

А. М. МАНАДИЛОВА, Г. Т. ТУЛЕЕВА

## АКТИВНОСТЬ $H^+$ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК КАРТОФЕЛЯ В НОРМЕ И ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ГРИБОМ *FUSARIUM SOLANI*

Растительные организмы в ответ на инфицирование способны индуцировать устойчивость к разнообразным фитопатогенам, используя различные механизмы. Важным звеном защитного ответа при инфицировании является активация патогензависимых ферментов, в том числе АТФаз. Активация ферментов ведет к передаче и усилению элиситорных сигналов, завершающихся экспрессией защитных генов и биосинтезом веществ, которые в конечном итоге определяют ответ клеток и растения в целом на инфицирование патогеном.

К наиболее ранним реакциям растительной клетки на заражение относится изменение транспорта ионов и величины трансмембранного потенциала плазмалеммы, в которых активную роль принимают АТФазы плазматических мембран, причем важную роль в устойчивости растений к фитопатогенам выполняют плазмалеммная  $H^+$ -АТФаза. [1].

$H^+$ -АТФаза – ключевая ферментная система плазматических мембран (ПМ) клеток высших растений. Протонная помпа ПМ играет важную роль в клетке, контролируя жизненно важные процессы, такие как рост, тургор, транспорт веществ, роль которых значительно возрастает при патогенезе.  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы (ПМ) растительных клеток относится к АТФазам Р-типа, является  $Mg^{2+}$ -зависимой,  $K^+$ -стимулируемой и создает электрохимический градиент протонов на ПМ, осуществляя биоэнергетическую и регуляторную функцию в жизни растений [2].

Цель работы состоит в изучении гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы фракции плазмалеммы клеток картофеля в норме и при заражении грибом *Fusarium solani*.

### Методика

Объектом исследования служили суспензионные культуры картофеля (Тамаша и Санта), отличающиеся по своей устойчивости к грибу *Fusarium solani*. Везикулярную фракцию плазмалеммы получали методом деления мембран в водной двухфазной системе (ПЭГ/декстран) [3].

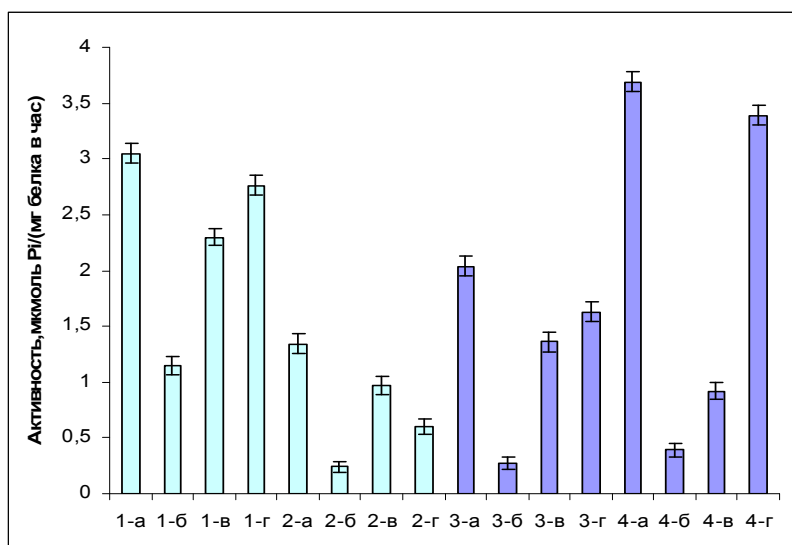
Для деления мембран в водной двухфазной системе ПЭГ/декстран, осадок ОМФ гомогенизировали в 5 мл К-фосфатного буфера (3 мМ КСl, 5 мМ  $KH_2PO_4/KOH$ , рН 7,8, 330 мМ сахараза) и вносили в пробирку, содержащую фазовую смесь (конечные концентрации в фазовой системе: 6,2 % (в/в) ПЭГ 3350/декстран Т500, 330 мМ сахараза, 3 мМ КСl, 5 мМ  $KH_2PO_4/KOH$ , рН 7,8). Полученную фазовую систему тщательно перемешивали и центрифугировали 3 мин при 1500 г. Собирали верхнюю фазу и наносили на новую нижнюю фазу системы. Очистку повторяли 3 раза. Собранную последний раз верхнюю фазу, содержащую ПЭГ и фракцию ПМ, разбавляли в три раза средой IV (300 мМ сахараза, 10 мМ Трис-Мес, рН 7,2) и центрифугировали 1 ч при 99 500 г. Осадок мембран гомогенизировали в 150 мкл среды IV.

Гидролитическую активность  $H^+$ -АТФазы фракций ПМ анализировали через 30 мин инкубации при 37°C в инкубационной среде состава: 50 мМ КСl, 3 мМ АТФ, 3 мМ  $MgCl_2$ , 30 мМ Трис-Мес, рН 7,0. Реакцию останавливали 20% ТХУ на ледяной бане. Активность АТФазы оценивали спектрофотометрически при 720 нм по количеству неорганического фосфата [3]. Содержание общего белка определяли микробиуретовым методом [4].

Суспензионную культуру получали из рыхлой, относительно гомогенной каллусной ткани стебля картофеля сорта Тамаша и Санта, выращиваемой 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. Мицелий получали, выращивая грибок в матрацах на жидкой картофельной среде в течение 10–12 дней. Фракции, содержащие белки, углеводы и нафтазарин выделяли из мицелия как описано [5].

### Результаты и обсуждение

Для оценки чистоты полученной мембранной фракции исследовали влияние специфических ингибиторов: ортованадата – специфический



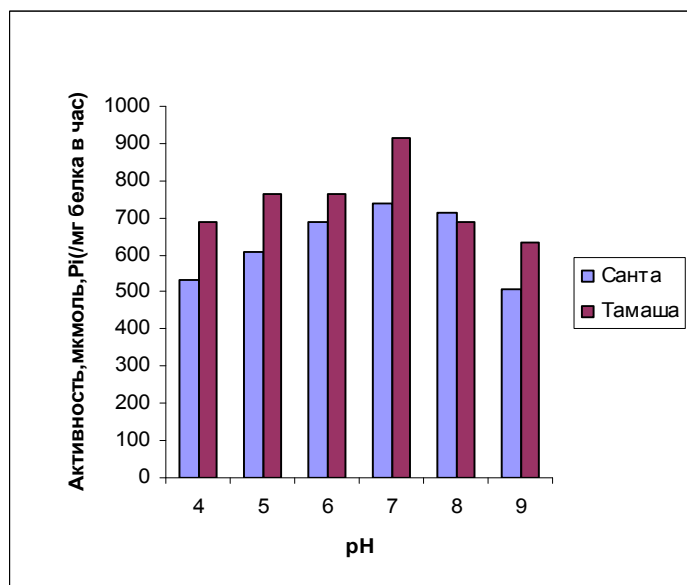
**Рис. 1.** Гидролитическая активность везикулярных фракций плазмалеммы: *а* – без ингибиторов; *б* – ванадата (100 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>); *в* – нитрата (100 мМ KNO<sub>3</sub>); *г* – азиды натрия (1 мМ NaN<sub>3</sub>); 1 – Санта (контроль); 2 – Санта (опыт); 3 – Тамаша (контроль); 4 – Тамаша (опыт)

ингибитор АТФазы плазматических мембран; азид натрия – ингибитор митохондриальной АТФазы и азотнокислый калий – ингибитор тонопласта (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 азиды натрия и нитрата калия, что свидетельствует о наличии некоторого количества примеси тонопласта.

Полученные данные свидетельствуют о том, что нами получен препарат плазматических

мембран, обогащенный АТФазами. Этот препарат будет использован для изучения гидролитической активности фермента.

Для выяснения оптимальных условий работы АТФазы необходимо определить оптимум рН, локализованный на плазмалемме клеток растений картофеля двух сортов, контрастных по устойчивости к возбудителю фузариоза. Данные [2] свидетельствуют о том, что оптимум активности Н<sup>+</sup>-АТФазы регистрируется при рН 7,0–7,5. Для растений картофеля Санта и Тамаша максимум активности фермента отмечался при – рН 7,0 (рис. 2).



**Рис. 2.** Зависимость активности Н<sup>+</sup>-АТФазы от рН среды инкубации в суспензионной культуре картофеля сорта Санта и Тамаша

**Субклеточное фракционирование.** Субклеточные фракции получали дифференциальным центрифугированием гомогената из суспензионных культур картофеля. Ядра, клеточные стенки (в основном плазматические мембраны), осаждали при 1000g в течение 10 мин. Пластиды, которые представляют собой вакуоли, хлоропласты, лейкопласты и хромопласты, осаждали при 4000 g 10 мин; митохондрии при 20 000 g 30 мин и микросомы 90 мин при 105000 g [6]. Полученные осадки диализовали. Активность фермента определяли по нарастанию неорганического фосфата в среде инкубации, содержащей 50мМ трис-HCl буфера (pH 7,0) и 0,5 мМ АТФ. Инкубация 30 мин при 38°C.

Наибольшей активностью обладают фракции, осаждаемые при 4000 g, и эта активность принадлежит фракции клеточных стенок и плазматических мембран. Значительная активность H<sup>+</sup>-АТФазы обнаружена в Тамаше и Санте в пластидах. Отмечается небольшая активность фермента в митохондриальной фракции как в устойчивом, так и в восприимчивом сортах. Изучение субклеточной локализации H<sup>+</sup>-АТФаза также показало высокую активность фермента в клеточной мембране и митохондриях и незначительную в пластидах и микросомах. Проведенные эксперименты подтвердили, что изучаемые АТФазы картофеля принадлежат в основном наружной плазматической мембране.

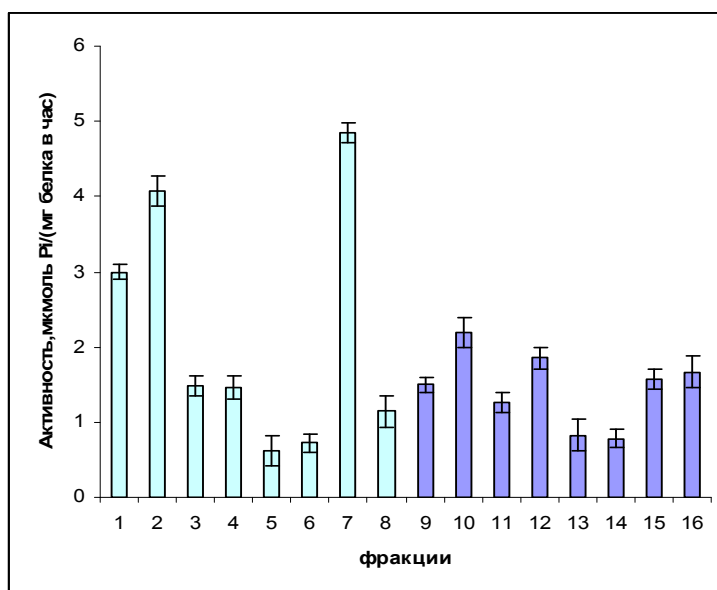
При заражении разных по устойчивости сортов картофеля культуральным фильтратом гриба

*Fusarium solani* обнаружено понижение гидролитической активности H<sup>+</sup>-АТФазы в первые часы заражения грибом восприимчивого сорта картофеля (Санта), тогда как у устойчивого сорта (Тамаша) гидролитическая активность не меняется (разведение 1:10). Через сутки отмечается повышение активности фермента как в устойчивом, так и в восприимчивом сортах. На основании полученных данных, для дальнейших опытов мы использовали растительный материал, полученный через сутки после заражения грибом *Fusarium solani*.

**Изучение возможных центров связывания метаболитов гриба *Fusarium solani*, с H<sup>+</sup>-ТФазой плазматических мембран.** Метаболит гриба *Fusicoccum amigdalli* фузикоцин (ФК) широко используется для изучения корреляции между активностью H<sup>+</sup>-АТФазы по выходу протонов и количеством 14-3-3 белков в нормальных условиях и при патогенезе. Особенностью мембраносвязанных белков 14-3-3 является их участие в рецепции фузикоцина, а взаимодействие ФК с рецептором вызывает активацию H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы и закрытие K<sup>+</sup>-выводящих каналов [7]. На рис. 3 представлены данные по сравнительному анализу влияния фузикоцина и метаболитов гриба *Fusarium solani* на гидролитическую активность H<sup>+</sup>-АТФазы.

Опыты с фузикоцином и метаболитами гриба *Fusarium solani* показали значительное повышение активности H<sup>+</sup>-АТФазы в обоих сортах картофеля при добавлении в среду инкубации

**Рис. 3.** Влияние фузикоцина и метаболитов гриба *Fusarium solani* на активность H<sup>+</sup>-АТФазы: 1 – Тамаша, контроль; 2 – Тамаша, фузикоцин; 3 – Тамаша, белковая фракция + фузикоцин; 4 – Тамаша, фузикоцин + белковая фракция; 5 – Тамаша, углеводная фракция + фузикоцин; 6 – Тамаша, фузикоцин + углеводная фракция; 7 – Тамаша, нафтазарин + фузикоцин; 8 – Тамаша, фузикоцин + нафтазарин; 9 – Санта-контроль; 10 – Санта, фузикоцин; 11 – Санта, белковая фракция + фузикоцин; 12 – Санта, фузикоцин + белковая фракция; 13 – Санта, углеводная фракция + фузикоцин; 14 – Санта, фузикоцин + углеводная фракция; 15 – Санта, нафтазарин + фузикоцин; 16 – Санта, фузикоцин + нафтазарин. Концентрация фузикоцина и нафтазарина – 10<sup>-6</sup>М. Концентрация белковой и углеводной фракции – 10 мкг/мл



фузикококцина и нафтазарина; добавление в среду инкубации других элиситоров гриба снимает активирование ферментов.

Впервые показано стимулирующее действие нафтазарина на скорость выделения протонов в суспензионных клетках картофеля. Возможно, по своему механизму нафтазарин аналогичен фузикококцину и, связываясь с плазматической мембраной, образует комплекс между димером 14-3-3 и  $H^+$ -АТФазой, что ведет к активации протонной АТФазы. Нафтазарин можно использовать в качестве инструмента для изучения взаимодействия метаболитов гриба *Fusarium solani* и протонных АТФаз.

**Заключение.** Из суспензионных клеток картофеля, контрастных по устойчивости к грибу *Fusarium solani*, выделены фракции плазматических мембран, обогащенные  $H^+$ -АТФазами.

Изучены основные структурно-функциональные показатели (оптимум активности, субклеточная локализация) патогензависимых ферментов плазматических мембран клеток картофеля в норме и при заражении грибом *Fusarium solani*.

Установлено, что углеводная и углеводно-липидная фракции мицелия гриба *Fusarium solani* являются индукторами –  $H^+$ -АТФаз; белковая фракция ингибирует активность –  $H^+$ -АТФазы; нафтазарин в 2–3 раза увеличивает активность фермента, и по своему механизму действия идентичен фузикококцину.

Таким образом, из мицелия гриба *Fusarium solani* выделен метаболит

фенольной природы – нафтазарин (-5,6-диокси-нафтохинон), который значительно активизирует работу  $H^+$ -АТФазы в устойчивом сорте Тамаша, и может быть использован в качестве инструмента исследования механизмов устойчивости картофеля к патогенезу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Васекина А.В., Еришов П.В., Решетова О.С. Вакуолярный  $Na^+$ /  $H^+$ -антипортер ячменя: идентификация и реакция на солевой стресс // Биохимия. 2005. Т. 70, вып. 1. С. 123-132.
2. Чельшева В.В., Зориняну С.Э., Смоленская И.Н., Бабаков А.В. Регуляция  $H^+$ -насоса в плазматических мембранах растений при осмотическом стрессе: роль белков 14-3-3 // Физиология растений. 2001. Т. 48, № 3. С. 325-333.
3. Рудашевская Е.Л., Кирпичникова 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.
4. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971. С. 309-310.
5. Озерецковская О.Л., Чалова Г.И., Чаленко Г.И., Караваева К.А., Авдюшко С.А. Индукция системной устойчивости к болезням с помощью биогенного элиситора защитных реакций // Серия биологическая. 1986. №1. С. 24-31.
6. Плеханова Л.С., Ивлева Л.Б., Азимов Р.А., Ибрагимова Э.А. АТФазная активность плазматических мембран из корней хлорчатника // Физиология растений. 1991. Т. 38, вып. 2. С. 273-279.
7. Шанько А.В., Месенко М.М., Клычников О.И., Носов А.В., Иванов В.Б. Активность протонной помпы в растущей части корня кукурузы: корреляция с 14-3-3 белками и изменениями при осмотическом стрессе // Биохимия. 2003. Т. 68, вып. 12. С. 1639-1647.

## Резюме

Әртүрлі сортты картоптың қалыпты және *Fusarium solani* саңырауқұлағымен зақымдалған клеткаларына  $H^+$ -АТФазаның плазмалеммасының фракциясына салыстырмалы гидролитикалық белсенділігіне талдау жүргізілді. Мембраналық препараттарды сулы екі фазалы жүйелердің бөлшектенуінде (ПЭГ/Декстран) ұзақ тазалау арқылы алынды.

## Summary

Comparison of plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity in cells of different potato varieties in normal conditions and under infection of the fungus *Fusarium solani*. Plant plasma membrane vesicles was purified by partitioning in aqueous two-phase systems (PEG/Dextran).

УДК 635.21:632.6/07:581.19;581.4

Институт Молекулярной биологии  
и биохимии им. М. А. Айтхожина,  
г. Алматы

Поступила 10.10.08г.