
CROP PRODUCTION

DOI: <https://doi.org/10.23649/jae.2022.6.26.07>

Permyakova M.D.^{1*}, Permyakov A.V.²

¹ ORCID: 0000-0002-0259-8531;

² ORCID: 0000-0003-0002-5470;

^{1,2} Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Irkutsk, Russia

* Corresponding author (marperm[at]rambler.ru)

Received: 04.10.2022; Accepted: 10.10.2022; Published: 19.10.2022

INFLUENCE OF INTROGRESSION OF *AEGILOPS TAUSCHII* IN THE WHEAT GENOME ON THE ISOENZYME COMPOSITION AND LIPOXYGENASE ACTIVITY OF SEEDLINGS

Research article

Abstract

The isoenzyme composition of lipoxygenase in the seedlings of soft wheat of the Chinese Spring variety and the synthetic hexaploid Synthetic 6x, which carries introgressions of wild grass *Aegilops tauschii* in its genome, was studied. Synthetic 6x, in comparison with Chinese Spring, had additionally two soluble and one membrane molecular enzyme forms. The activity of lipoxygenase in parents and 7 introgressive lines of Chinese Spring (Synthetic 6x) on chromosome 5D was also examined. Osmotic stress initiated an increase in the activity of the membrane form of the enzyme in the seedlings of the synthetic hexaploid. It is possible that membrane lipoxygenase with a molecular weight of 115 kDa, introduced by *Ae. tauschii*, participates in the protection of seedlings under osmotic stress. Most of the lines under stress increased the activity of both soluble and membrane-bound lipoxygenase.

Keywords: wheat, *Aegilops tauschii*, introgression, lipoxygenase, stress.

Пермякова М.Д.^{1*}, Пермяков А.В.²

¹ ORCID: 0000-0002-0259-8531;

² ORCID: 0000-0003-0002-5470;

^{1,2} Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

* Корреспондирующий автор (marperm[at]rambler.ru)

Получена: 04.10.2022; Доработана: 10.10.2022; Опубликована: 19.10.2022

ВЛИЯНИЕ ИНТРОГРЕССИИ *AEGILOPS TAUSCHII* В ГЕНОМЕ ПШЕНИЦЫ НА ИЗОФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ И АКТИВНОСТЬ ЛИПОКСИГЕНАЗЫ ПРОРОСТКОВ

Научная статья

Аннотация

Был изучен изоферментный состав липоксигеназы в проростках мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг и синтетического гексапоида Синтетик 6x, несущего в своем геноме интрогрессии дикого злака *Aegilops tauschii*. Синтетик 6x, в сравнении с Чайниз Спринг, имел дополнительно две растворимые и одну мембранную молекулярные формы фермента. Также была изучена активность липоксигеназы у родителей и 7 интрогрессивных линий Чайниз Спринг (Синтетик 6x) по хромосоме 5D. Осмотический стресс инициировал увеличение активности мембранной формы фермента у проростков синтетического гексапоида. Вероятно, мембранная липоксигеназа с молекулярной массой 115 кДа, привнесенная *Ae. tauschii*, участвует в защите проростков при осмотическом стрессе. Большинство линий в условиях стресса увеличивало активность как растворимой, так и мембраносвязанной липоксигеназы.

Ключевые слова: пшеница, *Aegilops tauschii*, интрогрессия, липоксигеназа, стресс.

1. Введение

Развитие и выживание растений в неблагоприятных условиях в большой степени зависит от мобилизации липидов и оксипириновой сигнализации. Образование оксипиринов происходит в результате самоокисления, а также с участием ферментов, среди которых основным является липоксигеназа (ЛОГ) [1]. Оксигеназные реакции превращения

полиненасыщенных жирных кислот, инициированные ЛОГ – это метаболические пути образования физиологически активных веществ, в том числе фитогормона жасмоновой кислоты и ее производных – жасмонов [2].

В процессе длительной селекции, ориентированной на высокую продуктивность и качество клейковины, произошло сильное, по сравнению с дикорастущими сородичами, обеднение генофонда культурных растений по генам, контролирующим признаки устойчивости к вредителям и возбудителям болезней и разным абиотическим факторам.

Aegilops tauschii Coss. успешно используется для усиления генетического разнообразия в хлебной пшенице [3]. Секвенирование генома *Ae. tauschii* показало в сравнении с пшеницей усиленный набор генов для адаптации к неблагоприятным факторам, включая гены белков, которые связаны с липидным метаболизмом, инициированным ЛОГ, а также с оксипириновым сигналингом. Большинство из них конститутивно экспрессировалось у *Ae. tauschii* [4].

В данной работе представлены результаты действия интрогрессии сегментов генома *Ae. tauschii* в геноме пшеницы на изоферментный состав и уровень активности двух форм ЛОГ проростков при нормальных условиях и под влиянием осмотического стресса.

2. Объекты и методы исследования

Объектом исследования были сорт мягкой пшеницы Чайниз Спринг; синтетический гексапоид Синтетик 6х, несущий в своем геноме интрогрессии *Aegilops tauschii* и используемый как «мост» для передачи чужеродного генетического материала в геном мягкой пшеницы; 7 интрогрессивных линий (ИЛ) Чайниз Спринг (Синтетик 6х) (ЧС/Син6х), каждая из которых несет участок интрогрессии *Ae. tauschii* в хромосоме 5D [5].

Проростки пшеницы были получены проращиванием семян в течение трех суток на воде (контрольный вариант) и в условиях осмотического стресса на 12% растворе полиэтиленгликоля 6000 (ПЭГ6000), имитирующем водный дефицит.

Ферментные экстракты ЛОГ получали растиранием в ступке в течение 25 мин замороженного в жидком азоте растительного материала с тройным количеством 0,1 М трис-НСI буферного раствора, содержащего 1 мМ ЭДТА (рН 7,5). Были исследованы две белковые фракции: растворимая фракция, обогащенная цитозольными ЛОГ (супернатант после центрифугирования при 105000 g) и микросомальная фракция, обогащенная мембраносвязанными формами ЛОГ (ресуспандированный в том же буферном растворе осадок после центрифугирования при 105000 g).

Активность ЛОГ определяли на микропланшетном ридере Infinite M200 PRO (Tecan Group Ltd, Маннедорф, Швейцария) по методике Зиммерман и Вик [6] с модификациями, измеряя скорость образования пероксидов жирных кислот при 234 нм. Субстратом служила эмульсия линолевой кислоты в этаноле (1:1), растворенная в 0,1 М трис-НСI буферном растворе, рН 7,5. Удельную активность выражали в единицах активности (Е) на мг белка. Содержание белка определяли по Брэдфорд [7].

Восстановленные белки ферментных экстрактов анализировали в щелочной буферной системе по Лэммли [8]. При Вестерн-блоттинге [9] перенос белков из полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану проводили в камере для блоттинга Criterion Blotter (BioRad) в охлажденном буфере для переноса при рН = 9,2 (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 10% метанола) при напряжении 150 V в течение 5 часов.

3. Результаты и обсуждение

Изоферментный состав ЛОГ проростков различался у родителей ИЛ. Во фракции растворимых белков (рис. 1а) у сорта ЧС была обнаружена одна молекулярная форма ЛОГ с молекулярной массой 104 кДа, как в контроле, так и в условиях стресса. У Син6х обнаружили три молекулярные формы 90, 104 и 115 кДа, однако в условиях стресса молекулярная форма 115 кДа не выявилась. В условиях стресса у обоих родителей отмечалось уменьшение содержания ЛОГ- белка (снижение интенсивности окраски полос).

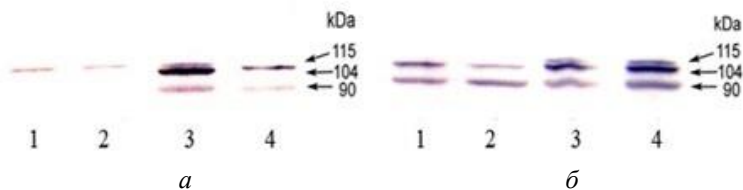


Рис. 1 – Молекулярные формы липоксигеназы проростков пшеницы:

а – фракция растворимых белков; б – микросомальная фракция;

1 – Чайниз Спринг, контроль; 2 – Чайниз Спринг, ПЭГ6000; 3 – Синтетик 6х, контроль; 4 – Синтетик 6х, ПЭГ6000

В микросомальной фракции (рис. 1,б) у ЧС выявилось две изоформы ЛОГ с молекулярным весом 104 и 90 кДа. Интенсивность окраски изофермента 104 кДа была меньше при осмотическом стрессе. Те же молекулярные формы ЛОГ были обнаружены у Син6х, но в отличие от ЧС, у Син6х содержание изофермента 104 кДа было выше в контрольных условиях и увеличивалось в условиях стресса. Кроме того, у Син6х была обнаружена дополнительная изоформа 115 кДа.

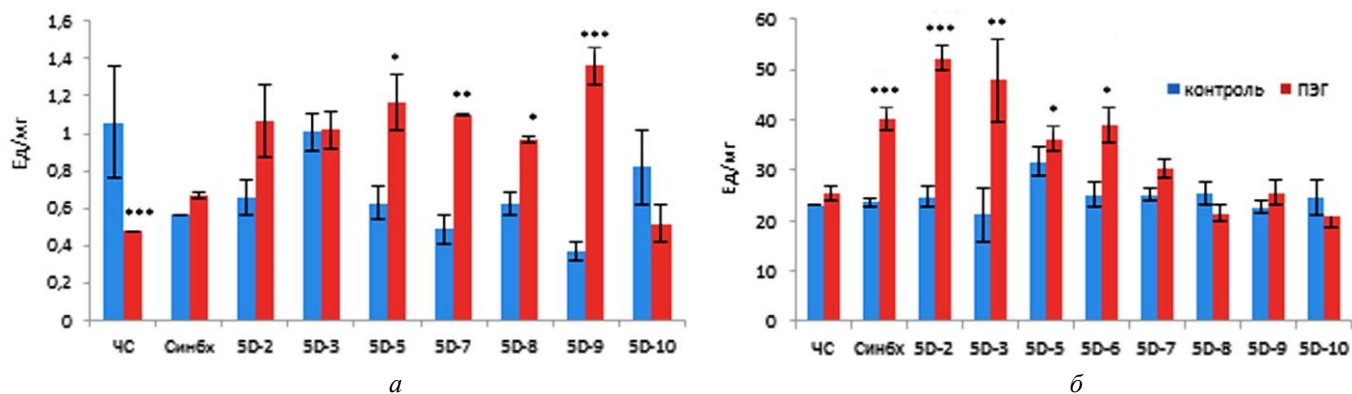


Рис. 2 – Активность липоксигеназы в проростках пшеницы интрогрессивных линий Чайниз Спринг/Синтетикбх по хромосоме 5D и их родителей:

a – фракция растворимых белков, *б* – микросомальная фракция;

*, **, *** – значимость различий уровня значений активности ЛОГ при проращивании на р-ре ПЭГ6000 относительно контроля по t-критерию Стьюдента, $P \leq 0.05$; 0.01, 0.001

Активность растворимой формы ЛОГ проростков в контрольных условиях проращивания на воде у ЧС была немного выше, чем у Синбх, но снижалась более чем в 2 раза при проращивании на ПЭГ6000 (рис. 2а). У Синбх активность ЛОГ в стрессовых условиях значимо не изменялась. Уровни значений активности у ИЛ варьировали, однако все линии, за исключением 5D-10, независимо от условий проращивания показали тенденции Синбх.

В микросомальной белковой фракции уровень активности ЛОГ в контрольных условиях проращивания на воде у родителей статистически значимо не отличался. В условиях осмотического стресса уровень активности ЛОГ у ЧС не изменялся, а у Синбх увеличивался почти в 2 раза (рис. 2б). В контроле по уровню ферментативной активности линии 5D-3 и 5D-5 отличались от сорта-реципиента ЧС, но только одна линия 5D-5 была выше ЧС. В условиях стресса линии 5D-2, 5D-3, 5D-5, 5D-6 показали такой же характер изменения уровня активности ЛОГ под воздействием стресса, как Синбх.

У проростков пшеницы активность мембранной формы фермента была значительно выше, чем растворимой. По сравнению с ЧС, Синбх имел две дополнительные изоформы во фракции растворимых белков и одну микросомальную изоформу 115кДа. У проростков синтетической пшеницы осмотический стресс не вызывал значимого изменения активности растворимой ЛОГ, но инициировал увеличение уровня активности мембранной ЛОГ. Вероятно, мембранная ЛОГ, в том числе молекулярная форма 115кДа, привнесенная *Ae. tauschii*, участвует в защите проростков при осмотическом стрессе. В отличие от сорта ЧС у проростков нескольких линий осмотический стресс инициировал увеличение уровня активности как растворимой, так и мембраносвязанной ЛОГ.

Окисление запасных липидов резко возрастает в течение прорастания семян растений, а продукты ЛОГ были обнаружены в запасных триацилглицеридах и, в большей степени, в фосфолипидах, окружающих липидные тела как монослой [10]. Известно, что жасмонаты, наряду с другими фитогормонами, контролируют прорастание семян растений и их защиту от патогенов и абиотических неблагоприятных факторов посредством гормонального сигналинга, сконцентрированного в алейроновом слое [11]. Вероятно, обе обнаруженные нами формы ЛОГ связаны с катаболизмом липидов эндосперма и вовлечены в гормональный сигналинг.

Acknowledgement

We thank Pshenichnikova T.A. (Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia) for providing seeds.

Благодарность

Благодарим Пшеничников Т.А. (Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия) за предоставленные семена.

Conflict of Interest

None declared.

Конфликт интересов

Не указан.

References

- Mosblech A. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation / A. Mosblech, I. Feussner, I. Heilmann // *Plant Physiol Biochem.* – 2009. – V. 47. – pp. 511–517. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.12.011
- Larrieu A. Q&A: How does jasmonate signaling enable plants to adapt and survive? / A. Larrieu, T. Vernoux // *BMC Biology.* – 2016. – V. 14 (1). – Article 79. DOI: 10.1186/s12915-016-0308-8
- Mujeeb-Kazi A. Wheat improvement facilitated by novel genetic diversity and in vitro technology / A. Mujeeb-Kazi // *Plant Tissue Cult.* – 2003. – V. 13 (2). – pp. 179–210.
- Jia J. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation / J. Jia, S. Zhao, J. Wang // *Nature.* – 2013. – V. 496. – Article 91. DOI: 10.1038/nature12028
- Pestsova E.G. Development and QTL assessment of *Triticum aestivum*–*Aegilops tauschii* introgression lines / E.G. Pestsova, A. Borner, M.S. Roder // *Theor Appl Gen.* – 2006. – V. 112. – pp. 634–647. DOI: 10.1007/s00122-005-0166-1

6. Zimmerman D.C. Hydroperoxide isomerase. A new enzyme of lipid metabolism / D.C. Zimmerman, B.A. Vick // *Plant Physiol.* – 1970. – V. 3. – pp. 445–453. DOI: 10.1104/pp.46.3.445
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding / M.M. Bradford // *Analyt. Biochem.* – 1976. – V. 72. – pp. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227. – pp. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0
9. Timmons T.M. Protein blotting and immunodetection / T.M. Timmons, B.S. Dunbar // *Methods Enzymol.* – 1990. – V. 182. – pp. 679–701. DOI: 10.1016/0076-6879(90)82053-5
10. Leonova S. Mobilization of lipid reserves during germination of oat (*Avena sativa* L.), a cereal rich in endosperm oil / S. Leonova, A .Grimberg, S. Marttila et al. // *J Exp Bot.* – 2010. – V. 61 (11). – pp. 3089–3099. DOI: 10.1093/jxb/erq141
11. Wang Y.H. Developing a model of plant hormone interactions / Y.H. Wang, H.R. Irving // *Plant Signal Behav.* – 2011. – V. 6 (4). – pp. 494–500. DOI: 10.4161/psb.6.4.14558