

УДК 631.811.98

**СУБСТРАТНОЕ СТИМУЛИРОВАНИЕ PAL, КАК ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ
ВЫСОКОЛИГНИФИЦИРОВАННОГО СЫРЬЯ ИЗ РАСТЕНИЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM
AESTIVUM* L.)****П.В. Федураев, А.В. Рябова, А.В. Пунгин, Э.В. Токупова, Л.Н. Скрыпник***Балтийский федеральный университет им. И. Кантар, Калининград, Россия*

Введение. Одной из принципиальных сельскохозяйственных культур, как в нашей стране, так и во всем мире, является пшеница (*Triticum aestivum* L.). Данное растение характеризуется наличием прямостоячих полых стеблей, механическая поддержка которых обеспечивается, в том числе, фенольным полимером, лигнином.

Наряду с возможностью обеспечения механической поддержки осевых структур растения, лигнин, совместно с другими элементами клеточной стенки, выступает в качестве неспецифического фактора иммунитета. Таким образом, лигнин способен определять устойчивость растений не только со стороны инвазивных биотических факторов, но и со стороны меняющихся факторов среды. Было показано, что лигнин или лигнин-подобные фенольные полимеры откладываются в ответ на биотические и абиотические стрессы [1].

В дополнении к физиологическим функциям лигнина необходимо отметить, что лигнин также является ключевым ингредиентом сырья и биомассы растений. Лигнин обеспечивает биомассу с высокой плотностью энергии для пиролиза и прямого сжигания, а также является основным источником возобновляемых ароматических прекурсоров для химической промышленности. Лигнин может стать отличным альтернативным источником ароматических соединений и их производных.

Каноническим путем образования лигнина, является фенилаланин опосредованный метаболический путь. Лигнин синтезируется из ароматической аминокислоты l-фенилаланина (Phe), которая превращается, под действием фенилаланин-аммиак-лиазы (PAL), в циннамат. PAL является первым и ключевым регуляторным ферментом метаболизма фенилпропаноидов [2]. Однако, на сегодняшний день, показан дополнительный альтернативный путь синтеза лигнина через тирзин-аммиаклиазный путь, который является более энергетически эффективным. Вовлечение l-тирозина (Tyr) в лигнин-опосредованный метаболический путь, также осуществляется за счет PAL [3]. При этом стоит отметить, что такая активность показана только для злаковых растений [4,5].

Таким образом, перспективным способом увеличения уровня лигнина у злаковых растений является субстратное стимулирование ключевых ферментов синтеза данного фенольного полимера. Учитывая вышесказанное, целью данного исследования является оценка роли ароматических аминокислот фенилаланина и тирозина в накоплении лигнина у растений пшеницы (*Triticum aestivum* L.).

Материалы и методы. *Выращивание Triticum aestivum L. и дизайн эксперимента.* Пшеница (*Triticum aestivum* L.) сорта «Ванек» получена с семенной станции Министерства сельского хозяйства Калининградской области. Семена стерилизовали инкубацией в течение 2 ч в 10 % NaClO, затем не менее 10 раз промывали дистиллированной водой.

С целью исследования отдельного влияния тирозина и фенилаланина на метаболические процессы, растений *Triticum aestivum* на протяжении всего эксперимента выращивались на питательных средах, содержащих 500 мМ соответствующей аминокислоты. Проростки в возрасте 3–4 дней пересаживали на жидкую, интенсивно аэрируемую питательную среду: 50 % раствор Хогланда. Контролем служили образцы, выращиваемые исключительно на питательной среде, без добавления ароматических аминокислот. Растения выращивали под люминесцентными лампами при плотности потоков квантов ФАР 200 мкмоль/ (м² с), 16-часовом фотопериоде и температуре +25 °С.

Пул анализов проводился по достижению растений возраста 30 дней (что соответствует 4, 5 стадии по шкале Фики). Для экспериментов использовались вегетативные фотосинтезирующие части растения, стебель и листья.

Анализ активность PAL и TAL. Экстракцию белков и кинетические анализы проводили аналогично тому, как описано Cheng и Breen [6]. Растительную ткань весом 0,2 г, быстро замораживали в жидком азоте. Далее пробу измельчали и промывали 1 мл ледяного ацетона, инкубировали полученную смесь при –20° С в течение 15 минут и центрифугировали при 16 000 g в течение 15 минут при 4 °С. Осадок экстрагировали осторожным вращением при 4 °С в присутствии 100 мМ боратного буфера. Через 1 час образцы центрифугировали, супернатант использовали в качестве экстракта растений в кинетических анализах.

Активность PAL количественно оценивали по продукции транс-коричной кислоты (ТСА), снимая спектры поглощения при 290 нм каждую минуту в течение 20 минут при 37° С, используя UV-3600, Shimadzu, Japan. Смесь для анализа содержала 61 мМ l-фенилаланин, 30 мМ натрий-боратный буфер (рН 8,8) и 75 мкл растительного экстракта в реакционном объеме 1 мл. Субстрат добавляли после 10-минутного периода предварительной инкубации при 37° С. Экстракт растений, предварительно инкубированный в буфере без субстрата, использовали в качестве холостого опыта перед каждым анализом [7].

Активность TAL определяли аналогичным образом, путем оценки продукции p-кумаровой кислоты (РСА) при длине волны 310 нм. 1 мл смеси для анализа содержал 1,9 мМ l-тирозина, 30 мМ натрий-боратного буфер (рН 8,8) и 75 мкл растительного экстракта. Температура и подготовка холостой пробы были идентичны анализу PAL [7].

Активность фермента выражали в единицах на мг белка. Одну единицу активности PAL определяли, как количество фермента, которое продуцировало 1 мкг коричной кислоты в час. Одну единицу активности TAL определяли, как количество фермента, которое продуцировало 1 мкг кумаровой кислоты в час.

Субстраты l-фенилаланин и l-тирозин, а также продукты их ферментативного превращения транс-коричной кислоты и p-кумаровой кислоты соответственно, использовались в качестве стандартов. Общее содержание белка оценивали методом Брэдфорда [8].

Анализ содержания лигнина. Определение содержания лигнина выполняли после соответствующей подготовки тканей растительных образцов. Необходимо удалить все УФ-поглощающие соединения (в первую очередь белки), чтобы избежать интерференции с максимумом поглощения для лигнина при 280 нм. Сухие образцы (0,3 г) гомогенизировали в присутствии 50 мМ калий-фосфатного буфера, после чего центрифугировали. Затем осадок несколько раз промывали и последовательно центрифугировали после каждой процедуры промывки: два раза в присутствии фосфатного буфера (рН 7,0), три раза в присутствии 1 % детергента Triton X-100, два раза с 1 М NaCl буфером с рН 7,0, два раза с дистиллированной водой и два раза с ацетоном. Осадок высушивали в сушильном шкафу (60 °С, 24 ч) и охлаждали в вакуумном эксикаторе. Полученное сухое вещество определяли, как фракцию клеточной стенки, не содержащую белков [9].

Образец клеточной стенки (20 мг) помещали в центрифужную пробирку и добавляли 0,5 мл 25 % ацетилбромид (об. / об. В ледяной уксусной кислоте), и инкубировали при 70° С в течение 30 мин. После полного разложения образец быстро охлаждали на ледяной бане, а затем смешивали с 0,9 мл 2 М NaOH, 0,1 мл 5 М гидроксилламин-HCl и ледяной уксусной кислоты, достаточным для полной солюбилизации экстракта лигнина. После центрифугирования (1400 × g, 5 мин) оптическую плотность супернатанта измеряли при 280 нм [10]. Результаты выражали в мг лигнина на г⁻¹ клеточной стенки.

Статистика. Все представленные значения являются средними по крайней мере для трех повторений. Уровень значимости был установлен равным $p \leq 0,05$. Статистический анализ данных проводили с использованием SigmaPlot 12.3 (Systat Software GmbH, Эркрат, Германия). Для проверки нормальности использовался тест Шапиро-Уилкса; Дополнительно экспериментальные данные проверялись на однородность дисперсии.

Все химические вещества, использованные в экспериментах, были аналитической чистоты, полученные из коммерческих источников. На протяжении всего эксперимента использовали дистиллированную воду. Рабочие стандартные растворы готовили (питательную среду, в частности) путем разбавления стоковых растворов.

Результаты. Наблюдалось достоверное ($p \leq 0.05$) увеличение активности PAL и TAL по сравнению с контролем, но только при нормировании результатов на соответствующие продукты ферментативного превращения (PAL на ТСА и TAL на РСА). Экспериментальные растения пшеницы сорта «Vanek» перенесенные на питательную среду, содержащую 500 мкМ фенилаланина и тирозина, и экспонированные в таких условиях в течении всего периода роста показали достоверно более чем двукратное увеличение активности PAL и TAL. Скорость вовлечения в метаболизм тирозина через тирозин-аммиаклазную активность PAL была несколько ниже (0,64 мкг РСА мг белка⁻¹ час⁻¹ у растений, экспонированных на тирозине, по сравнению с контрольными растения: 0,26 мкг РСА мг белка⁻¹ час⁻¹) чем скорость вовлечения в метаболизм фенилаланина посредством PAL (0,36 мкг ТСА мг белка⁻¹ час⁻¹ у растений, экспонированных на фенилаланине, по сравнению с контрольными растения: 0,33 мкг ТСА мг белка⁻¹ час⁻¹).

Выбранные методы позволили определить активность PAL/TAL. Выращивание растений в условиях постоянного экспонирования на средах, обогащенных ароматическими протеиногенными аминокислотами, приводило к достоверному ($p \leq 0.05$) повышению активности данных аммиаклиазных ферментов (рис 1).

Существует два основных этапа получения лигнина: биосинтез монолигнола, который запускается PAL, и полимеризация монолигнола посредством свободнорадикального сочетания (coupling), который обслуживается редоксактивными ферментами, и, в частности, POD [16].

Повышение активности ключевых ферментов: отвечающего за синтез лигниновых структур (PAL), приводило к достоверному увеличению уровня лигнина в клеточных стенках экспериментальных растений (рис. 2).

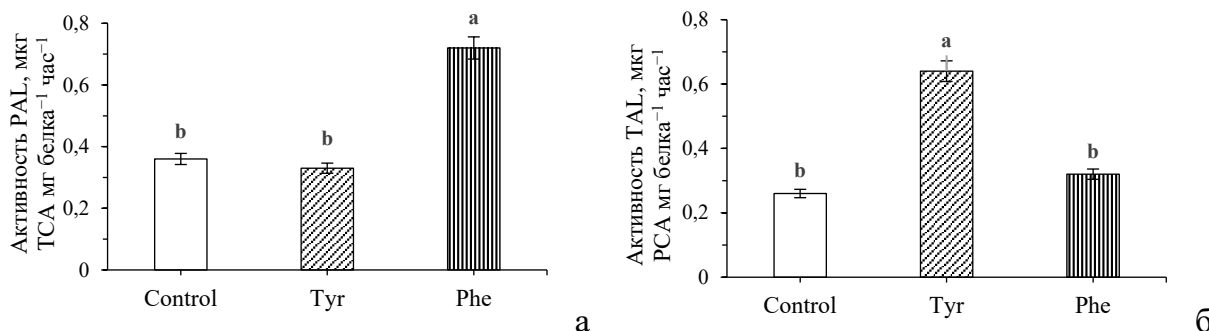


Рисунок 1. Активность PAL(a) и TAL(б) в образцах пшеницы, инкубированных на питательной среде с добавлением 500 мкМ фенилаланина и тирозина, соответственно. Столбцы, отмеченные разными буквами, показывают значительные различия при ($p \leq 0,05$) в соответствии с тестом Тьюки.

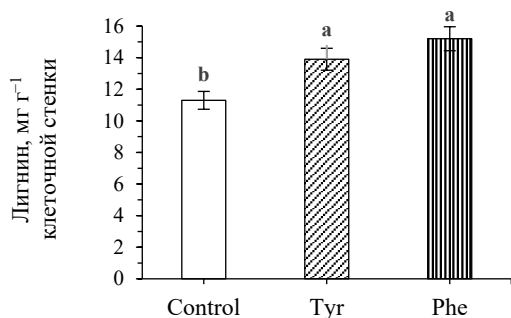


Рисунок 2. Содержание лигнина в образцах пшеницы, инкубированных на питательной среде с добавлением 500 мкМ фенилаланина и тирозина, соответственно. Столбцы, отмеченные разными буквами, показывают достоверные различия при ($p \leq 0,05$) в соответствии с тестом Тьюки.

Экспериментальные группы растений, экспонированные на питательных средах с добавлением аминокислот, эффикторов по отношению к PAL, демонстрируют достоверно ($p \leq 0,05$) более эффективное накопление лигнина на данной стадии онтогенеза (в среднем на 20 % по сравнению с контролем). Стоит отметить, что 4–5 фаза развития растений по шкале Фики характеризуется активной закладкой вторичной клеточной стенки (определяемой наличием лигнина в своей структуре) и интенсифицирование данного процесса может стать отличным заделом для успешного развития растения на более поздних стадиях.

Дискуссия. Лигниновые структуры являются продуктом фенилпропаноидного пути, и интенсификация данного метаболического пути через PAL может дополнительно приводить к биосинтезу целого ряда фенольных соединений. Эта

группа физиологически активных соединений может быть задействована, как в защите растений, так и в обеспечении адекватного редокс-баланса растительной клетки. К таким соединениям относятся: фитоалексины, стильбены, кумарины и флавоноиды [11, 12].

Поиск путей интенсификации процесса лигнификации у злаковых растений остается весьма актуальным запросом со стороны наукоемкого сельского хозяйства и биотехнологии. С одной стороны, лигнификацию стоит рассматривать, как механизм повышения устойчивости злаковых культур, которые, чаще всего, выращивают как монокультуры, а с другой стороны, как источник перспективного сырья для химической промышленности.

Заключение. В данном исследовании было проанализировано влияние ароматических протеиногенных аминокислот (фенилаланина и тирозина) на уровень лигнина клеточной стенки растений *Triticum aestivum* L. При этом наблюдалось достоверное ($p \leq 0.05$) увеличение активности ферментов PAL, TAL и POD в образцах пшеницы, экспонированных на фенилаланин- и тирозин-обогащенных средах. Показано 20 % увеличение уровня лигнина у экспериментальных растений по сравнению с контролем.

Литература

1. Sattler S., Funnell-Harris D. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? //Frontiers in Plant Science. – 2013. – Vol. 4. – P. 70.
2. Kong J.Q. Phenylalanine ammonia-lyase, a key component used for phenylpropanoids production by metabolic engineering //RSC advances. – 2015. – Vol. 5. – №. 77. – P. 62587–62603.
3. Feduraev P. Skrypnik L., Riabova A., Pungin A., Tokupova E., Maslennikov P., Chupakhina G. Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways //Plants. – 2020. – Vol. 9. – №. 4. – P. 476.
4. Maeda H.A. Lignin biosynthesis: Tyrosine shortcut in grasses //Nature plants. – 2016. – Vol. 2. – №. 6. – P. 1–2.
5. Barros J., Serrani-Yarce J.C., Chen F., Baxter D., Venables B.J., Dixon R.A. Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis //Nature Plants. – 2016. – Vol. 2. – №. 6. – P. 1–9.
6. Cheng G.W., Breen P.J. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit //Journal of the American Society for Horticultural Science. – 1991. – Vol. 116. – №. 5. – P. 865–869.
7. Rosler J., Krekel F., Amrhein N., Schmid, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity //Plant physiology. – 1997. – Vol. 113. – №. 1. – P. 175–179.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding //Analytical biochemistry. – 1976. – Vol. 72. – №. 1–2. – P. 248–254.
9. Moreira-Vilar F.C., Siqueira-Soares R.D.C., Finger-Teixeira A., Oliveira D.M.D., Ferro A.P., da Rocha, G.J., Ferrarese-Filho O. The acetyl bromide method is faster, simpler and presents best recovery of lignin in different herbaceous tissues than Klason and thioglycolic acid methods //PloS one. – 2014. – Vol. 9. – №. 10.
10. Barnes W.J., Anderson C.T. Acetyl bromide soluble lignin (ABSL) assay for total lignin quantification from plant biomass //Bio Protoc. – 2017. – Vol. 7. – №. 2149.
11. Lozovaya V.V., Lygin A.V., Zernova O.V., Ulanov A.V., Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Modification of phenolic metabolism in soybean hairy roots through down regulation of chalcone synthase or isoflavone synthase //Planta. – 2007. – T. 225. – №. 3. – C. 665–679.
12. Fraser C.M., Chapple C. The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis //The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists. – 2011. – Vol. 9.