Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 7 No. 1 2011, pp. 5-12 ISSN 1997-0838
Original Text Copyright © 2011 by Tomilin, Olyunina, Veselov

ORIGINAL ARTICLE

LIGHT DEPENDENT CHANGES IN PEROXIDASE ACTIVITY AND PEROXIDE HYDROGEN GENERATION IN THE WHEAT SEEDLINGS

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

N.I. Lobachevsky state university of Nizhny Novgorod; Gagarina av., 23, Nizhny Novgorod 603950, Russian Federation

tel.: (831)465-20-40,

E-mail: Tom0990@yandex.ru

Received November 19, 2010

Participation of light in modification of peroxidase enzymatic system activity and peroxide hydrogen generation in the wheat seedlings shoot and root endocellular compartment is revealed. It is shown that in elevated parts of seedlings light activates oxidase peroxidase function and causes peroxide hydrogen accumulation (oxidative burst); in roots – light induces equivalent changes of both enzymatic functions, without causing change of ROS level.

Key words: triticum aestivum / peroxidase / light / regulation

ORIGINAL ARTICLE

СВЕТОЗАВИСИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНЕРАЦИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

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

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», 603950 Нижний Новгород, ГСП-20, пр.Гагарина, д.23, Россия

Tel.: (831)465-20-40

E-mail: Tom0990@yandex.ru

Поступила в редакцию 19 ноября 2010

Выявлено участие света в модификации активности пероксидазной ферментной системы внутриклеточного компартмента побегов и корней проростков пшеницы и генерации пероксида водорода. Показано, что в надземных частях проростков свет активирует оксидазную функцию пероксидазы, вызывает накопление пероксида водорода (окислительный взрыв); в корнях – индуцирует равнозначные изменения обеих функций фермента, не вызывая изменения уровня АФК.

Ключевые слова: Triticum aestivum / пероксидаза / свет / регуляция

Известно, что влияние света на обмен веществ опосредовано через систему фоторецепторов, и их возбуждение может вызвать целый каскад реакций, инициирующих изменение активности регулируемых светом генов (соответственно, количества фермента). В работах О.В. Осипенковой (2009) показано, что на ранних этапах деэтиоляции проростков, в условиях резкой смены светового режима экспрессируются ядерные гены стрессовых белков, в частности *ELIP*, которые играют важную роль в защитных реакциях растений в ответ на действие стрессоров. Биотические и абиотические стрессоры индуцируют

накопление активных форм кислорода (АФК), вызывая активацию специфических ферментов, в частности пероксидаз (ПО). Отличительной чертой всех ПО является их полифункциональность, участие в таких биохимических реакциях как оксидазное, пероксидазное и оксигеназное окисление субстратов, что позволяет предполагать активное участие их в контроле уровня АФК и, как следствие, процессов роста, механизмов формирования реакций растений на действие экологических факторов, один из которых – свет (Андреева, 1988; Савич, 1989).

Цель настоящей работы – выявить влияние света на функциональную активность пероксидазной ферментной системы внутриклеточного компартмента побегов и корней проростков пшеницы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах были использованы проростки яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта «Московская 35» (водная культура), выращенные в темноте. Шестидневные этиолированные проростки помещали под люминесцентные лампы (10 000 лк), продолжительность экспозиции составляла 5, 10, 15 мин; в качестве контроля использовали растения, не экспонированные на свету. Растительный материал в присутствии нерастворимого поливинилпирролидона фиксировали жидким азотом и гомогенизировали в 0,06 М фосфатном буфере (pH 8.0), отношение массы навески к объёму буфера 1:4. Цитоплазматическую фракцию получали центрифугированием гомогената (7000 об/мин, 15 мин). Концентрирование пероксидазного белка осуществляли высаливанием $(NH_4)_2SO_4$ (70-95% насыщения). Определение концентрации гемсодержащих белков (ГСБ) проводили спектрофотометрическим методом при 403 нм (спектрофотометр UV-1700 Shimadzu, Япония). Активность исследуемых ферментов в цитоплазматических фракциях побегов и корней проростков пшеницы оценивали спектрофотометрически в момент линейного протекания реакции. Активность бензидин-ПО (БПО) определяли при 590 нм, гваякол-ПО (ГПО) при 470 нм (Гавриленко и др., 1975), аскорбат-ПО (АПО) при 265 нм (Досон и др., 1991). Состав реакционной смеси: 0.5 мл исследуемой пробы, 1.5 мл 0,2 М ацетатного буфера (pH 5.4), 0.5 мл 0.015 % H_2O_2 и 0.5 мл 5 мМ 4.4'-диаминодифенила (ε_{590}=39 $мМ^{-1}см^{-1}$) или 0.5 мл 0.05% гваякола (ε_{470}=26,6*10^3 $М^{-1}см^{-1}$) или 0.5 мл 2.5 мМ аскорбата (ε_{265}=7 $мМ^{-1}см^{-1}$). НАД(Ф)Н-ПО активность регистрировали по уменьшению поглощения при 340 нм. В кювету вносили 0.5 мл исследуемой пробы, 1 мл 0.2 М ацетатного буфера (pH 5.4), 0.5 мл 16 мМ $MnCl_2$, 0.5 мл 1.6 мМ о-кумаровой кислоты и 0.5 мл 0.3 мМ НАДН (ε_{340}=4,23 $мМ^{-1}см^{-1}$) или 0.5 мл 0.3 мМ НАДФН (ε_{340}=6.22*10^3 $М^{-1}см^{-1}$) (Fecht-Christoffers et all., 2006). Активность ИУК-ПО определяли при 254 нм (Loukili et all., 1999). Состав реакционной смеси: 0.5 мл АОР, 1 мл 0.2 М ацетатного буфера (pH 5.4), 0.5 мл 16 мМ $MnCl_2$, 0.5 мл 0.1 мМ р-кумаровой кислоты и 0.5 мл 0.6 мМ ИУК (ε_{254}=18,7 $мМ^{-1}см^{-1}$). Активность исследуемых ферментов выражали в ммоль субстрата/мин на 1 мг ГСБ. Содержание гидропероксидов (R-OOH) оценивали по реакции с роданистым аммонием (Курганова и др., 1997). Белок АОР осаждали 50% ТХУ (конечная концентрация 7%). После центрифугирования объём надосадочной жидкости доводили до 10 мл этанолом. К

равным объемам добавляли 0.2 мл концентрированной HCl и 0.012 мл 5% соли Мора в 3% HCl. Для развития окраски в пробы вносили 0.5 мл 20% роданистого аммония. Оценку R-OOH производили через 10 мин спектрофотометрически против контроля (этанол) при 480 нм. Содержание гидропероксидных группировок выражали в нмоль/мг белка. Количество белка определяли по методу Lowry.

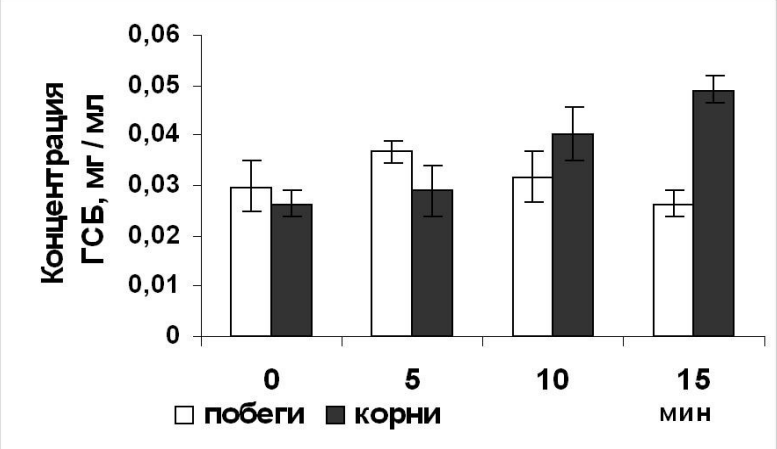

Рисунок 1. Изменение уровня гемсодержащего белка в цитоплазматической фракции побегов и корней в процессе деэтиоляции проростков пшеницы.

Таблица 1: Уровень активности пероксидазной ферментной системы цитоплазматической фракции побегов и корней проростков пшеницы.

Исследуемый орган	Активность исследуемых ферментов, ммоль / мг ГСБ * мин					
	БПО	**ГПО**	**АПО**	**НАДН-ПО**	**НАДФН-ПО**	**ИУК-ПО**
ПОБЕГИ	23,629±0,231	0,005±0,1*10^{-3}	0,155±0,013	1,067±0,149	0,006±0,5*10^{-3}	2,489±0,403
КОРНИ	21,921±0,111	0,002±0,29*10^{-3}	0,047±0,007	0,285±0,056	0,011±0,001	3,855±0,514

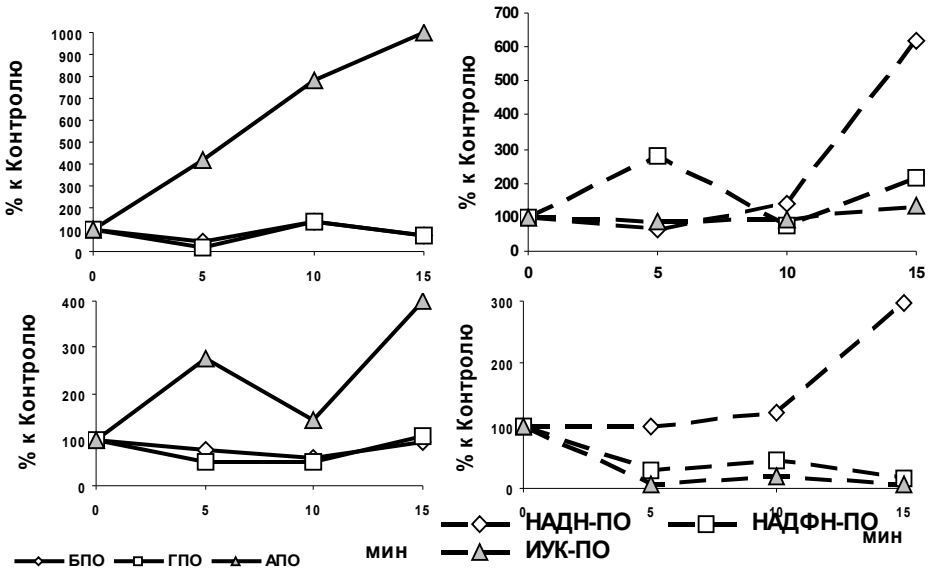

Рисунок 2. Изменение активности пероксидазной ферментной системы в цитоплазматической фракции побегов и корней в процессе деэтиоляции проростков пшеницы.

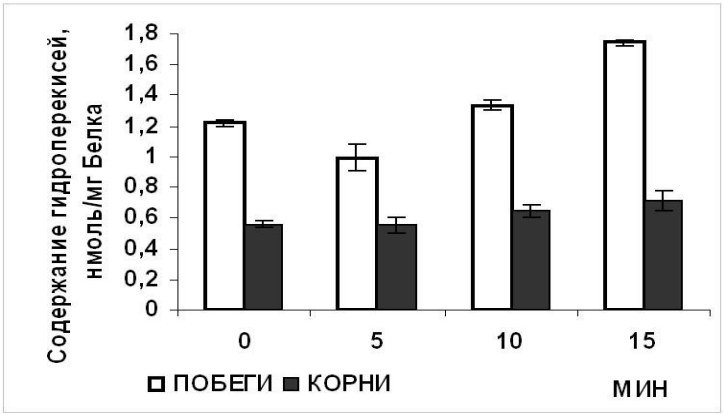

Рисунок 3. Динамика генерации уровня гидропероксидных группировок в цитоплазматической фракции побегов и корней в процессе деэтиоляции проростков пшеницы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В наших исследованиях кратковременное действие света (5–15 мин) на этиолированные проростки индуцировало разнонаправленное изменения уровня ГСБ во внутриклеточном компартменте побегов и корней (Рис 1). Свет вызывал плавное повышение уровня белка в цитоплазматической фракции корней (в 1.3 раза) и уменьшение его содержания (в 1.9 раза) в надземных органах опытных проростков. Поскольку известно, что растительные ПО являются секретируемыми ферментами (Schloss et all., 1987), в связи с этим выявленные светозависимые изменения уровня ГСБ в цитоплазматическом компартменте, по-видимому, могли быть связаны с перераспределение пероксидазного белка

(модификация процессов экзо- и эндоцитоза низкомолекулярных белков). Данный эффект света, возможно, является следствием активирования или ингибирования процессов транспорта ГСБ между клеточными компартментами. При этом характер таких модификаций может различаться в побегах и корнях исследуемых проростков пшеницы.

Пероксидаза специфична к субстратам различной природы. Для взаимодействия фермента с молекулой субстрата, последняя должна иметь две структурные особенности: специфическую химическую связь, которую фермент атакует и функциональную группу, ориентирующую молекулу субстрата в активном центре фермента (Граскова, Войников, 2009). Субстраты классических пероксидаз растений принято дифференцировать на 3 группы. К первой относят двухэлектронные доноры, для которых главным является связывание вблизи или проникновение внутрь активного центра. Вторая группа - одноэлектронные ароматические субстраты, которые связываются вблизи активного центра. Третья группа – это субстраты, окисляющиеся по цепи переноса электронов (ABTS, ИУК, НАД(Ф)Н и др.) (Газарян и др., 2006). Таким образом, фермент имеет две различные функции (оксидазную и пероксидазную), что позволяет предполагать в каталитическом действии пероксидазы участие двух независимых активных центров, пространственно разделенных, хотя и близко расположенных друг от друга на молекуле фермента (Gibson, Liu, 1978).

На основе результатов, представленных в табл. 1, можно предположить, что основной пул внутриклеточной антиоксидантной активности ПО сосредоточен в побегах, а прооксидантной (оксидазная функция ПО) в корнях проростков пшеницы. Следует отметить, что исследуемые органы, вероятно, отличаются и по локализации в цитоплазматической фракции отдельных форм ПО. Так, в надземных органах выявлен повышенный уровень БПО, ГПО, АПО и НАДН-ПО активности, а НАДФН-ПО и ИУК-ПО активности были характерны для корней проростков пшеницы. Таким образом, в цитоплазматической фракции исследуемых органов проростков, возможно, имеет место специфическая направленность окислительно-восстановительных реакций.

Как следует из результатов, представленных на рис. 2, в процессе деэтиоляции в побегах и корнях проростков пшеницы происходили колебательные изменения активности пероксидазной ферментной системы цитоплазматического компартмента. В корнях и побегах проростков пшеницы свет стимулировал активность АПО через 5 мин в 2.8-4.2, а при 15-минутной деэтиоляции соответственно в 4-10 раза. При этом активность других антиоксидантных (БПО, ГПО) форм ПО были снижены, в частности, уже через 5 мин после воздействия света отмечалось уменьшение активности данных форм ПО в 2-4.7 раза. Динамика оксидазной активности фермента (кроме НАДН-ПО) в процессе деэтиоляции (в побегах и корнях проростков пшеницы) была разнонаправленной. В частности, активность прооксидантных (НАДФН-ПО, ИУК-ПО) форм ПО цитоплазматической фракции корней была снижена: максимум уменьшения (в 5.9-17.8 раз) зафиксировано при 15-минутном экспонировании проростков на свету; в побегах повышена. Следует так же отметить, что модифицирующее действие света на активность

НАДН-ПО побегов и корней реализовалась в повышении активности данной формы при 15-минутной деэтиоляции. Таким образом, в исследуемых органах проростков пшеницы свет избирательно модифицировал ПО: нарастание прооксидантной (оксидазная функция всех исследованных форм ПО) в побегах, а в корнях только одну из форм - НАДН-ПО. В последнее время в литературе активно обсуждается роль ПО не только в утилизации перекиси водорода, но и в её образовании, а также в образовании супероксид-анион-радикала. Установлены новые механизмы функционирования ПО, во многом связанные с изучением «гидроксильного» каталитического цикла с участием «соединения III» и генерацией АФК (Passardi et all., 2004). Можно предположить, что в наших исследованиях, свет, оказывая направленное воздействие на пероксидазную систему, мог в цитоплазматической фракции побегов проростков пшеницы индуцировать окислительный взрыв, а в корнях, скорее всего, происходящие равнозначные изменения как оксидазной, так и пероксидазной активности – одна из причин поддержания окислительного гомеостаза, его стабилизация.

Полученные результаты (Рис. 3) отражают изменения уровня АФК, в частности, содержание R-OOH во внутриклеточном компартменте деэтиолированных проростков. Через 5 мин после воздействия свет обратимо уменьшал уровень R-OOH в 1.2 раза в цитоплазматической фракции побегов, и не оказывал воздействия на количество R-OOH в корнях опытных проростков. Интересно отметить, что далее при 15 минутном световом воздействии уровень R-OOH надземных органов увеличивался в 1.4 раза, а для корней – находился вблизи контроля. Таким образом, свет, оказывая непосредственное влияние на надземные органы проростков, индуцировал в цитоплазматическом компартменте побегов накопление R-OOH (окислительный взрыв); реакция корней в этих условиях, по-видимому, не может быть отнесена к стрессорной.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (Государственный контракт № 14.740.11.0732 от 12.10.2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Андреева В.А. Фермент пероксидаза. М., 1988. 127 с.

Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л. М. Большой практикум по физиологии растений. М.: Высшая школа, 1975. 327 с.

Газарян И.Г. Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биол. химии. 2006. Т. 46. С. 303-322

Граскова И.А., Войников В.К. Слабосвязанные с клеточной стенкой пероксидазы и их участие в защитных механизмах растений // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды: Материалы всероссийской научной конференции, 24-28 августа 2009г. - Иркутск: НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН, 2009. С. 105-10

Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 544 с.

Курганова Л.Н., Веселов А.П., Гончарова Т.А., Синицына Ю.В. Перекисное окисление

липидов и антиоксидантная система защиты в хлоропластах гороха при тепловом шоке // Физиол. раст. 1997. Т. 77, № 5 С. 725-730

Осипенкова О.В. Роль ретроградных пластидных сигналов в экспрессии ядерных генов стрессовых белков *ELIP1* и *ELIP2* у *Arabidopsis thaliana.* Автореф. дисс. канд. биол. Москва. 2009. 26 с.

Савич И. М. Пероксидазы – стрессовые белки растений // Успехи современной биологии 1989. Т. 107. С. 406-417

Fecht-Christoffers M.M., Führs H., Braun Hans-Peter, Horst W.J. The role of hydrogen peroxide-producing and hydrogen peroxide-consuming peroxidases in the leaf apoplast of cowpea in manganese tolerance // Plant Physiology. 2006. V. 140. P. 1451-1463

Gibson D.M. Liu E.V. Substrate specification of peroxidase isozymes in the developing pea seedling // Ann. Bot. 1978. V. 42. P. 1075–1083

Loukili A., Limam F., Ayadi A., Boyer N., Ouelhazi L. Purification and characterization of a neutral peroxidase induced by rubbing tomato internodes // Physiol. Plant. 1999. V.105. P. 24–31.

Passardi F., Penel C., Dunand C. Performing paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall // Trends in Plant Science. 2004. V. 9. P. 534-540

Schloss P., Walter C., Mader M. Basic peroxidases in isolated vacuoles of Nicotiana tabacum L. / // Planta. 1987. V. 170. P. 225–235