воздействие стрессора. Дегидрины относятся к группе COR-белков. Они синтезируются в клетке в ответ на обезвоживание и холодовой стресс, препятствуя образованию внутриклеточного

льда. Также синтез дегидринов запускается повышением концентрации в клетке абсцизовой кислоты (АБК), содержание которой увеличивается при стрессе и при недостатке воды в тканях растений.

Дегидрины изучались в пробах, отобранных в начале августа и в середине октября. Отмечено усиление синтеза дегидринов к середине октября у большинства исследованных растений – по сравнению с началом августа. Также синтез дегидринов может наблюдаться в летние месяцы при обезвоживании в жаркую погоду и под действием сильной солнечной радиации (Рис. 2).

Известно, что любой стрессор провоцирует в клетке окислительный стресс, в котором не последнюю роль играет пероксидаза. Также при стрессе происходит повышение концентрации абсцизовой кислоты в клетках растений, которая запускает синтез дегидринов. Из этого следует возможная взаимосвязь активности пероксидазы и содержания в клетке дегидринов.

Для одуванчика лекарственного и тысячелистника обыкновенного отмечены более высокие значения активности пероксидазы в тканях листьев, по сравнению с другими изучаемыми видами. У этих видов содержание дегидринов было прямопропорционально активности пероксидазы в предшествующие 1-15 дней в летние месяцы и осенью. У подорожника большого, для которого была характерна чуть меньшая активность пероксидазы, такая зависимость прослеживалась четко только летом, а к осени на фоне общего снижения активности пероксидазы и отмирания листьев отмечалось повышение количества дегидринов. При этом в середине октября большее повышение активности пероксидазы в Выдрино по

49 ACTIVITY AND ISOENZYME SPECTRUM OF PEROXIDASES AND DEHYDROGENASES

сравнению с Иркутском, совпадало и с большим количеством дегидринов в тканях листа подорожника. Выводы по манжетке и веронике сделать сложнее, так как они собирались только в Выдрино. Тем не менее, у манжетки уменьшение активности пероксидазы в октябре сопровождалось уменьшением содержания дегидринов. А у вероники к осени после спада отмечалось увеличение активности пероксидазы, которое сопровождалось заметно большим накоплением дегидринов.

На основании полученных данных можно сделать предположение, что за увеличением пероксидазной активности следует увеличение содержания дегидринов. Пероксидаза, вероятно, может влиять на образование дегидринов (и, видимо, некоторых других стрессовых белков) как напрямую (подобно гормону АБК) так и косвенно – через изменение концентрации активных форм кислорода, которые по современным представлениям (Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., 2010), наряду с ионами кальция, также являются переносчиками стресс-сигнала в геном и индуцируют синтез БТШ, белков холодового шока (БХШ), низкомолекулярных стрессовых белков. Но, например, салициловая кислота, известная как индуктор синтеза ряда полипептидов и PR-белков, не вызывает их экспрессию при добавлении антиоксидантов, что свидетельствует о реализации эффектов СК посредством АФК (Metodiev M.V. et. al., 2002). Wahid и Close (2007) показали, что образование БТШ 32 вызывается не только гипертермией, но и перекисью водорода. Экзогенный пероксид водорода индуцирует синтез стрессовых белков с различной молекулярной массой у арабидопсиса и повышает у него холодо- и теплоустойчивость (Bhattacharjee S., 2005). Методами транскриптомики показано участие

перекиси водорода в активации экспрессии генов БХШ и БТШ при действии умеренных стрессующих температур (Georgiou C.D. et. al., 2006).

Некоторые стрессовые белки выступают как факторы защиты от окислительного стресса (Penfield S., 2008). Ряд специфических стрессовых белков синтезируется в местах усиленного образования АФК: в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах, где показана их протекторная функция (Debel K. et. al., 1997). Все это дает основание полагать, что стрессовые белки не только индуцируются АФК, но и принимают участие в регуляции их образования и защите структур растительных клеток от окислительного стресса.

Таким образом, адаптация растений к гипотермии и сопутствующему ей окислительному стрессу осуществляется за счет повышения активности пероксидазы в ответ на воздействие стрессора, а также за счет качественного и количественного изменения в составе стрессовых белков, таких как дегидриназы.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 07-04-01055-а, РФФИ р Сибирь а 08-04-98040.

ЛИТЕРАТУРА

- Бояркин А.Н. (1951) Быстрый метод определения активности пероксидазы *Биохимия*. 16(4), 352-355.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. (2010) Формирование адаптивных реакций на действие абиогических стрессоров К.: Основа, 352 .
- Паду Э.Х. (1995) Свойства пероксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы при

- образовании и лигнификации клеточных стенок стебля пшеницы *Физиология растений*. 42(3) 408–415.
- Побежимова Т.П., Колесниченко А.В., Грабельных О.И. (2004) Методы изучения митохондрий растений. Полярография и электрофорез ООО «НПК «ПРОМЭКОБЕЗОПАСНОСТЬ», 98.
- Пятыгин С.С., (2004) Роль плазматической мембраны в восприятии холодового воздействия на клетки растений *Биол. мембраны*. 21(6) 442–449.
- Рогожин В. В. (2004) Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД. 240
- Тарчевский И.А., (2001) Метаболизм растений при стрессе. Казань: Фэн. 448
- Трунова Т.И. (2007) Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 60
- Beck E., Lüttge U., (1990) Streß bei Pflanzen *Biol. Unserer Zeit. B.* 20. 237–244.
- Bhattacharjee S. (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants *Curr. Sci.* 89. 1113–1121.
- Debel K., Sierralta W.D., Braun H.P. et al. (1997) The 23-kDa light-stress-regulated heat-shock protein of *Chenopodium rubrum* L. is located in the mitochondria *Planta* 201. 326–333.
- Georgiou C.D., Patsoukis N., Papapostolou I., Zervoudakis G. (2006) Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress *Integr. Compar. Biol.* 46. 691 – 712.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature*. 227. 680–685.
- Metodiev M.V., Kicheva M.I., Stoinova Zh.G., Popova L.P., (2002) Two-dimensional electrophoretic analysis of salicylic acid-included changes in polypeptide pattern of barley leaves *Biol. Plant.* 45. 585–588.
- Penfield S. (2008) Temperature perception and signal transduction in plants *New Phytol.* 179. 615–628.
- Wahid A., Close T.J. (2007) Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves *Biol. Plant.* 51.104–109.