

УДК 577.151; 632.93

**ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ И ИЗОФЕРМЕНТНОГО СПЕКТРА
ПЕРОКСИДАЗЫ ПШЕНИЦЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СИГНАЛЬНЫХ
МОЛЕКУЛ И ИНФИЦИРОВАНИЯ ГРИБОМ SEPTORIA
NODORUM**
**THE CHANGE OF PEROXIDASE ACTIVITY and isozym
spectrum OF WHEAT UNDER THE INFLUENCE OF signal
molecules AND infection of Septoria nodorum fungi**

Черепанова Е.А., Нужная Т.В.
Cherepanova E.A., Nuzhnaya T.V.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian
Academy of Sciences

The peroxidases plays important role in formations of plants resistant to infection. Treatment of wheat by chitooligosaccharides, salicylic and jasmonic acids stimulated of defense reactions of plant cells and increased the activity pathogen-specific peroxidases as in health as infected plants. It was correlated with decrease of disease symptoms on the infected leaves.

Одним из самых распространенных патогенов злаковых культур является септориоз. Несмотря на начинающееся внедрение в практику препаратов на основе сигнальных молекул (салициловой (СК), жасмоновой (ЖК), арахидоновой кислот, компонентов клеточных стенок микроорганизмов [5; 8]), физиолого-биохимические механизмы формирования устойчивости в растениях под их влиянием пока до конца не ясны.

Пероксидаза, будучи функционально очень лабильным ферментом, способна реагировать на большинство нарушений гомеостаза. Стрессовые факторы, в том числе и биотического характера, приводят не только к активации отдельных уже существующих её изоформ, но и к появлению новых [4]. Хотя в настоящее время ведется активное изучение свойств пероксидазы, роль отдельных её изоформ остается неизвестной. В связи с этим интересно было бы выявить связь активности изопероксидаз пшеницы с индуцированной препаратами сигнальных молекул устойчивостью к септориозу.

Исследования проводили на листьях проростков растений мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Башкирская 24. Семена пшеницы замачивали в течение 3-х часов в растворах 5×10^{-5} М СК, 1×10^{-7} М ЖК, 1×10^{-6} М хитоолигосахаридов (ХОС) и их композиций. Концентрации сигнальных молекул были отобраны исходя из данных, приведенных в работе Н.И. Васюковой с соавторами [2]. Контролем служили семена, замоченные в дистиллированной воде. Проростки выращивали в течение 7 суток на светоплощадке с 16-часовым светопериодом, после чего полностью развернувшиеся 1-е листья срезали и формировали из них «газончики», на следующий день инокулировали суспензией спор

Septoria nodorum Berk в концентрации 10^6 спор/мл с добавлением твин-20 [3].

Фиксацию растительного материала для биохимических исследований проводили на 2 сутки после инокуляции. Для этого навеску образца (3-5 листьев на один вариант) гомогенизировали в 0.05М фосфатном буфере pH 6.0 (ФБ) (масса : объем – 1 : 5), экстрагировали при +4°C 30 мин, затем центрифугировали при 10000g 10 мин. Надосадочную жидкость отбирали для определения активности и изоферментного спектра пероксидазы. Активность пероксидазы определяли микрометодом по окислению её субстрата [6].

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) проводили на приборе завода Хийу-Каллур (Эстония). Белки наносили на поверхность 7%-ного полиакриламидного геля, содержащего 10% глицерина и 2% амфолинов pH 3.0-10.0 («BioRad», США). Изоэлектрическую точку (pI) белков определяли, используя набор белковых маркеров pI от 4.45 до 9.6 фирмы «BioRad». Гель после ИЭФ проявляли на пероксидазную активность 0.01% раствором диаминобензидина солянокислого с 0.016 % H_2O_2 в 0.1 М ФБ.

О степени индукции устойчивости пшеницы к септориозу сигнальными молекулами судили по площади инфекционных пятен на листьях предобработанных и контрольных растений на 7-е сутки после заражения, когда проявления инфекции были наиболее яркими [3].

Как видно из рис 1, инфицирование во всех вариантах повышало активность пероксидазы. Сильнее всего активировалась пероксидаза под влиянием возбудителя септориоза в варианте с ЖК, ХОС и комбинациях сигнальных молекул. Интересно отметить, что при действии ЖК с ХОС активность пероксидазы повышалась как в зараженных, так и в незараженных листьях пшеницы, тогда как активность пероксидазы при предобработке СК была практически такой же, как и в контроле.

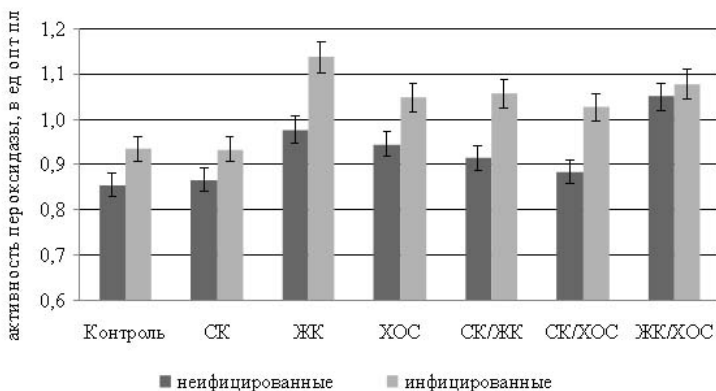


Рис. 1. Влияние СК, ЖК, ХОС и их комбинаций на пероксидазную активность инфицированных и неинфицированных листьев пшеницы (48 часов после инфицирования).

Инфицирование проростков активировало анионную пероксидазы с pI ~ 3.5 (рис. 2), однако в варианте с СК она была наименьшей. Кроме того, увели-

чивалась, по сравнению с неинфицированными листьями, активность изоформ рI ~ 9.7 и ~ 7.5. Отмеченные выше изопероксидазы являются патоген-специфичными и обладают свойством сорбироваться на компоненты клеточных стенок патогенов [7].

После инокуляции отрезков листьев грибом *S. nodorum* симптомы септориоза в виде бурых пятен начали проявляться на 2 сут после заражения, наиболее ярко разница между вариантами становилась заметной к 7-м сут. Как видно из таблицы, симптомы септориоза под действием сигнальных молекул проявлялись в гораздо меньшей степени, чем в контроле. Варианты листьев с ХОС проявляли наибольшую устойчивость к септориозу. Обработка ХОС совместно с СК или с ЖК приводила к уменьшению площади образования некротических пятен по сравнению с обработкой отдельно или СК или ЖК, что может свидетельствовать о взаимодополняющей способности этих молекул воздействовать на защитные системы хозяина, препятствуя внедрению патогена.

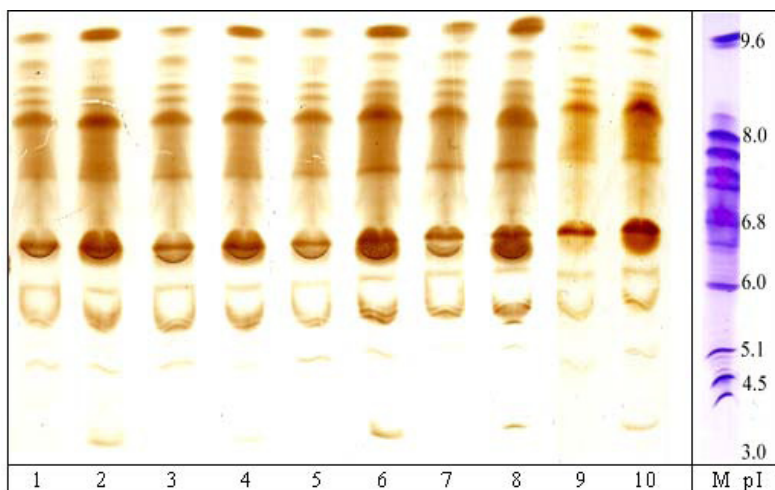


Рис. 2. Изменение изоферментного спектра пероксидазы под действием СК, ЖК и ХОС при инфицировании *S. nodorum* 1 - контроль; 2 - инфицирование; 3 - СК; 4 - СК+инфицирование; 5 - ЖК; 6 - ЖК+инфицирование; 7 - СК+ЖК; 8 - СК+ЖК+инфицирование; 9 - ХОС; 10 - ХОС+инфицирование

Таблица. Площадь инфекционных пятен *S. nodorum* на листьях пшеницы, предобработанных сигнальными молекулами (7-е сут после инфицирования)

Варианты	Контроль	СК	ЖК	ХОС	СК + ЖК	СК + ХОС	ЖК + ХОС
Размер инф. пятен, мм ²	16,4±0,8	2,8±0,4	2,2±0,3	1,6±0,3	5,8±0,4	2±0,5	1,8±0,2

Интересно отметить, что совместная обработка СК с ЖК снижала устойчивость растений, по сравнению с индивидуальным их применением, что может быть связано с их интерферирующим эффектом. Феномен отрицательной интерференции ЖК-индуцируемого сигнального пути с СК-индуцируемым описан в научной литературе [1; 8].

Обобщая полученные данные, можно сказать, что площадь образования некрозов напрямую коррелирует с активностью в растениях пшеницы патоген-специфичных изопероксидаз. Следует особо отметить, что композиции СК и ЖК с ХОС, как в контрольных образцах, так и при инфицировании, активировали изопероксидазы, играющие важную роль в защите растений от патогенов, что подтверждается нашими визуальными наблюдениями.

Работа была произведена при частичной поддержке госконтракта Минобрнауки № 339 «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013гг.» и гранта РФФИ-Поволжье 10-04-97021.

Литература:

1. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Жасмонат-зависимая сигнализация в тканях растений // Физиология растений. 2009. 59, №5. С.643-653.
2. Васюкова Н.И., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Валуева Т.А., Озерецковская О.Л. Активизация защитных свойств элиситоров с помощью системных сигнальных молекул при взаимодействии картофеля и возбудителя фитофтороза // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. 44, №2. С.236-240.
3. Максимов И.В., Черепанова Е.А., Мургазина Г.Ф., Чикида Н.Н. Связь устойчивости проростков *Aegilops umbellulata* Zhuk. к *Septoria nodorum* Berk с изоферментным составом пероксидаз // Известия РАН серия Биологическая, 2006. №5. С. 575-580.
4. Минибаева Ф.В. Активные формы кислорода и ионная проницаемость плазмалеммы в растительных клетках при стрессе/ Автореф дисс. на соискание докт. биол. наук, С.-Петербург. 2005. 42 с
5. Озерецковская О.Л. Проблемы специфического иммунитета // Физиол. раст. 2002. Т.49. С. 148-154.
6. Хайруллин Р.М., Юсупова З.Р., Максимов И.В. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. Взаимодействие анионных пероксидаз пшеницы с хитином, хитозаном и телиоспорами *Tilletia caries*// Физиология растений. 2000. 47, №1. С.108-113.
7. Черепанова Е.А. Хитин-специфичные пероксидазы растений Автореф. дисс...на соискание ученой степени к.б.н. Уфа. 2005. 24с.
8. Pieterse C., Leon-Reyes A., Van der Ent S. & Van Wees S. Networking by small-molecule hormones in plant immunity// Nature chemical biology. 2009. N 5. V. 1, P. 308-316.