УДК 635.21:632.6/07:581.19;581.4

А. М. МАНАДИЛОВА

АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} – 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 Ca^{2+}- 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 сахарозы.

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; программированная гибель клетки, известная как сверхчувствительная реакция; высвобождение гидролитических и транспортных ферментов. Немаловажная роль в этом принадлежит основным ферментам плазматических мембран – Ca^{2+}-АТФазам.

Как известно, ионы Ca^{2+} выполняют важную регуляторную роль в метаболизме растительных клеток как в норме, так и при воздействии различных стрессовых факторов (пониженной температуре, засухоустойчивости, патогенезе) [1].

Важное значение Ca^{2+} в процессах роста и развития растений известно давно. В настоящее время показана роль Ca^{2+} как вторичного мессенджера в индукции синтеза фитоалексинов (ришитина и любимина) в культуре клеток картофеля (Solanum tuberosum) и Allium cepa L [2,3].

Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} по-видимому, происходит на начальном этапе в обработанных элиситором клетках и является условием для индукции фитоиммунного ответа.

Концентрация ионов Ca^{2+} в растительных клетках в норме составляет приблизительно 10^{-7} М, и поддержание ее является необходимым условием для сохранения гомеостаза. Стабилизация концентрации кальция в цитоплазме происходит благодаря Ca^{2+}- транспортирующим системам, которые участвуют в перемещении избытка ионов в клеточные органеллы или клеточные стенки. Ведущую роль в этом процессе играют Ca^{2+} – транспортирующие аденозинтрифосфатазы (Ca^{2+}-АТФазы), связанные с плазмалеммой, тонопластом и эндоплазматическим ретикулумом [4].

Цель данной работы состоит в изучении гидролитической активности Ca^{2+} – АТФазы фракции плазмалеммы картофеля, отличающихся по устойчивости к грибу Fusarium solani (in vitro и in vivo) и некоторых физико-химических характеристик фермента.

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 сахарозы[5].Общую микросомальную фракцию (ОМФ) получали, гомогенизируя в ступке 15г растительного материала в 6 мл среды I следующего состава: 876мМ сахароза,1,211М Трис-HCl, 35мМ ЭДТА, 50мМ аскорбиновая кислота (pH7,0). 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

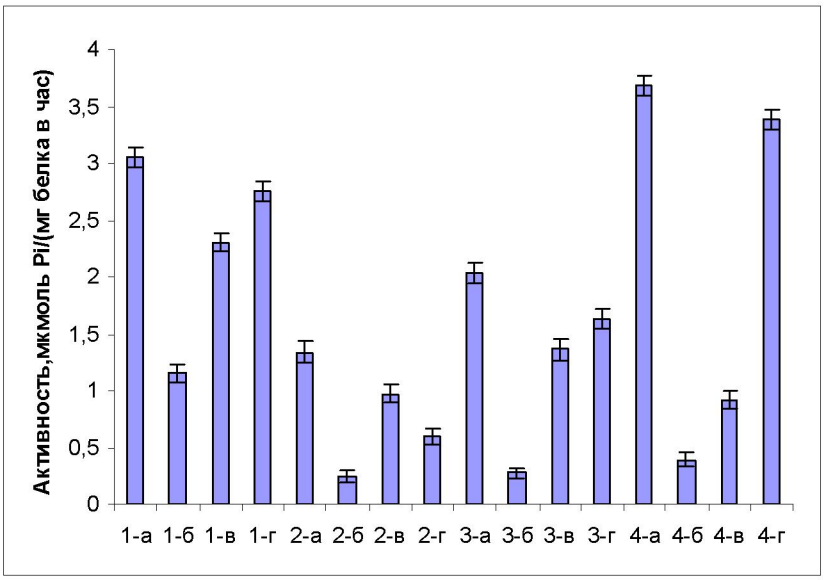

Рис.1. Гидролитическая активность везикулярных фракций плазмалеммы в присутствии а – без ингибиторов; б – ванадата (100μM Na_3VO_4); в – нитрата (100мМ KNO_3; г – азида натрия (1мМ NaN_3).1-Санта (контроль); 2 – Санта (опыт); 3 – Тамаша (контроль); 4 – Тамаша (опыт)

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

Гидролитическую активность Ca^{2+} -АТФазы фракций ПМ анализировали через 30 мин инкубации при 37°С в инкубационной среде состава: 50мМ трис- HCl, 0,5 мМ АТФ, 2,25мМ $CaCl_2$, 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 KNO_3, 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 мембранной фракции, исследовали влияние специфических ингибиторов: ортованадата – специфический ингибитор АТРазы плазматических мембран; азида натрия – ингибитор митохондриальной АТФазы и азотнокислый 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 азида 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 Ca^{2+} -АТФазами.