

УДК 582.951.4:565.854:57.017.35

Топтіков В. А., канд. біол. наук, ст. наук. сп., Дьяченко Л. Ф., канд. біол. наук, ст. наук. сп., Полодієнко О. Б., канд. біол. наук, доц., Тоцький В. М., д-р біол. наук, проф., зав. каф.

Одеський державний університет, кафедра генетики та молекулярної біології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

МНОЖИННІ МОЛЕКУЛЯРНІ ФОРМИ ПЕРОКСИДАЗИ ТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В ПРОЦЕСІ ДЕДИФЕРЕНЦІАЦІЇ КЛІТИН ЗА КАЛУСОГЕНЕЗУ У КАРТОПЛІ

Наведена динаміка спектрів множинних молекулярних форм пероксидази і супероксиддисмутази за калусоутворення у деяких сортів картоплі. З'ясовані закономірності змін електрофоретичних спектрів досліджуваних ферментів за дедиференціації клітин. Ці закономірності полягають у перебудові складу множинних молекулярних форм ферментів і зміні субстратної специфічності деяких форм пероксидази.

Ключові слова: калусоутворення, пероксидаза, супероксиддисмутаза, експресія, картопля.

Вивчення механізмів функціонування генетичного апарату клітини за процесів розвитку являє собою одну із важливих і пріоритетних проблем біологічної науки. На жаль, генетико-біохімічні процеси, які лежать в основі дедиференціювання і морфогенезу, на сьогодні досліджені недостатньо. Відомо, що основним рушієм онтогенетичних змін є диференційна активність генів [7, 8]. За літературними даними, перехід від диференційованих тканин до калусних супроводжується змінами складу білків взагалі і багатьох ферментів зокрема [2, 5]. Важливу функцію серед них виконують пероксидаза (ПО) і супероксиддисмутаза (СОД), що беруть активну участь в окислювально-відновних процесах, лігніфікації оболонок та інших реакціях у клітинах рослин [1, 9]. Сумісно з СОД і каталазою пероксидази входять до складу антиоксидантної системи, яка забезпечує захист клітин від супероксидних радикалів кисню і грає важливу роль у збереженні клітинних мембран [9, 10].

Метою даної роботи було поглиблення уявлень про роль названих ген-ензимних систем у процесах дедиференціювання клітин. Вивчали зміни спектрів множинних молекулярних форм (ММФ) ПО і СОД за процесів калусогенезу *in vitro* у рослин різних сортів картоплі.

Матеріал і методи

Використовували асептичні рослини дев'яти сортів картоплі, які вирощували *in vitro*. Частини стебел без міжвузлів нарізали довжиною 2—3 мм і розміщували на живильне середовище МС з доданням гідролізату казеїну (500 мг/л), аденін-сульфату (20 мг/л) і гормонів (І варіант: 2 мг/л 2,4-дихлорфенілоцтової кислоти і

I мг/л кінетину; II варіант: 10 мг/л 2,4-дихлорфенілоцтової кислоти і 1 мг/л кінетину). Актиноміцин Д при необхідності вносили у середовище до кінцевої концентрації 50 мг/л.

Екстракцію ферментів із тканин здійснювали буфером у співвідношенні 1:2 (тканина:буфер) такого складу: 0,05 М Трис-НСІ (рН 6,8), 0,1% дитіотреїтол, 0,1% аскорбінова кислота, 15% цукроза. Проби утримували на холоді не менше 2 годин, потім центрифугували. Надосадкова рідина містила легкорозчинні форми ферменту. Осад екстрагували двічі тим самим буфером з доданням тритону X-100 (до 1%). Такий екстракт містив мембранозв'язані форми ферменту.

Електрофорез проводили по Девісу [12] за варіантом неперервної системи у 10% поліакріламідному гелі. Після закінчення електрофорезу проводили зафарблення пероксидаз за допомогою бензидину, а також бензидину з додатковими реагентами [11]. СОД виявляли за методом [4].

Результати електрофоретичного розподілу ферментів обробляли за допомогою спеціальної комп'ютерної програми [6].

Результати дослідження та їх аналіз

Кожний із досліджуваних сортів має індивідуальний склад ізоферментів на електрофореграмах. У всіх сортів калуси починали утворюватися в кінці першого тижня культивування. Отримані калусні тканини також виявляли сортові відмінності щодо кількості, рухливості та активності ММФ ПО та СОД. Типові зміни спектрів ферментів за калусоутворення представлені на рис. 1. Форми ферментів, зміни яких достовірно співпадають з певними морфологічними особливостями (утворення калусних структур) та тривалістю культивування, наведені в таблицях 1 і 2.

Як свідчать ці дані, калусоутворення супроводжується перебудовою спектрів ПО і СОД: посиленням чи послабленням зафарблення деяких старих форм ферментів, появою нових чи зникнення окремих ММФ. В ці-

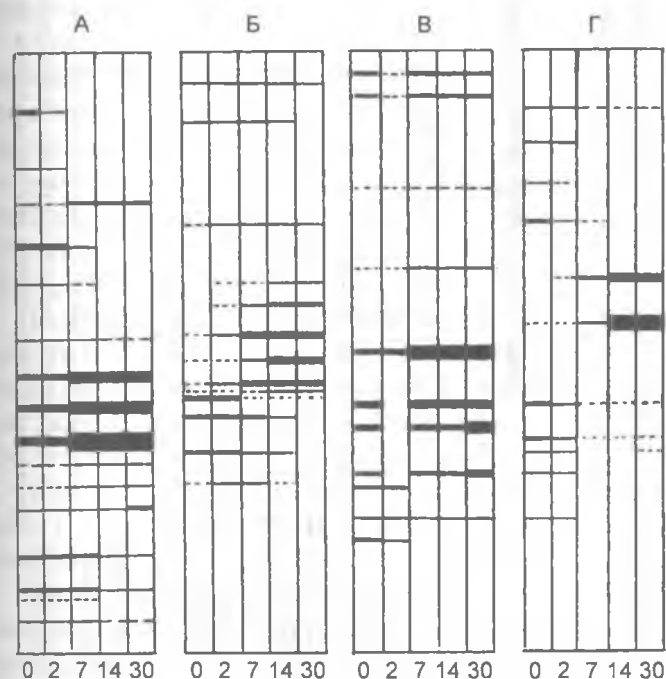


Рис. 1. Динаміка спектрів ПО і СОД за калусоутворення у деяких сортів картоплі (розчинна фракція): А, Б — сорт Світлячок; В, Г — сорт Дойна; А, В — спектр ПО; Б, Г — спектр СОД; 0 — контроль, рослина; 2, 7, 14, 30 — тривалість культивування на середовищі за калусоутворення (діб)

Таблиця 1
Зміни електрофоретичних спектрів перексида за калусоутворення у різних сортів картоплі

Сорти	Значення Rf окремих смуг (× 100)																			
	2	5	10—11	12—13	14—16	17—19	20—22	23—26	27—28	29—30	31—32	33—34	35—37	38—39	40—41	42—43	47—50			
Карла				+			+			+	+	+	3	3		3				
Кооператор	н			н	н	н		+		+	+	+	3			3				
Аквила				н			н	+		+	+		3		+	3				
Дойна	+	+		+		+			+	+	+	+	+	3		3				
Приєкульська рання			н	н		н		+		н	+	+	3	н		3				
Світлячок		3	3	+		3	3		+	+	+	+	+	+		3	3			

Примітка: н — поява нової множинної форми, з — зникнення форми ферменту, + — посилення забарвлення наявної ММФ у порівнянні з вихідним станом експланту (до калусоутворення)

Таблиця 2
Зміни електрофоретичних спектрів СОД за калусоутворення у різних сортів картоплі

Сорти	Значення Rf окремих смуг (× 100)																			
	6	7—8	9—11	12—13	14—15	16—17	18—19	20—21	22—23	24—25	26—27	28—29	30	31—32	33—36	37	38—40	41—46		
Карла							—	+	+			—	+			—				
Ягідка		—		—		+	+	+		—		—								
Кооператор									+		+				—					
Перлина	—	—	—	—	—	—			+		+	+		+	—					
Аквила		—		—				+	+	+	+				—					
Дойна		—		—				+		+						—				
Смачна												+								
Приєкульська рання					—		+		+		+				—					
Світлячок	—							+	+		+	+	—		—					

Примітка: + — посилення забарвлення або поява нової форми ферменту, — — послаблення забарвлення або зникнення форми ферменту в порівнянні з вихідним станом експланту (до калусоутворення)

лому при висаджуванні експлантів на калусоутворююче середовище кількість смуг обох ферментів зменшується. Незважаючи на сортові особливості спектрів ензимів у калусах виявляються певні закономірності, які властиві всім досліджуваним сортам. Щодо пероксидаз, то, по-перше, з'являється або значно посилюється малорухлива форма з R_f 0.12—0.13. Те ж саме можна сказати відносно декількох середньорухливих форм з R_f 0.24—0.34. По-друге, має місце ослаблення або зникнення однієї-трьох швидкорухливих смуг з R_f 0.42—0.50. Що стосується СОД, то в зоні малорухливих смуг (R_f 0.02—0.15) і в зоні швидкорухливих смуг (R_f 0.33—0.46) всі наявні форми зникають. Водночас в області середньорухливих форм з R_f 0.20—0.23 з'являються одна—дві нових смуги.

Більш детально досліджували ПО в процесі калусоутворення у сорту Світлячок. Порівняння спектрів водорозчинних форм з мембранозв'язаними формами ПО (дані не наведені) показало, що калусоутворення супроводжується перерозподілом деяких ММФ між цими фракціями. Збільшення інтенсивності забарвлення розчинних форм ПО з R_f 0.12—0.13, 0.29—0.30, 0.33—0.34 співпадає з ослабленням забарвлення мембранозв'язаних фракцій. Можна припустити, що за калусоутворення спостерігається перехід деяких ММФ ПО з мембранних структур клітин у цитозоль. Однак можливо, що цей перехід відбувається під час центрифугування. І в тому, і другому випадку можна говорити про зміни мембрано-ферментних взаємовідносин за калусогенезу. Інші ізоформи ПО (R_f 0.20—0.21 і 0.42) за калусоутворення слабо виявляються серед водорозчинних форм, зате інтенсивно забарвлюються серед мембранозв'язаних. Частина ММФ виявляє послаблене забарвлення в обох фракціях (R_f 0.17—0.18, 0.24—0.25, 0.44, 0.47, 0.50) або, навпаки, більш інтенсивне забарвлення (R_f 0.37, 0.39, 0.40), тобто ніякого перерозподілу цих форм ферменту не відбувається. Таким чином, дедиференціювання клітин супроводжується істотними змінами спектрів ММФ ПО, деякі з яких можуть слугувати маркерами названого процесу.

Ауксини грають головну роль у калусогенезі [12]. В зв'язку з цим досліджували вплив 2,4-Д на склад спектрів ММФ ПО за культивування на калусоутворюючих середовищах з різною концентрацією цього гормону. Зменшення забарвлення форм з R_f 0.17—0.18, 0.44, 0.47, 0.50, яке властиве сорту Світлячок за процесу калусоутворення, можна пояснити впливом 2,4-Д, тому що, як з'ясувалося, підвищення концентрації гормону до 10 мг/л негативно впливає на експресію смуг ПО. Перш за все підвищена кількість ауксину в середовищі зменшує забарвлення форм ПО з R_f 0.28 і 0.40 (табл. 3).

Експерименти з використанням інгібітора транскрипції актиноміцину Д показали (табл. 4), що властива калусам інтенсифікація забарвлення смуг ПО з середньою рухливістю (R_f 0.3—0.4) в умовах дії актиноміцину Д не спостерігається. Таким чином, блокування транскрипції за допомогою актиноміцину запобігає інтенсифікації вияву цих форм ферменту за калусоутворення.

Використання різних засобів зафарблення електрофореграм, коли аналізували одні і ті ж зразки, дає можливість зробити певні висновки щодо субстратної специфічності окремих ММФ ПО [11].

З'ясувалося (рис. 2), що окремі множинні форми ПО характеризуються неоднаковою спорідненістю до деяких субстратів. Так, середньо- (R_f 0.30—0.38) і швидко-рухливі (R_f 0.47—0.50) форми мають підвищену спорідненість до ауксину (ІОК).

Зміни електрофоретичних спектрів СОД за калусоутворення у різних сортів картоплі

Час культивування, дів	Концентрація 2,4-Д, мг/л	Значення Rf окремих смуг													
		0,05	0,10	0,13	0,17	0,20	0,25	0,28	0,31	0,34	0,36	0,38	0,40	0,44	0,50
0 (контроль)	0	+	+	++	++	++	++	+	+	+	+	-	+	++	+
2	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	++	+
7	2	-	-	++	+	+	++	++	++	++	++	+	+	++	+
14	2	-	-	++	-	-	+	++	++	++	++	+	+	+	+
30	2	-	-	++	-	-	+	++	++	++	++	+	++	+	++
2	10	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
7	10	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
14	10	-	+	++	-	+	+	-	++	++	++	+	-	-	-
30	10	-	+	++	-	+	+	-	++	++	++	+	-	-	-

Примітка: +, ++ — інтенсивність забарвлення наявної смуги, - — смуга не виявляється.

Вплив актиноміцину Д на спектр пероксидази за калусоутворення у сорту Світлячок
(на кінцевий термін культивування — 30 діб)

Фракція фер- менту	Концентрація ак- тиноміцину, мг/л	Значення Rf окремих смуг													
		0,03—0,05	0,10	0,13	0,17	0,20	0,25	0,28	0,30	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42	0,50
Розчинна	0	-	-	++	-	-	+	++	++	++	++	+	++	-	++
	50	-	+	+	-	-	+	+	+	+	++	+	+	-	+
Мембрано- зв'язана	0	++	++	-	+	++	-	+	-	++	++	++	++	++	-
	50	+	++	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	++	-

Примітка: +, ++ — інтенсивність забарвлення наявної смуги, - — смуга не виявляється.

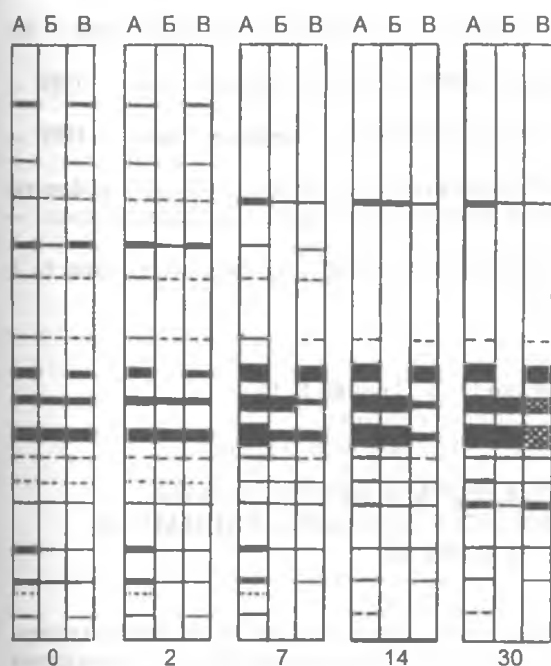


Рис. 2. Спектри ММФ пероксидази в процесі калусоутворення за різних способів зафарблення електрофореграм (сорт Світлячок, розчинна фракція): А — зафарблення бензидином, Б — зафарблення бензидином з доданням ферулової кислоти, В — зафарблення бензидином з доданням ІОК; 0 — контроль, рослина; 2, 7, 14, 30 — тривалість культивування на середовищі за калусоутворення (діб)

До того ж ці швидкі форми, як і деякі малорухливі (R_f 0.17—0.18, 0.20—0.21, 0.24—0.25) виявляють підвищену специфічність щодо ферулової кислоти.

Таким чином, незважаючи на генетичну різноманітність сортів, в процесі калусоутворення спостерігаються деякі спільні закономірності щодо перебудови складу ММФ досліджуваних ферментів. По-перше, кількість форм ПО і СОД в калусних тканинах значно зменшується. По-друге, посилюється зафарблення, як правило, середньорухливих форм ферментів і з'являється нова малорухлива форма ПО з R_f 0.12—0.13. Крім того, змінюється відношення окремих форм пероксидази до окремих субстратів. Все це забезпечують системи регуляції генетичного і епігенетичного рівней, які обумовлюють диференційну експресію генів. Окремі ізоформи ПО можуть слугувати маркерами дедиференціювання клітин картоплі.

Література

1. Андреева В. А. Фермент пероксидаза. — М.: Наука, 1988. — 127 с.
2. Благовещенский А. В. Биохимическая эволюция цветковых растений. — М.: Наука, 1966. — 327 с.
3. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М.: Наука, 1964. — 498 с.
4. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. — М.: Мир, 1982. — С. 448.
5. Забродина М. В., Сердобинский А. А., Долгих Ю. Ю., Хавкин Э. Е. Изменение спектра тканеспецифических изоферментов пероксидаз при дифференцировке и дедифференцировке клеток кукурузы // Цитология. — 1966. — Т. 38, № 2. — С. 201—207.
6. Календарь Р. Н. Компьютерные программы для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграм ДНК и белков // Материалы конференции "Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений". — К., 1994. — С. 25—26.
7. Корочкин Л. И., Седов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. — 275 с.

8. Нейфах А. А., Тимофеева М. Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. — М.: Наука, 1978. — 330 с.
9. Побережкина Н. Е., Осинская К. Л. Биологическая роль СОД // Укр. биохим. журн. — 1989. — Т. 6, № 2. — С. 14—27.
10. Савич И. М. Peroxidase — стрессовые белки растений // Усп. современ. биол. — 1989. — Т. 107, № 3. — С. 406—417.
11. Топтиков В. А., Дьяченко Л. Ф., Тоцкий В. Н. Влияние некоторых соединений на электрофоретические спектры множественных молекулярных форм пероксидазы // Укр. биохим. журн. — 1997. — Т. 69, № 1. — С. 41—49.
12. Davis B. I. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — V. 121, № 2. — P. 404—427.

Топтиков В. А., Дьяченко Л. Ф., Полодиенко О. Б., Тоцкий В. Н.

Одесский государственный университет, кафедра генетики
и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

МНОЖЕСТВЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ ПЕРОКСИДАЗЫ И СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ В ПРОЦЕССЕ ДЕДИФФЕРЕНЦИАЦИИ КЛЕТОК ПРИ КАЛЛУСОГЕНЕЗЕ У КАРТОФЕЛЯ

Резюме

Изучали динамику спектров множественных молекулярных форм пероксидазы и супероксиддисмутазы при каллусообразовании у некоторых сортов картофеля. Установлены общие закономерности изменений электрофоретических спектров изученных ферментов, выражающиеся в перестройке состава ММФ и в изменении субстратной специфичности некоторых форм пероксидазы.

Ключевые слова: каллусообразование, пероксидаза, супероксиддисмутаза, экспрессия, картофель.

Toptikov V. A., Diachenko L. F., Polodienko O. B., Totsky V. N.

Odessa State University, Department of Genetic and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

MULTIPLE MOLECULAR FORMS OF PEROXYDASE AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN POTATO CELLS DEDIFFERENTIATION DURING CALLUS FORMATION

Summary

The dynamics of multiple molecular forms of peroxidase and superoxide dismutase at callus formation in some potato varieties was studied. Some common features of electroforethic spectra of the studied enzymes have been determined. These features are expressed by reconstruction of multiple molecular form composition and changes of substrate specificity of some peroxidase forms.

Key words: callus formation, peroxidase, superoxide dismutase, expression, potato.