

УДК 581.132:577.152.1

Д. Р. Алиева, Г. Г. Бабаев, И. В. Азизов

Институт ботаники НАН Азербайджана, Баку

АКТИВНОСТЬ И ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ ПЕРОКСИДАЗЫ КЛЕТОК *DUNALIELLA SALINA* ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ

Исследовано влияние повышения концентрации *NaCl* (0,5–4,0 М) на образование пролина и активность свободной пероксидазы клеток зеленой водоросли *Dunaliella salina*. Устойчивость клеток водоросли к действию *NaCl* определяется функционированием комплекса метаболических реакций, включающих как необходимый компонент стресс-индуцируемую аккумуляцию пролина, так и высокую активность свободной пероксидазы. Полученные данные свидетельствуют о глубокой перестройке метаболических процессов в клетках водоросли в процессе адаптации к условиям засоления.

Д. Р. Алиева, Г. Г. Бабаев, И. В. Азизов

Институт ботаники НАН Азербайджану, Баку

АКТИВНІСТЬ ТА ІЗОФЕРМЕНТНИЙ СКЛАД ПЕРОКСИДАЗИ КЛІТИН *DUNALIELLA SALINA* ПРИ СОЛЬОВОМУ СТРЕСІ

Досліджено вплив підвищення концентрації *NaCl* (0,5–4,0 М) на утворення проліну та активність вільної пероксидази клітин зеленої водорості *Dunaliella salina*. Виявлено, що стійкість клітин водорості до дії *NaCl* визначається функціонуванням комплексу метаболічних реакцій, що включають як необхідний компонент стрес-індуковальну акумуляцію проліну, так і високу активність вільної пероксидази. Отримані дані свідчать про глибоку перебудову метаболічних процесів у клітинах водорості у процесі адаптації до умов засолення.

D. R. Aliyeva, H. G. Babayev, I. V. Azizov

Institute of Botany of Azerbaijan National Academy of Sciences, Azerbaijan

ACTIVITY AND ISOFORM CONTENT OF PEROXIDASE IN *DUNALIELLA SALINA* CELLS UNDER SALT STRESS

The effect of elevated *NaCl* concentrations (0.5–4.0 M) on the proline content and activity of free peroxidase in green alga *Dunaliella salina* have been investigated. It was revealed that the tolerance of the alga to *NaCl* effect was determined by the functioning of the complex of metabolic reactions including both the necessary stress-induced accumulation of proline and high activity of the free peroxidase. The obtained data demonstrate testify to a deep reorganization of metabolic processes, occurring in alga cells during the adaptation to elevated salinity conditions.

Введение

В процессе эволюции растения выработали механизмы адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды. Способность растительных клеток и организмов реагировать соответствующим образом на внешние воздействия является необходимым компонентом существования и приспособления к условиям окружающей среды. Особая роль в протекторно-адаптивных механизмах отводится азотистым соединени-

ям, в частности, пулу свободных аминокислот. Универсальным органическим протекторным соединением в растительном мире является пролин, который выступает в качестве осмолита, антиоксиданта и регулятора экспрессии генов осмотического ответа [11; 18]. Пролин в условиях солевого стресса не только снижает осмотический потенциал, но и уменьшает вредное воздействие $NaCl$ [13]. О накоплении пролина в люцерне, листьях ячменя и пшенице в ответ на солевой стресс было ранее сообщено [8; 19]. Существует мнение о том, что пролин играет бифункциональную роль в адаптации к стрессу: на свету – в качестве осмопротектора и в темноте как субстрат, снабжающий энергией, необходимой для накопления ионов в вакуоли [7; 19].

Полученные к настоящему времени данные показывают, что устойчивость растительных организмов к разнообразным воздействиям во многом определяется состоянием систем детоксикации АФК. Среди ферментов, обеспечивающих антиоксидантную защиту растений, важную роль играет пероксидаза (ПО, КФ 1.11.1.7), отвечающая за регуляцию концентрации H_2O_2 и органических пероксидов в клетках [14]. Пероксидаза является одним из маркерных ферментов и практически первой активируется в ответ на стресс. Этот фермент локализуется в разных органоидах растительной клетки [2; 15]. Это предполагает дифференциальное вовлечение его изоформ в защитные системы растений. Изучение поведения энзиматического аппарата *D. salina* в различных условиях осмотического давления, несомненно, представляет общебиологический интерес.

Цель настоящей работы – выявить механизмы адаптации клеток зеленой водоросли *Dunaliella salina* к повышенной концентрации $NaCl$ и определить защитную роль пероксидазы в этом процессе.

Материал и методы исследований

Объект исследования – одноклеточная зеленая водоросль *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyceae). Водоросли выращивали в плоскодонных колбах на качалке в жидкой питательной среде при круглосуточном освещении 20 Вт/м^2 и температуре воздуха $23,1 \text{ }^\circ\text{C}$, pH среды доводили до $7,3\text{--}7,5$ с помощью $0,1 \text{ M NaOH}$. Клетки выращивали в среде, содержащей $0,5 \text{ M NaCl}$, затем их переносили в среду, содержащую $1, 2, 3$ и 4 M NaCl , соответственно.

Экстракцию и определение свободного пролина проводили по методу Bates и др. [4]. Оптическую плотность пролина определяли спектрофотометрически при длине волны 520 нм . В качестве контроля использовали толуол. Калибровочную кривую строили по кристаллическому пролину.

Экстракцию и определение активности гваякол-специфичной пероксидазы проводили по методу [10]. Активность ПО определяли спектрофотометрически по увеличению оптической плотности при длине волны 470 нм в результате окисления гваякола ($E = 26,6 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) в присутствии перекиси водорода.

Качественное изменение активности ПО исследовали путем электрофореза в нативном полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лаеммли [12] с некоторыми модификациями. Для окрашивания линий пероксидазы использовали бензидиновый реактив.

Количество клеток в суспензии определяли прямым подсчетом числа клеток под микроскопом в счетной камере Горяева. Содержание белка в ферментном экстракте определяли по методу Лоури [21]. В качестве стандарта использовали БСА («SERVA», Германия). Данные по определению содержания пролина и ферментативной активности пероксидазы представлены как средние арифметические и их стандартные отклонения из двух независимых опытов, выполненных в трех биологических повторностях.

Результаты и их обсуждение

При изучении механизмов индукции и поддержания стрессоустойчивости к абиотическим факторам у растений особый интерес вызывает роль пролина в этих процессах. Это связано с тем, что содержание свободного пролина в растительных клетках многократно возрастает в ответ на различные стрессорные факторы. На рисунке 1 представлено содержание свободного пролина, измеренное на седьмые сутки после стресса.

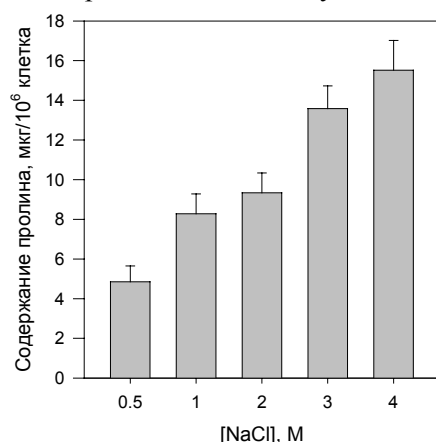


Рис. 1. Содержание свободного пролина в клетках *D. salina* при действии различных концентраций *NaCl*.

Содержание пролина в клетках *D. salina* увеличивается с повышением концентрации *NaCl* в среде. При культивировании клеток в нормальных условиях (0,5 М) уровень свободного пролина соответствовал $4,85 \pm 0,62 \mu\text{kg}/10^6$ клеток, что меньше значений в стрессовых условиях. Уровень пролина у клеток, культивируемых при 4 М *NaCl* выше, чем у контрольных, в 3 раза и составляет $15,52 \pm 0,81 \mu\text{kg}/10^6$ клеток. Сверхвысокая аккумуляция пролина является особенностью данного вида, и, как показано, действительно определяет его экстремальную устойчивость к высоким концентрациям соли [16]. Эти данные согласуются с результатами, полученными другими авторами [3; 5]. Известно, что выживание растения при стрессе часто определяется скоростью включения защитных механизмов. Если растение уже содержит некоторое дополнительное количество защитного агента широкого спектра действия – пролина, то это может придать дополнительную устойчивость клеточным системам, отвечающим за стресс: например, защитить базовые ферменты транскрипции и трансляции от ингибирования и обеспечить первичный синтез стрессовых белков.

На основе полученных данных можно заключить, что повышение содержания пролина при солевом стрессе можно считать одним из основных механизмов проявления устойчивости водорослей к засолению.

Свободный пролин обладает полуфункциональным биологическим действием при стрессе, проявляя наряду с другими защитными свойствами способность к осморегуляции и детоксикации АФК [18]. В литературе имеются данные о том, что растения, обладающие высокой активностью пероксидазы и способностью интенсивной аккумуляции пролина, могут адаптироваться к солевому шоку [20]. Результаты определения пероксидазной активности из экстрактов *D. salina* представлены на рисунке 2. При повышении концентрации *NaCl* в культивируемой среде активность ПО в клетках *D. salina* увеличивалась и достигала максимума при 3 М. Суммарная активность ПО была в 1,6 раза выше по сравнению с контролем (0,5 М). Аккумуляция пролина и высокая ак-

тивность пероксидазы у *D. salina* могут быть обусловлены ее участием в процессах лигнификации, приводящих к укреплению клеточной стенки. Известно, что гваяколпероксидаза участвует в метаболизме фенольных соединений и биосинтезе лигнина. Поэтому ее активация в клетках *D. salina* при высоких концентрациях соли могла быть как результатом включения антиоксидантной защиты, так и неспецифической реакцией на стресс, связанной с укреплением клеточных стенок [17; 23]. Современные литературные данные говорят о существовании корреляции между пероксидазной активностью и толерантностью к водным и солевым стрессам [9; 22]. *NaCl*-зависимая стимулирующая активности пероксидазы отмечена в пустынном растении *Pancreatium maritimum* [20], в листьях нута *Pisum sativum* [24], в семенах риса *Oryza sativa* [14].

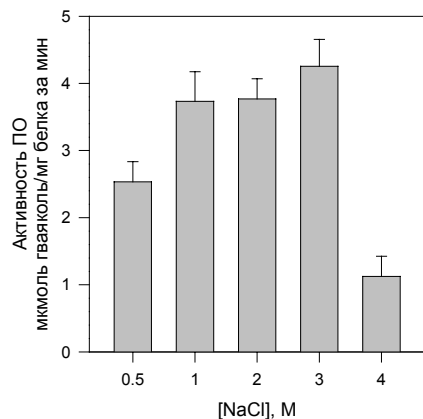


Рис. 2. Изменение активности пероксидазы клеток *D. salina*, выращенных в условиях различной концентрации *NaCl*.

Изучая действие экзогенного пролина на рост корней риса, культивируемых в среде, содержащей *NaCl*, Лин и Као, наблюдали увеличение активности пероксидазы [14]. Экзогенный пролин уменьшает рост корней риса, степень ингибирования растет с увеличением концентрации пролина от 1 до 4 мМ. Предполагается, что пролин индуцирует пероксидазу, связанную клеточной стенкой, которая приводит к увеличению синтеза лигнина, вследствие чего клеточная стенка становится жесткой. Изменение структуры клеточной стенки в процессе адаптации к повышенным концентрациям солей связано с изменением гена, кодирующего пероксидазу.

Активность пероксидазы возрастает при многих изменениях и нарушениях метаболизма растений, а некоторые изоформы ее в ответ на стресс синтезируются *de novo*. Исследование изоферментного состава пероксидазы позволило выявить 3 изоформы у *D. salina* (рис. 3). Только изоформа ПО1 присутствовала постоянно в ходе всего эксперимента. Кроме конститутивной изоформы ПО1, при электрофорезе выявлены изоформы ПО2 и ПО3, однако их экспрессия значительно различалась.

Самое интенсивное накопление изоформ пероксидазы наблюдается при 3,0 М *NaCl*. Это согласуется с данными, полученными с помощью спектрофотометрического анализа. Дальнейшее увеличение концентрации *NaCl* приводит к снижению активности этого фермента. Увеличение активности фермента может быть вызвано синтезом новых изоферментов ПО или накоплением соединений, являющихся субстратами фермента, индуцирующих его синтез. Однако высокие концентрации субстратов ПО могут ингибировать фермент, способствуя, таким образом, увеличению концентрации H_2O_2 в клетках [1]. 2,0 и 3,0 М *NaCl* усиливал экспрессию изоформ ПО2 и ПО3.

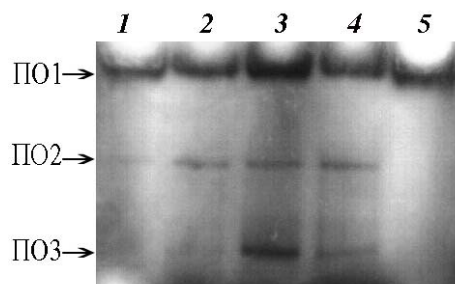


Рис. 3. Электрофоретические спектры пероксидазы клеток *D. salina*, выращенных в условиях различной концентрации NaCl:
 1 – 0,5 М NaCl, 2 – 1,0 М NaCl, 3 – 2,0 М NaCl, 4 – 3,0 М NaCl, 5 – 4,0 М NaCl.

Этот факт позволяет пролить свет на функции, выполняемые отдельными изоформами фермента, кодируемые определенными генами. Jang с соавторами [6] показали связь между изоферментным составом пероксидазы и участием генов ПО в формировании защитного механизма картофеля при инфицировании *Pectobacterium chrysanthemi*. Несмотря на различие в уровне экспрессии, индукция транскриптов ПО после инокуляции патогеном свидетельствует о том, что усиление экспрессии генов пероксидазы может быть механизмом, участвующим в приобретении растением устойчивости к последующим атакам патогена. Авторы пришли к выводу, что стресс, вызванный проникновением патогена, оказывает существенное влияние на экспрессию генов пероксидазы.

Выводы

Способность клеток водоросли аккумулировать неорганические ионы и синтезировать совместимые осмолиты в ответ на действие избыточного засоления может рассматриваться в качестве одного из важных критериев их высокого адаптивного потенциала. Полученные данные свидетельствуют о том, что устойчивость *D. salina* к действию NaCl определяется функционированием комплекса метаболических реакций, включающих как необходимый компонент стресс-индуцируемую аккумуляцию пролина, так и высокую активность свободной пероксидазы.

Библиографические ссылки

1. Андреева В. А. Фермент пероксидаза. – М. : Наука, 1988. – 128 с.
2. Троицкая Л. А. Характеристика пероксидазы каллусной ткани *Rauvolfia serpentina* Benth / Л. А. Троицкая, А. Мала, В. П. Комов // Растит. ресурсы. – 2000. – № 4. – С. 105–109.
3. Aghaleh M. Effect of salinity on some physiological and biochemical parameters in explants of two cultivars of soybean (*Glycine max* L.) / M. Aghaleh, V. Niknam // J. of Phytology. – 2009. – Vol. 1. – P. 86–94.
4. Bates L. S. Rapid estimation of free proline for water stress determination / L. S. Bates, R. P. Wadern, I. D. Teare // Plant Soil. – 1973. – Vol. 39. – P. 205–207.
5. Biochemical effects of different salinities and luminance on green microalgae *Tetraselmis chuii* / F. Chezlbash, T. Farboodnia, R. Heidari, N. Agh // Res. J. of Biol. Sci. – 2008. – Vol. 2. – P. 217–221.
6. Differential expression of 10 sweet potato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi* / I. C. Jang, S. Y. Park, S. Y. Kwon et al. // Plant Physiol. Biochem. – 2004. – Vol. 42. – P. 451–455.

7. **Does proline** accumulation play an active role in stress induced growth reduction? / A. Maggio, S. Miyazaki, P. Veronise et al. // *Plant J.* – 2002. – Vol. 31. – P. 699–712.
8. **Growth**, ion content and proline accumulation in *NaCl* selected and non-selected cell lines of lucerne cultured on sodium and potassium salts / M. T. Chambary, M. J. Merret, S. J. Wamwright // *Plant Sci.* – 1997. – Vol. 127. – P. 71–79.
9. **Hamilton E. W.** Mitochondrial adaptation to *NaCl*. Complex I is protected by antioxidant and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine / E. W. Hamilton, S. A. Hec-kathorn // *Plant Physiol.* – 2001. – Vol. 126. – P. 1266–1274.
10. **Hydrogen peroxide** protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes / T. Gechev, I. Gadjiev, E. van Breusagem et al. // *Cell Mol. Life Sci.* – 2002. – Vol. 59. – P. 708–714.
11. **Iyer S.** Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice / S. Iyer, A. Caplan // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 116. – P. 203–211.
12. **Laemmli U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
13. **Light-dependent** induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis* / E. Abraham, G. Rigo, G. Szekely et al. // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 51. – P. 363–372.
14. **Lin C. C.** Cell wall peroxidase activity, hydrogen peroxide level and *NaCl* inhibited root growth of rice seedlings / C. C. Lin, C. H. Kao // *Plant and Soil.* – 2001. – Vol. 230. – P. 135–143.
15. **Mensen R.** Elicitor-induced changes of wall-bound and secreted peroxidase activities in suspension-cultured spruce (*Picea abies*) cells are attenuated by auxins / R. Mensen, A. Hager, P. Salzir // *Physiol. Plant.* – 1998. – Vol. 102. – P. 539–546.
16. **Mishra A.** Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan / A. Mishra, A. Mandoli, J. Bhavanath // *J. of Indust. Microbiol. and Biotech.* – 2008. – Vol. 35. – P. 1093–1101.
17. **Mittler R.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends Plant Sci.* – 2002. – Vol. 7. – P. 405–409.
18. **Molecular** mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants / J. Matysik, Alia B. Bhalu, P. Mohanty // *Current Science.* – 2002. – Vol. 82, N 5. – P. 525–532.
19. **Novel** light-dark change of proline levels in halophyte (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) and glycophytes (*Hordeum vulgare* L. and *Triticum aestivum* L.) leaves and roots under salt stress / Y. Sannada, H. Ueda, K. Kuribayashi et al. // *Plant Cell Physiol.* – 1995. – Vol. 36, N 6. – P. 965–969.
20. **Proline** induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreatum maritimum* L. to salt-stress / A. H. A. Khedr, M. A. Abbas, A. A. A. Wahid et al. // *J. of Exp. Botany.* – 2003. – Vol. 54, N 392. – P. 2553–2562.
21. **Protein** measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Roserbrough, A. J. Farr, R. J. Randall // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.
22. **Response** of cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersion pennelli* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system / A. Shalata, V. Mittova, M. Volokita et al. // *Physiol. Plantarum.* – 2001. – Vol. 122. – P. 487–494.
23. **Takahama U.** Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions / U. Takahama, T. Oniki // *J. Plant Res.* – 2000. – Vol. 113. – P. 301–309.
24. **Tolerance** of pea (*Pisum sativum* L.) to long term salt-stress is associated with induction of antioxidant defences / J. A. Hernandez, P. Jimenez, P. Mullineaux, F. Sevilla // *Plant, Cell and Environment.* – 2000. – Vol. 23. – P. 853–862.

Надійшла до редакції 18.07.2010