

Т Е О Р Е Т И Ч Е С К И Е И Э К С П E R I M E N T A L N Y E
И С С Л E D O V A N I E

УДК 635.21:632.6/07:581.19;581.4

A. M. МАНАДИЛОВА

**АКТИВНОСТЬ СА²⁺ – АТФАЗЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ
КЛЕТОК КАРТОФЕЛЯ В НОРМЕ И ПРИ
ЗАРАЖЕНИИ ГРИБОМ FUSARIUM SOLANI**

(Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина МОН РК)

Проведен сравнительный анализ гидролитической активности Са²⁺-АТФазы фракции плазмалеммы, полученной из клеток разных сортов картофеля в норме и при заражении грибом *Fusarium solani*. Мембранные препараты получали дифференциальным центрифугированием с дальнейшей очисткой в градиенте плотности сахараозы.

Растения в природе постоянно подвергаются атаке многочисленных патогенных микроорганизмов, оставаясь при этом устойчивыми к большинству из них. В ответ на попытку инфицирования, растения включают различные механизмы индуцированной устойчивости. К их числу относится: образование активных форм кислорода; уплотнение клеточной стенки (отложение каллозы и лигнина); синтез фитоалексинов; программируемая гибель клетки, известная как сверхчувствительная реакция; высвобождение гидролитических и транспортных ферментов. Немаловажная роль в этом принадлежит основным ферментам плазматических мембран – Са²⁺-АТФазам.

Как известно, ионы Са²⁺ выполняют важную регуляторную роль в метаболизме растительных клеток как в норме, так и при воздействии различных стрессовых факторов (пониженнной температуре, засухоустойчивости, патогенезе) [1].

Важное значение Са²⁺ в процессах роста и развития растений известно давно. В настоящее время показана роль Са²⁺ как вторичного мессенджера в индукции синтеза фитоалексинов (ришитина и любимины) в культуре клеток картофеля (*Solanum tuberosum*) и *Allium* сера L [2,3].

Увеличение внутриклеточной концентрации Са²⁺ по-видимому, происходит на начальном этапе в обработанных элиситором клетках и является условием для индукции фитоимунного ответа.

Концентрация ионов Са²⁺ в растительных клетках в норме составляет приблизительно 10⁻⁷ М, и поддержание ее является необходимым ус-

ловием для сохранения гомеостаза. Стабилизация концентрации кальция в цитоплазме происходит благодаря Са²⁺-транспортирующим системам, которые участвуют в перемещении избытка ионов в клеточные органеллы или клеточные стенки. Ведущую роль в этом процессе играют Са²⁺-транспортирующие аденоэозинтрифосфатазы (Са²⁺-АТФазы), связанные с плазмалеммой, тонопластом и эндоплазматическим ретикулумом [4].

Цель данной работы состоит в изучении гидролитической активности Са²⁺-АТФазы фракции плазмалеммы картофеля, отличающихся по устойчивости к грибу *Fusarium solani* (in vitro и in vivo) и некоторых физико-химических характеристик ферmenta.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили клубни и суспензионные культуры картофеля (Тамаша и Санта), отличающихся по своей устойчивости к грибу *Fusarium solani*.

Везикулярную фракцию плазмалеммы получали дифференциальным центрифугированием, с последующей очисткой в градиенте плотности сахараозы [5]. Общую микросомальную фракцию (ОМФ) получали, гомогенизируя в ступке 15 г растительного материала в 6 мл среды I следующего состава: 876 mM сахараоза, 1,211 M Трис-HCl, 35 mM ЭДТА, 50 mM аскорбиновая кислота (рН7,0). Гомогенат центрифугировали 5 мин при 8000 g, затем 15 мин при 16000 g. Супернатант собирали и центрифугировали 30 мин при 80000 g, получая осадок ОМФ (общая микросомальная

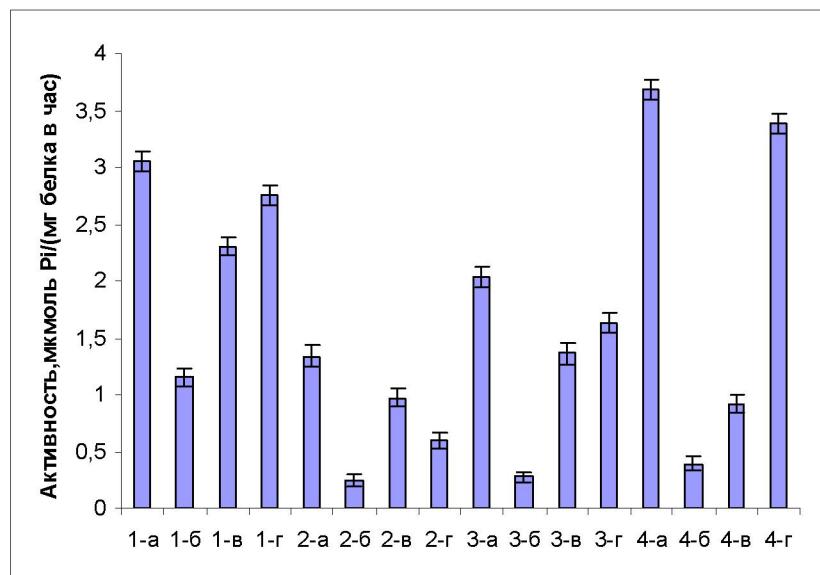


Рис.1. Гидролитическая активность везикулярных фракций плазмалеммы в присутствии а – без ингибиторов; б – ванадата (100 μ M Na₃VO₄); в – нитрата (100mM KNO₃; г – азода натрия (1mM NaN₃).1-Санта (контроль); 2 – Санта (опыт); 3 – Тамаша (контроль); 4 – Тамаша (опыт)

фракция). Осадок ОМФ гомогенизировали в среде II (150мM сахароза, 1мM Трис-Mes, pH 7,2), наносили на градиент сахарозы (20% – 50%) и центрифугировали (80000g, 2 часа). Фракцию ПМ собирали на границе двух слоев, разбавляли средой III (300мM сахароза, 10мM Трис-MES, pH 7,2).

Гидролитическую активность Ca²⁺-ATФазы фракций ПМ анализировали через 30 мин инкубации при 37°C в инкубационной среде состава: 50мM трис- HCl, 0,5 мM АТФ, 2,25мM CaCl₂, pH 7,4. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 30% ТХУ [1]. Активность АТФазы оценивали спектрофотометрически при 720нм по количеству неорганического фосфата (P_i), накапливающегося в ходе гидролиза АТФ, и выражали в мкмоль P_i / (мг белка в час). Содержание общего белка определяли микробиуретовым методом [6]. Присутствие возможных загрязнений фракции ПМ везикулами тонопласта оценивали по инкубированию 30 мин в среде с 100 mM KNO₃, АТФазы митохондрий с 1 mM азидом натрия [7].

Суспензионную культуру получали из рыхлой, относительно гомогенной каллусной ткани стебля картофеля сорта Тамаша и Санта, выращиваемые на основной среде MS с добавлением казеина (2 г/л), 2,4-Д (2,0-3,0 мг/л), путем ее переноса в жидкую питательную среду того же состава. Гриб Fusarium solani был получен из

Института микробиологии МОН РК. Культуральный фильтрат вносили в соотношении 1:10.

В работе представлены средние арифметические значения и ошибки среднего, полученные по результатам экспериментов, проведенных в 3-5 биологических повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из здоровых и зараженных культуральным фильтратом клеток картофеля, контрастных по устойчивости к грибу, получали везикулярную фракцию плазмалеммы. Для оценки чистоты полученной мембранный фракции, исследовали влияние специфических ингибиторов: ортованадата – специфический ингибитор АТРазы плазматических мембран; азода натрия – ингибитор митохондриальной АТФазы и азотокислый калий – ингибитор тонопласта (Рис.1).

Из рис.1 видно, что при добавлении в среду инкубации ортованадата, наблюдается подавление активности фермента почти на 80% во всех вариантах, и незначительное подавление активности фермента при добавлении азода натрия и нитрата калия, что свидетельствует о наличии некоторого количества примеси тонопласта.

На основании полученных данных можно говорить о том, что нами получен препарат плазматических мембран, обогащенных Ca²⁺-АТФазами.

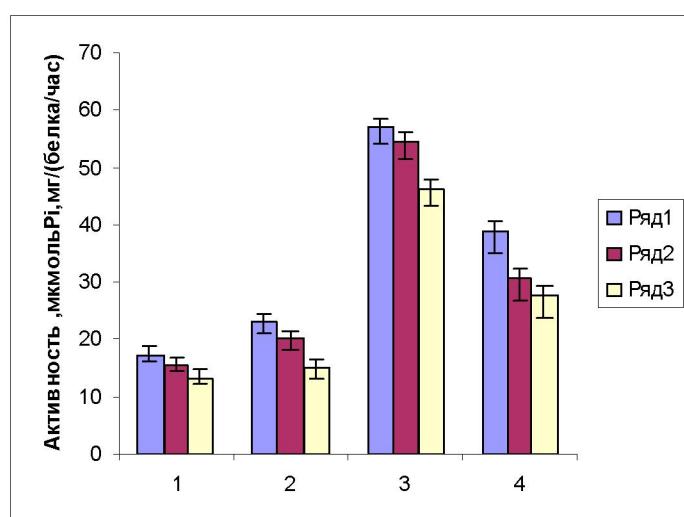


Рис. 2. Активность Ca^{2+} -АТФазы при наличии (ряд 1) и отсутствии (ряд 2) в среде инкубации ионов Ca^{2+} , и в присутствии (ряд3) ЭГТА.
1 – Санта (клубни); 2 – Тамаша (клубни);
3 – Санта (каллусы); 4 – Тамаша (каллусы)

В связи с тем, что сведений об активности Ca^{2+} -АТФазы в картофеле в литературе не обнаружено, мы провели методические опыты для выявления оптимальных условий определения активности фермента (концентрация ионов Ca^{2+} и ингибитора Ca^{2+} -АТФазы ЭГТА – этиленгликолькететраацетат), оптимум pH среды). Концентрации АТФ, Ca^{2+} , ЭГТА были подобраны в опытах по степени активирования или ингибирования Ca^{2+} -АТФазы. За основу мы взяли концентрации ионов Ca^{2+} , подобранные для листьев кукурузы [1]. Результаты показали, что эти концентрации вполне подходят и для нашего объекта – клубней и каллусов картофеля. Максимальная активность фермента выявлена при концентрации ионов Ca^{2+} 2,25 mM; при более низкой концентрации ионов Ca^{2+} активность АТФазы была незначительной, а при более высокой – снижалась относительно оптимума (рис.2). При отсутствии в среде инкубации ионов Ca^{2+} (ряд 2) и наличии специфического ингибитора Ca^{2+} -АТФазы (ряд 3) происходит снижение активности фермента на 20%. Гидролитическая активность Ca^{2+} -АТФазы оказалась значительно выше в культивируемых клетках.

Для выяснения оптимальных условий определения активности АТФазы, необходимо определить оптимум pH, локализованной на плазмалемме клеток растений картофеля двух сортов, контрастных по устойчивости к возбудителю фузариоза. Данные литературы свидетельствуют о том, что оптимум активности Ca^{2+} -АТФазы регистрируется при pH 7,0-8,0.[1]. Однако для разных растений эти параметры могут существенно варьировать. Так, на везикулах ПБМ,

выделенных из корневых клубеньков люпина желтого, выявлена активность Ca^{2+} -АТФазы с широкой субстратной специфичностью и оптимумом pH 6,2 – 6,4 [8], в листьях кукурузы при pH 6,0 и pH 8,0 [1].

Для растений картофеля (анализировались клубни и каллусы) Санта, восприимчивого к грибу *Fusarium solani* нами выявлен один максимум активности фермента – при pH 7,0; для картофеля (клубни, каллусы) устойчивого к грибу сорта Тамаша максимум активности фермента отмечается в более щелочной области – pH 7,6 (рис.3).

Активность ферментов при различных значениях pH инкубационной среды обусловлена видимо различной субклеточной локализацией и различными изоформами Ca^{2+} -АТФазы.

При заражении разных по устойчивости сортов картофеля культуральным фильтратом гриба *Fusarium solani*, обнаружено повышение гидролитической активности Ca^{2+} -АТФазы в первые часы заражения грибом в устойчивых сортах картофеля (Тамаша), тогда как у восприимчивого сорта

(Санта) гидролитическая активность не меняется. Через сутки отмечается повышение активности фермента, как в устойчивом, так и восприимчивом сортах (рис.4). Активация Ca^{2+} -АТФазы в течение грибного патогенеза приводит к усилению процесса поступления ионов Ca^{2+} через плазмалемму в апопласт или перемещение кальция из цитозоля во внутриклеточное депо (митохондрии, эндоплазматический ретикулум, вакуоль), что приводит к усилению защитных механизмов. Причем для устойчивого сорта, это отмечается уже в первые часы инфицирования

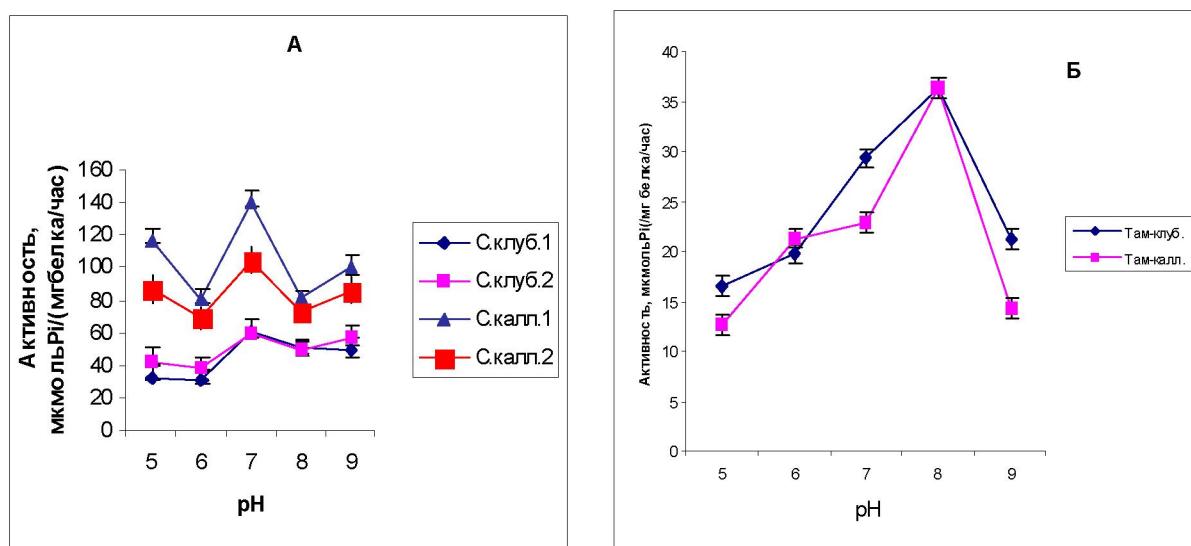


Рис.3. Зависимость активности Ca^{2+} -АТФазы от pH среды инкубации в клубнях и каллусах картофеля сорта Санта (А) и клубнях сорта Тамаша (Б)

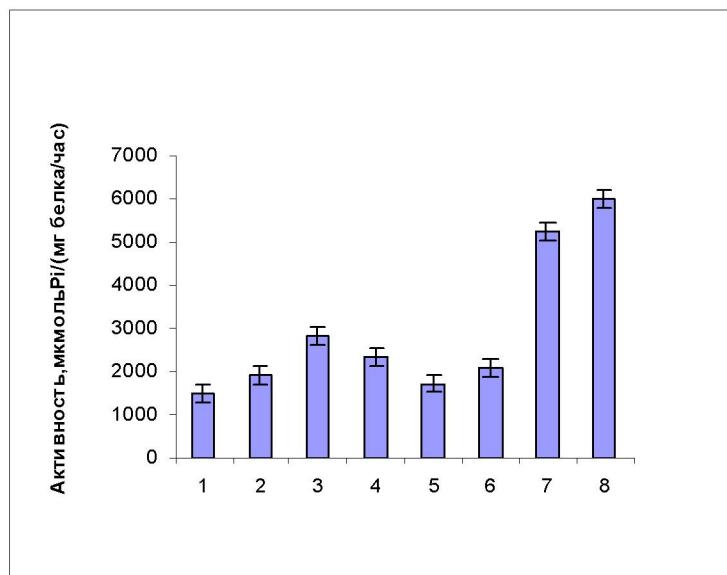


Рис. 4. Влияние культурального фильтрата гриба *Fusarium solani* на активность Ca^{2+} -АТФазы суспензионных культур картофеля (1 – Тамаша, контроль, час; 2 – Тамаша, опыт, час; 3 – Санта, контроль, час; 4 – Санта, опыт, час; 5 – Тамаша, контр., сутки; 6 – Тамаша, опыт, сутки; 7 – Санта, контр., сутки; 8 – Санта, опыт, сутки)

грибом, а для восприимчивого сорта процесс активирования более замедлен и проявляется через сутки. Отмечается значительное повышение активности фермента, как в контроле, так и в опытном варианте.

Исследования, проведенные по влиянию биогенных факторов на клетки [9], показали, что изменение активности фермента Ca^{2+} -АТФазы является результатом конформационных перестроек молекулы фермента, сопровождающиеся изменением скорости ферментативной реакции и срод-

ством фермента к субстрату. Поэтому представляется важным изучить кинетические характеристики Ca^{2+} -АТФазы разных по устойчивости сортов картофеля и их изменение при заражении грибом *Fusarium solani*.

На фракциях очищенных плазматических мембран, обогащенных Ca^{2+} -АТФазой, выделенных из картофеля (*in vitro*) были установлены кинетические характеристики. При исследовании кинетики АТФазной активности установлено, что гиперболический характер кривой зависимости

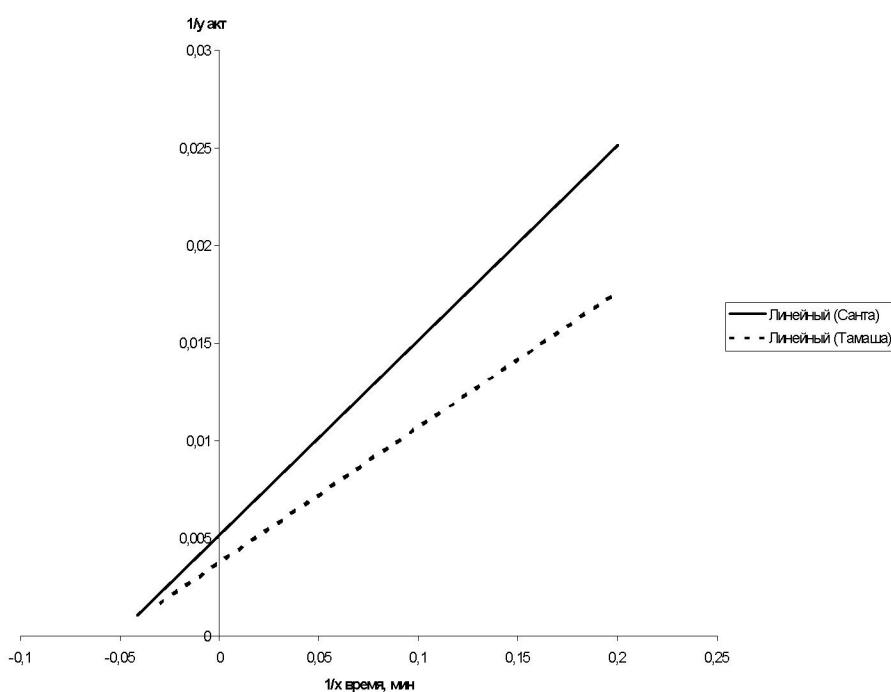


Рис.5. Зависимость скорости гидролиза АТФ Ca^{2+} -АТФазой плазматических мембран картофеля (Санта – восприимчивый сорт, Тамаша – устойчивый сорт) от времени инкубации в обратных координатах

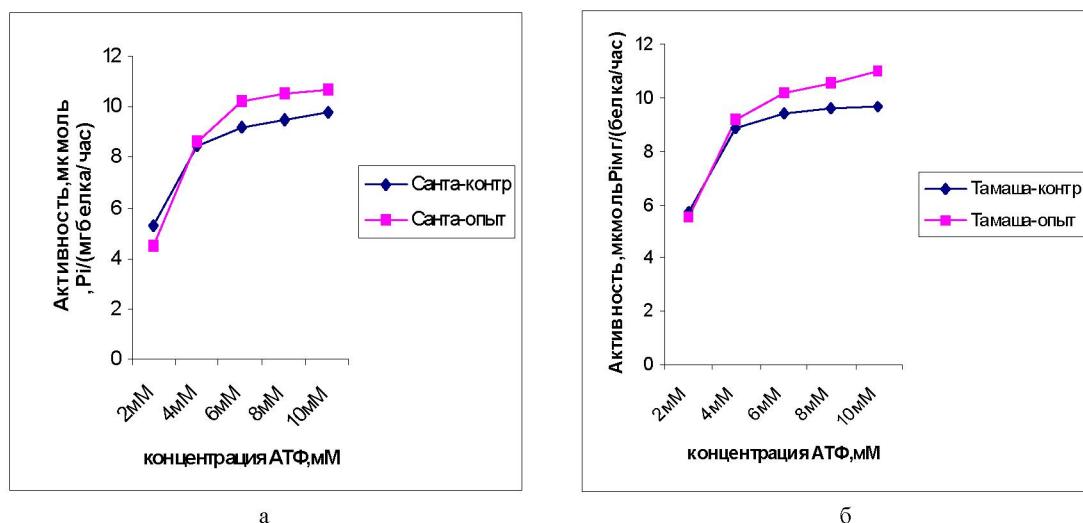


Рис.6. Кинетические кривые изменения скорости гидролиза АТФ Ca^{2+} -АТФазой ПМ от концентрации субстрата в норме и при заражении *Fusarium solani*. а. Санта – к ((здоровые клетки картофеля); Санта-о (инфицированные клетки картофеля); б. Тамаша – к (здоровые клетки картофеля); Тамаша-о (инфицированные клетки картофеля)

скорости ферментативной реакции от времени инкубации и от концентрации АТФ соответствует уравнению Михаэлиса-Ментен. Величина K_m при этом изменилась, но не существенно; в устойчивом сорте несколько выше, чем в восприимчивом сорте Санта (Рис.5).

Анализ кинетических кривых зависимости скорости гидролиза АТФ от ее концентрации субстрата показал, что для ПМ, выделенных из ус-

тойчивого картофеля, максимальная скорость была в 1,5 раза выше по сравнению с восприимчивым сортом (Рис.6). В растениях, подвергнутых заражению в течение суток, отмечается увеличение максимальной скорости гидролиза АТФ по сравнению с контролем.

Полученные данные позволяют сделать вывод о различии кинетических характеристик Ca^{2+} -АТФаз разных по устойчивости сортов картофе-

ля; в устойчивом сорте скорость гидролиза выше, чем в восприимчивом. Заражение картофеля грибом *Fusarium solani* вызывает структурные изменения активного центра Ca^{2+} -АТФазы, сопровождающиеся увеличением скорости распада фермент-субстратного комплекса, что приводит к повышению величины K_m при заражении.

Из клеток картофеля, контрастных по устойчивости к грибу *Fusarium solani*, выделены фракции плазматических мембран, обогащенных Ca^{2+} -АТФазой. Оптимум активности Ca^{2+} -АТФазы регистрируется при рН 7,0-7,5. При заражении культуральным фильтратом гриба *Fusarium solani* происходит увеличение активности Ca^{2+} -АТФазы как в устойчивом, так и восприимчивом сортах картофеля. Причем, в устойчивом картофеле Тамаша активирование фермента наблюдается уже через час после заражения, в то время как в восприимчивом – через сутки. Заражение приводит к изменению физико-химических параметров фермента, и соответственно к усилению потока ионов Ca^{2+} через мембрану. Об этом свидетельствуют изменения кинетических параметров в здоровых и зараженных растениях; в зараженных клетках картофеля наблюдается увеличение K_m . При этом увеличивается скорость распада фермент-субстратного комплекса и нарушается регуляторный контроль за работой фермента. Активация Ca^{2+} -АТФазы в течение грибного патогенеза приводит к усилению процесса поступления ионов Ca^{2+} через плазмалемму в апопласт или перемещения кальция из цитозоля во внутриклеточное депо, что приводит к усилению защитных механизмов.

Автор выражает глубокую признательность д.б.н. М.Ф.Шишовой и А.А. Киртичниковой за помощь при выделении фракции плазматических мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лукаткин А.С., Еремкина Т.Н. Активность Ca^{2+} -АТФазы в листьях растений кукурузы под влиянием ох-

лаждения и в последействии // Сельскохозяйственная биология. 2002. № 3. С. 73-76.

2. Michael N. Z., Jeffrey S. R. and Joseph A.K. A role for Ca^{2+} in the elicitation of rishitin and lubimin accumulation in Potato tuber tissue // Plant Physiology. 1987. V. 84. P.520-525.

3. Дьячок Ю.В., Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М. Роль Ca^{2+} как вторичного мессенджера в индукции синтеза фитоалексинов и каллозы в культуре клеток *Allium cepa* L. // Физиология растений. 1997. Т. 44, № 3. С. 385-391.

4. Briskin D.P. Ca^{2+} -translocating ATPase of the plant plasma membrane // Plant Physiology. 1990. V.94. P. 397-400.

5. Рудашевская Е.Л., Киртичникова А.А., Шишова М.Ф. Активность H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток колеоптилей в процессе развития проростка кукурузы // Физиология растений. 2005. Т.52, № 4. С. 566-572.

6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971. 309 с.

7. Astolfi S., De Biasi M.G., Rugini E., Varanini Z. Isolation and preliminary characterization of ATPase from olive calli grown at different auxin /cytokinin ratio // Biologia Plantarum. 1998. V. 41. P.321-330.

8. Дуброва П.Н., Крылова В.В., Ливанова Г.И., Жизневская Г.Я., Измайлов С.Ф. // Физиология растений. 1992. Т.39, №.3.С.503-512.

9. Шибарова А.Н. Действие ионизирующего излучения в малой дозе на кинетические параметры работы H^+ -АТФазы плазматических мембран клеток высшего растения (*Cucurbita pepo*) // Тез. докл. III международной междисциплинарной конференции «НБИТТ-21». Петропавловск, 2004. 37 с.

Резюме

Әртүрлі сортты картоптың қалыпты және *Fusarium solani* саңырауқұлагымен залалданған клеткаларының Ca^{2+} -АТФазаның плазмалеммасының фракциясына салыстырмалы гидролитикалық белсенділігіне талдау жүргізілді. Мембраналық препараттарды сахарозаның тығызы градиентінде үзақ тазалап, дифференциалды центрифугалау арқылы алды.

Summary

The comparative analysis was conducted for the Ca^{2+} -ATPase hydrolyte activity of plasmalemma fraction, obtained from the cells of different potato varieties in normal conditions and under infection of the fungus *Fusarium solani*. Membrane preparations were obtained by differential centrifugation with subsequent purification in the sucrose density-gradient.