

УДК 577.158:633.11

Т.Л.Тажібаева

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
e-mail: Tamara.Tazhibayeva@kaznu.kz

Влияние низкотемпературного стресса на аминокислотный состав изопероксидаз пшеницы

Под влиянием низкотемпературного стресса наблюдались изменения аминокислотного состава A25 и A32 катодных изопероксидаз, выделенных из проростков пшеницы различной морозоустойчивости. Выявлены три группы аминокислот, содержание которых повышается, понижается и варьирует незначительно в условиях охлаждения. Установлены изменения средней гидрофобности аминокислотного состава изопероксидаз, а также содержания гистидина, лизина, аргинина, аланина, серина при действии низких температур. При корреляционном анализе, входящем в программу кластеризации, выявлены высокие коэффициенты корреляции между отдельными аминокислотами. Полученные результаты свидетельствуют в пользу модификаций активности и изоферментного состава пероксидаз, необходимых для перестройкой метаболических процессов растений в условиях температурного стресса.

Ключевые слова: аминокислотный состав, изопероксидазы, гидрофобность, кластерный анализ, низкотемпературный стресс, пшеница.

T.L. Tazhibayeva

Influence of a low-temperature stress on amino acid structure of wheat isoperoxidases

Summary. Under the influence of a low-temperature stress changes of amino acid structure of the cathode isoperoxidases A25 and A32 from seedlings of various frost resistance wheat were observed. Three groups of the amino acids are revealed, which content increases, decreases and varies slightly under the low-temperature conditions. Changes of average water repellency (hydrophobicity) of amino acid structure of isoperoxidases, also the content of histidine, lysine, arginine, alanine, serine at the low-temperature action are obtained. In the correlation analysis entering the clustering program, high coefficients of correlation between separate amino acids are established. The received results testify in favor of modifications of activity and isoenzyme structure of the peroxidases necessary for reorganization of plant metabolic processes in the temperature stress conditions.

Key words: amino acid structure, isoperoxidases, water repellency (hydrophobicity), cluster analysis, low-temperature stress, wheat.

Т.Л. Тәжібаева

Бидайдың изопероксидазды аминқышқылдық құрамына төмен температуралық күйзелістің ықпалы

Төмен температуралық күйзелістің әсерінен әртүрлі суыққа төзімді бидай сабақтарының A25 және A32 аминқышқылдық құрамының катодты изопероксидазы өзгеріске ұшырады.

Сәл суықтықтау кезінде ауысып отыратын, аминқышқылдық құрамдарының жоғары көтеріліп, төмендеуі байқалған үш топ анықталды.

Изопероксидаз аминқышқылдық құрамының орташа гидрофобтық өзгерістері мен төмен температураның әсерінен гистидин, лизин, аргинин, аланин, сериннің құрамы нақтыланды.

Кластеризациялау бағдарламасына енген корреляциялық сараптау нәтижесінде кейбір жеке аминқышқылдар арасында жоғары коэффициентті корреляция байқалды.

Алынған нәтижелер пероксидаз құрамына изоферментті модификациялық белсенділіктің қажеттілігі мен температуралық күйзеліс кезінде өсімдіктердің метаболикалық қайта құрылуына ықпал ететіндігі дәлелдеді.

Түйін сөздер: аминқышқылдық құрам, изопероксидаздар, гидрофобтылық, кластерлік сараптама, төмен температуралық күйзеліс, бидай.

Низкотемпературный стресс вызывает динамичные изменения интенсивности, направленности окислительно-восстановительного метаболизма клетки, где решающее значение имеют модификации активности, конформации

и синтеза каталитических белков – ферментов. Вопрос об энзиматических механизмах биохимической адаптации пшеницы и других сельскохозяйственных культур к действию низких положительных и отрицательных температур

нередко связывают с изменчивостью изоферментного состава пероксидазы (КФ 1.11.1.7 — H_2O_2 — оксидоредуктаза), рассматривая данный фермент как разновидность стрессовых, защитных белков клетки [1-4].

У озимой пшеницы при анализе индивидуальных изоформ выявлена тесная взаимосвязь между морозоустойчивостью и относительным содержанием двух катодных изопероксидаз листьев А25 и А32 [5]. В связи с тем, что изопероксидазы листьев проростков пшеницы контролируются короткими плечами хромосом 2В и 2D и, возможно, 2А, а эти хромосомы, в свою очередь, в значительной степени определяют морозоустойчивость пшеницы [6], можно предположить, что изопероксидаз А25 и А32 являются биохимическими маркерами морозоустойчивости. Представляет интерес определение аминокислотного состава маркерных изопероксидаз пшеницы в норме и после воздействия низкотемпературного стресса у контрастных по морозоустойчивости сортов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили листья 20-дневных проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) высокоморозостойкого сорта Альбидум 114 и слабоморозостойкого сорта Богарная 56. Низкотемпературный стресс создавали в морозильных камерах с искусственным освещением в разработанном нами режиме ступенчатого охлаждения проростков, позволяющем выявить наибольшие различия по пероксидазной активности между устойчивыми и неустойчивыми генотипами [4].

Получение ферментативных препаратов в опытах до и после охлаждения проростков и процедура электрофореза и проявления щелочных (катодных) пероксидаз описаны в работе [5].

Для определения аминокислотного состава изопероксидаз А25 и А32 участки геля с определенными изоферментами вырезали и гомогенизировали в 2-кратном объеме 0,05 М раствора Na_2HPO_4 , содержащего 0,1% ДДС-Na. После трех-четырёх часов встряхивания смесь центрифугировали при 10000 г в течение 20 минут, надосадочную жидкость сливали и опе-

рацию по извлечению белков из геля повторяли еще 3 раза. Затем супернатанты объединяли, охлаждали до 4°C и добавляли кристаллическую трихлоруксусную кислоту до 15% концентрации. После выдерживания раствора при 4°C в течение 17 часов белок осаждали центрифугированием при 54000g в течение 20 минут на центрифуге VAC-602. Осадок белка промывали два раза 15%-ным раствором ТХУ, 80%-ным ацетоном и определяли аминокислотный состав на автоанализаторе фирмы "ИКВ" (Швеция) модели 4101, снабженном автодозатором модели 4103. Аминокислотный анализ проводили по общепризнанной методике, используя натрий-цитратные буферы различных значений pH: 3,3; 4,25; 9,9. В качестве образца стандарта применяли смесь аминокислот из набора "Pears" (США). Расчет аминокислотного состава осуществляли с учетом коэффициентов коррекции для треонина, серина, валина, изолейцина, тирозина [7].

Для определения средней гидрофобности изопероксидаз использовали константы для боковых цепей аминокислотных остатков, полученные при переходе этанол-вода по С.С. Bigelow [8] и N-циклогексил-2-пирролидон-вода, согласно Е. Q. Lawson e.a. [9]. Данные по аминокислотному составу обработаны методом многомерной статистики - кластерным анализом. Все эксперименты проводили в КазНИИ земледелия и растениеводства.

Результаты и их обсуждение

Охлаждение вызывает значительные изменения аминокислотного состава изопероксидаз изучаемых сортов пшеницы. Особенно это касается содержания гистидина, лизина, аргинина, аланина, серина. В целом выявлены три группы аминокислот, содержание которых повышается, понижается и варьирует незначительно под влиянием данного стрессового фактора (таблица 1). При расчете средней гидрофобности с использованием констант для аминокислот по методу С.С. Bigelow [8] установлено, что низкотемпературный стресс способствовал уменьшению гидрофобности изофермента А25 и увеличению таковой изопероксидазы А32 независимо от сорта.

Таблица 1 - Аминокислотный состав изопероксидаз листьев проростков озимой пшеницы, моль/% (ошибка в расчетах не превышает 3-5%)

Аминокислоты	Богарная 56				Альбидум 114			
	До охлаждения (контроль)		После охлаждения		До охлаждения (контроль)		После охлаждения	
	A25	A32	A25	A32	A25	A32	A25	A32
Аспарагиновая кислота	7,6	7,3	7,4	6,1	7,1	9,4	6,8	9,1
Треонин	3,1	2,6	3,0	3,1	3,2	1,9	2,1	3,1
Серин	7,0	5,5	6,6	5,3	7,1	7,7	11,5	7,4
Глутаминовая кислота	11,5	9,0	10,4	8,8	10,3	8,4	8,9	11,0
Пролин	5,2	4,6	6,0	5,3	5,1	7,1	2,9	4,8
Глицин	20,3	21,3	19,4	19,7	11,5	24,8	28,1	22,6
Аланин	7,0	7,9	8,3	10,1	5,8	13,2	13,9	8,3
Цистин	8,6	6,6	6,0	5,7	6,4	2,6	5,5	0,9
Валин	4,2	2,6	3,0	2,6	2,6	2,3	2,3	3,6
Метионин	1,6	0,7	0,6	0,4	1,3	1,0	0,4	0,7
Изолейцин	2,6	2,2	2,4	1,8	3,9	2,6	2,1	3,3
Лейцин	5,5	4,0	5,1	4,4	6,4	3,9	4,4	6,4
Тирозин	Следы	0,9	0,9	1,8	1,9	2,6	2,3	2,6
Фенилаланин	1,6	0,9	1,5	1,8	3,9	1,3	1,1	2,1
Гистидин	6,0	14,3	10,1	14,0	16,0	5,2	2,6	5,4
Лизин	3,4	5,9	3,3	2,6	3,2	2,3	2,6	4,5
Аргинин	5,0	3,7	5,7	6,6	4,5	3,9	2,7	4,7
Средняя гидрофобность (ка/остаток)								
По Bigelow	720	637	707	680	824	713	610	764
По Lawson e. a.	487	463	504	492	566	515	406	507

Однако, применяя другие коэффициенты для аминокислот, как предлагают E.Q.Lawson e.a. [9], оказалось, что охлаждение проростков приводило к увеличению гидрофобности катодных изоформ пероксидазы слабоморозостойкого сорта Богарная 56 и снижению гидрофобности тех же изоферментов у высокоморозостойкого сорта Альбидум 114.

Обработка данных по аминокислотному составу изоферментов кластерным анализом показала близкое сходство пероксидаз A 25 и A32 Богарной 56 после охлаждения проростков. В целом обнаружено три кластера. В первый вошли все изоферменты сорта Богарная 56, как контрольные, так и выделенные из проростков, подвергавшихся ступенчатому охлаждению. Второй и третий кластеры состояли из изоферментов сорта Альбидум 114, причем в каждом из них находились изоферменты A25 и A32.

При корреляционном анализе, входящем в программу кластеризации объектов по D(1-R), выявлены высокие коэффициенты корреляции между отдельными аминокислотами. Наиболее тесная положительная корреляция обнаружена для треонина, глутаминовой кислоты и лейцина,

а также для лейцина, изолейцина и фенилаланина (рисунок 1).

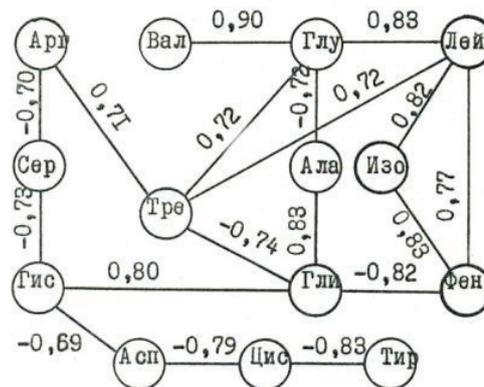


Рисунок 1 – Коэффициенты корреляции между аминокислотами катодных A25 и A32 изоферментов проростков пшеницы.

Необходимо отметить, что количественная мера сходства-различия установлена, с одной стороны, на основании неоднородности аминокислотного состава катодных A25 и A32 изоферментов, а с другой, - вследствие определенных взаимосвязей изменчивости аминокислот под влиянием низкотемпературного стресса.

Полученные данные согласуются с выводами об изменении аминокислотного состава пероксидаз проростков кукурузы под влиянием низкотемпературного стресса, в частности, содержания таких аминокислот, как изолейцин, лейцин, а также аргинин и валин [3]. Результаты по гидрофобности изопероксидаз листьев пшеницы находят подтверждение в работах [3,10]. Известно, что молекулы вновь синтезированных, стресс-поврежденных или мутантных белков имеют на поверхности гидрофобные группы аминокислот. Увеличение средней гидрофобности суммарных пероксидаз из проростков кукурузы связывают с перестройкой метаболических процессов, необходимых для нормального функционирования в условиях температурного стресса. Абиотические стрессы различной природы, такие как низкие и высокие температуры, действие солей, приводят к

обезвоживанию клетки, что влечет за собой изменения редокс-потенциала внутриклеточной среды, баланса субстратов, пула свободных аминокислот и многие другие [11,12]. Адаптивный ответ растений на такие превращения метаболизма проявляется в вариациях ферментативной активности белков, в частности пероксидазы, что приводит к изменению их аминокислотного состава и конформационных характеристик, повышению роли отдельных изоформ – маркеров устойчивости. При этом определенное значение имеет гидрофобность стрессовых белков. Существенная трансформация аминокислотного состава щелочных изопероксидаз пшеницы при низкотемпературном стрессе позволяет предположить наличие регуляторных механизмов экспрессии аллельных генов в связи с адаптацией к неблагоприятным условиям внешней среды [13].

Литература

1. Varga B., Janda T., Laszlo E., Veisz O. Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals // *Acta Physiologiae Plantarum*, 2007. - V.29.-Sup.1.-P.105-129.
2. Cansev A., Gulen H., Eris A. The activities of catalase and peroxidase in olive (*Olea europaea* L.cv.Gemlik) under low temperature stress // *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 2011.-V.52.-N2.-P.113-120.
3. Савич И.М. Изопероксидазный состав проростков кукурузы как тест на холодоустойчивость// *Сельскохозяйственная биология*. – 1987. - № 5. – С.65-69.
4. Перуанский Ю.В., Тажибаева Т.Л., Абугалиева А.И. Способ определения устойчивости генотипов пшеницы к стрессовым факторам.- Патент Республики Казахстан № 23504, 1999.
5. Тажибаева Т.Л. Рекомендации по применению нового прижизненного метода оценки морозостойкости пшеницы в селекционной практике.- Алматы: КИП МСХ, 1995. - 18 с.
6. Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений (эколого-генетические основы). – Кишинев «Штиинца», 1988.- 768с. –с.235.
7. Kohler G.O., Palter R. Studies on methods for amino acid analysis of wheat products// *Cereal Chem.* - 1967. - V.44. - N 5. - P. 512-521.
8. Bigelow C.C. The average water repellency(hydrophobicity) of proteins and the relation between it and protein structure// *J.Theoret. Biol.* - 1967. - V.16. - N 2. - P.187-211.
9. Lawson E. Q., Sadler A. J., Harmatz D., E.A. A simple experimental model for hydrophobic interactions in proteins// *J.Biol.Chem.* - 1984. - V.259. - N 5. - P.2910-2912.
10. Бергер В.Я. и Подлипаева Ю.И. Стрессорные белки и соленость внешней среды.// *Труды Зоологического института РАН*, 2013. – Прил. № . –С. 22–32.
11. Miao Y., Lv D., Wang P., Wang X.C., Chen J., Miao C., Song C.P. An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. // *Plant Cell*, 2006. – V. 18. -P. 2749–2766.
12. Haluskova L., Valentovicova K., Huttova J., Mistrik I., Tamas L. Effect of abiotic stresses on glutathione peroxidase and glutathione S-transferase activity in barley root tips // *Plant Physiology and Biochemistry*, 2009/ -V.47. –P.1069–1074.
13. Milla M.A.R., Maurer A., Huete A.R., Gustafson J.P. Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signalling pathways. // *Plant J.*, 2003 – V.36. - P. 602–615.