ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВ НА ИЗОФОРМЫ ПЕРОКСИДАЗ ТОМАТОВ

INFLUENCE OF STRESS ON TOMATO PEROXIDASE ISOFORMS

Анжела РУДАКОВА[1], ORCID: 0000-0001-9638-2151
Сергей РУДАКОВ[1], ORCID: 0000-0003-2591-6114
Александр ДОРИФ[1], ORCID: 0000-0003-4269-4066
Лилиана МЭРЫЙ[2], ORCID:0000-0003-3702-3583
Лариса АНДРОНИК[2], ORCID: 0000-0002-2761-9917
[1] Молдавский Государственный Университет, г. Кишинэу, Р. Молдова
[2] Институт генетики, физиологии и защиты растений МолдГУ

CZU: 635.64:632.38

e-mail: rud-as@mail.ru
e-mail: lilimaryi@gmail.com

Native electrophoresis was used to study changes in the composition and relative content of peroxidase isoforms in the leaves of 4 tomato varieties under the influence of water and thermal stresses in the offspring of plants infected with viral agents (tobacco mosaic virus, TMV and tomato aspermia virus, VAT). Under the stress conditions no additional zones of peroxidase isoforms were detected in the electrophoretic spectra. However, changes in the intensity of certain peroxidase zones were noted. Tomato genotypes Jacota and S. pimpinellifolium demonstrated the most significant increase in peroxidase activity, which was reflected in an increase of the intensity of isoforms zones with average molecular weight under conditions of temperature and water stress. In the progeny of tomato plants infected with TMV and BAT, the aftereffect of the viral infection was accompanied by an increase in peroxidase activity of isoform zones with average molecular weight in susceptible varieties (Jacota, Mary Gratefully), whereas in the progeny of infected tomato variety Rufina, which carries resistance genes to TMV, and in the wild variety S. pimpinellifolium, zones with low molecular weight are increased.

Keywords: *isoforms, peroxidase, tomatoes, polymorfism, stress*

ВВЕДЕНИЕ

Пероксидаза (1.11.1.7) – это фермент, способный выполнять многообразные функции в живых организмах [1]. Этот фермент участвует в защите растений от окислительного стресса [2], контролирует рост растений, их дифференциацию и развитие [3].

Увеличение общей пероксидазной активности часто обнаруживается в ходе инфицирования высших растений патогенами [4, 5] с наибольшим увеличением, связанным с ответом хозяина, классифицируемым как устойчивость. Такое возрастание активности, как оказалось, связано с активностью только определенных

изоферментов, что отражает интенсивность окрашивания отдельных зон в полиакриламидном геле [5]. Предполагают, что пероксидазные изоформы, чья активность увеличивается в ходе инфицирования, ингибируют рост патогенов, возможно, через участие в биосинтезе фенольных соединений [6] или напрямую через реакции, связанные с неорганическими ионами [7]. Поскольку субстратами пероксидазы могут служить фитогормоны, фермент может регулировать состав физиологически активных веществ в тканях растения [1, 8].

Цель данного исследования состояла в оценке защитных реакций различных сортов томатов, подвергнутых воздействию биотических и абиотических факторов, по анализу изменений в электрофоретических спектрах изоформ пероксидаз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оценку реакций на термический и водный стрессы, у потомков растений инфицированных вирусными агентами - ВТМ, вирус табачной мозаики, и ВАТ, вирус аспермии томатов - проводили на 4 генотипах томатов - Jacota, Mary Gratefully, Rufina и *Solanum pimpinellifolium*. В качестве контроля использовали растения томатов, полученные из семян здоровых растений, а для опытных образцов исследовали первое потомство растений, полученное от вирус-инфицированных ВАТ и ВТМ родителей. Опыты проводили в контролируемых лабораторных условиях. Оптимальный режим температуры состставлял 27/21^{0}С день/ ночь. Термический стрес моделировали в климатической камере (42/25^{0}С день/ ночь, влажность воздуха 65-70%), при оптимальным водном режиме. Растения подвергались водному стрессу путем ограничения полива, 3 цикла увядание - восстановление тургора, при оптимальной температуре.

Выделение растворимых пероксидаз. Навески тканей листьев растирали в фарфоровых ступках при 4^{0}С в присутствие кварцевого песка. В качестве буфера для экстракции использовали 0,1 М Tris-HCI, pH 7,5 в присутствие 10% глицерина. Полученный гомогенат центрифугировали в эппендорфах в течение 15 минут, при 10000 об/мин, сливали надосадочную жидкость и замораживали при -20^{0}С.

Нативный электрофорез. При помощи электрофоретической камеры Mini-PROTEAN Tetra Cell (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, USA) осуществляли нативный электрофорез в полиакриламидном геле по стандартному методу Дэвиса [8] при 4°С. В качестве разделяющего геля применяли 5% гель, концентрация разделяющего геля составила 7.5 % полиакриламида.

Для выявления ферментативной активности в полиакриламидном геле использовали бензидиновый реактив при pH 7,0. Перед окрашиванием геля компоненты бензидинового реактива смешивали с 0.5 % раствором перекиси водорода в соотношении 1:1. После проявления окрашенных зон пероксидазных изоферментов избыток красителя сливали и отмывали гель 7% уксусной кислотой [9].

Электрофореграммы сканировали на сканере Epson Expression 10000XL (“GE Healthcare”, USA). Количественную оценку каждого трека проводили при помощи программы Phoretix 1D Advansed (“TotalLab, Ltd.”, Great Britain).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении электрофоретических спектров пероксидазных ферментов в исследуемых генотипах томатов было обнаружено 6 изоферментов с молекулярными массами: зона №1- 92 кДа, зона №2- 65,6 кД, зона № 3 - 42,0 кДа, зона №4 - 38,0, зона №5 - 32,8 кДа, и зона №6 - 27.8 кДа (Рис.1, 2). По данным денситометрии отсканированных зимограмм были построены диаграммы интенсивностей отдельных изоформ пероксидазных ферментов при оптимальных условиях и в условиях температурного и водного стрессов в образцах, полученных от здоровых (контроль) и вирус-инфицированых растений (ВТМ и ВАТ) и (Рис. 1, 2). Значения изменений интенсивностей каждой зоны, в %, рассчитывались по отношению к контролю - значениям интенсивностей соответствующих зон при оптимальных условиях в здоровых растениях.

В генотипе Jacota при оптимальных условиях в вариантах ВТМ и ВАТ существенно возрастает интенсивность зоны №2 (+164%) (Рис. 1). Повышение температуры до 42^{o} С приводит к резкому возрастанию интенсивностей зоны №2 (+176%) и зоны №3 (+158%).

В этих температурных условиях дополнительное воздействие как ВТМ, так и ВАТ приводит к значительному повышению активности зоны №3, на 184% и на 189% соответственно. В условиях водного стресса значительно растет активность зоны № 2 (+236%) и незначительно зоны №3 (+23%), а в потомстве ВТМ растений зона №2 возрастает на 225%, а зона №3 - на 93%. Влияние ВАТ приводит к повышению активности зоны №2 (+162%) и зоны №3 (+25%).

При оптимальных условиях влияние вирусов ВТМ и ВАТ в сорте Mary Gratefully проявляется в незначительном возрастании интенсивности зоны №2 - на 11% и 17%, соответственно. Температурный стресс сильнее всего сказывается на активности зоны № 3 (+59%). В этих условиях ВТМ дает прирост зоны № 3 на 102%, а ВАТ на 160%. В условиях водного стресса возрастает интенсивность зоны № 2 (+69%). В потомстве растений инфицированных ВТМ, возрастает интенсивность обеих зон № 2 (+22%) и № 3 (+24%), при этом влияние вируса ВАТ отражается повышением только активности зоны № 3 (+22%).

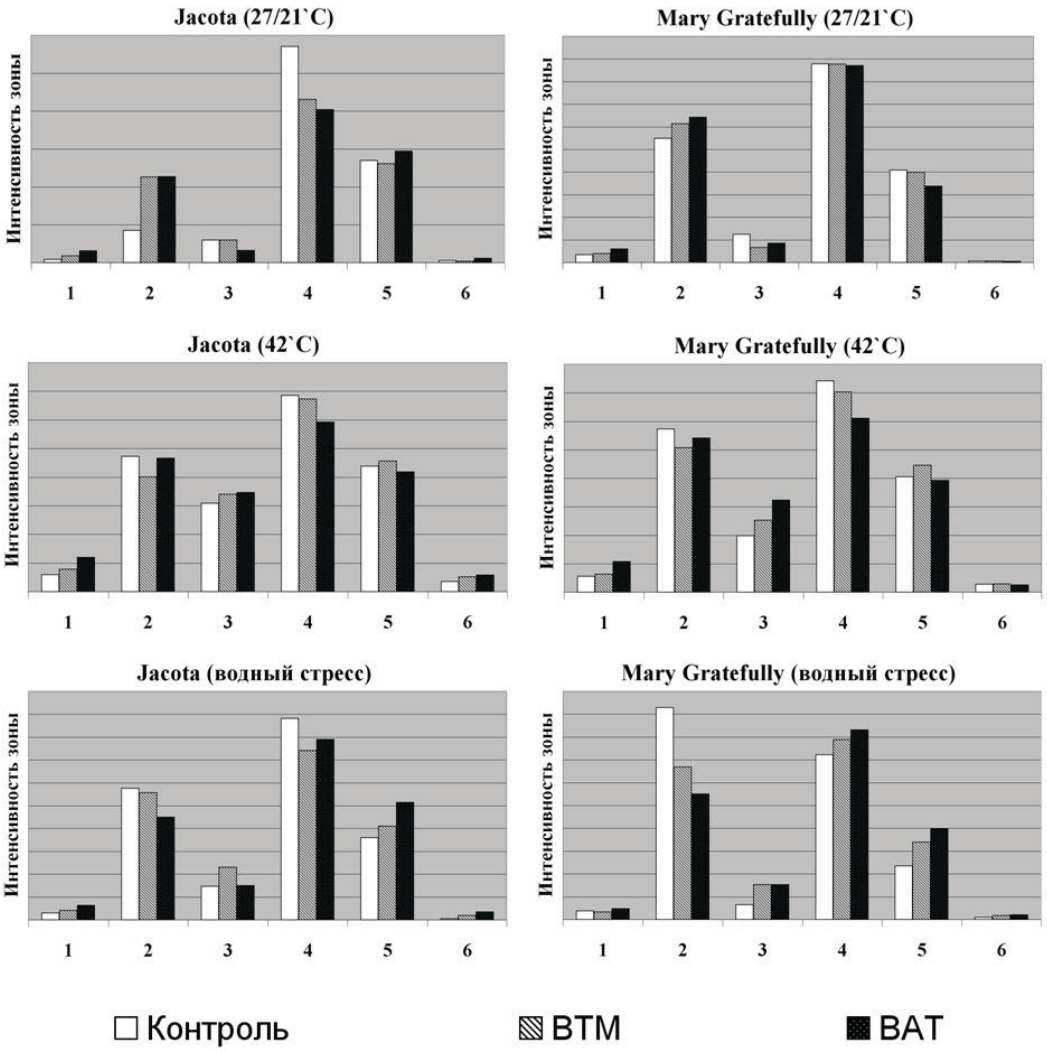


Рис. 1. Изменение интенсивностей зон пероксидазных изоферментов в генотипах томатов Jacota и Mary Carefully в оптимальных условиях и в условиях температурного и водного стрессов в вариантах ВТМ или ВАТ вирус-инфицированных растений. Молекулярные массы зон изоформ, кДа: **1**- 92,0; **2**- 65,6; **3**- 42,0; **4** - 38,0; **5** - 32,8; **6** - 27.8.

В генотипе Rufina под влиянием ВТМ при оптимальных условиях возрастает интенсивность двух пероксидазных зон: №4 (+19%) и №5 (+36%) (Рис. 2).

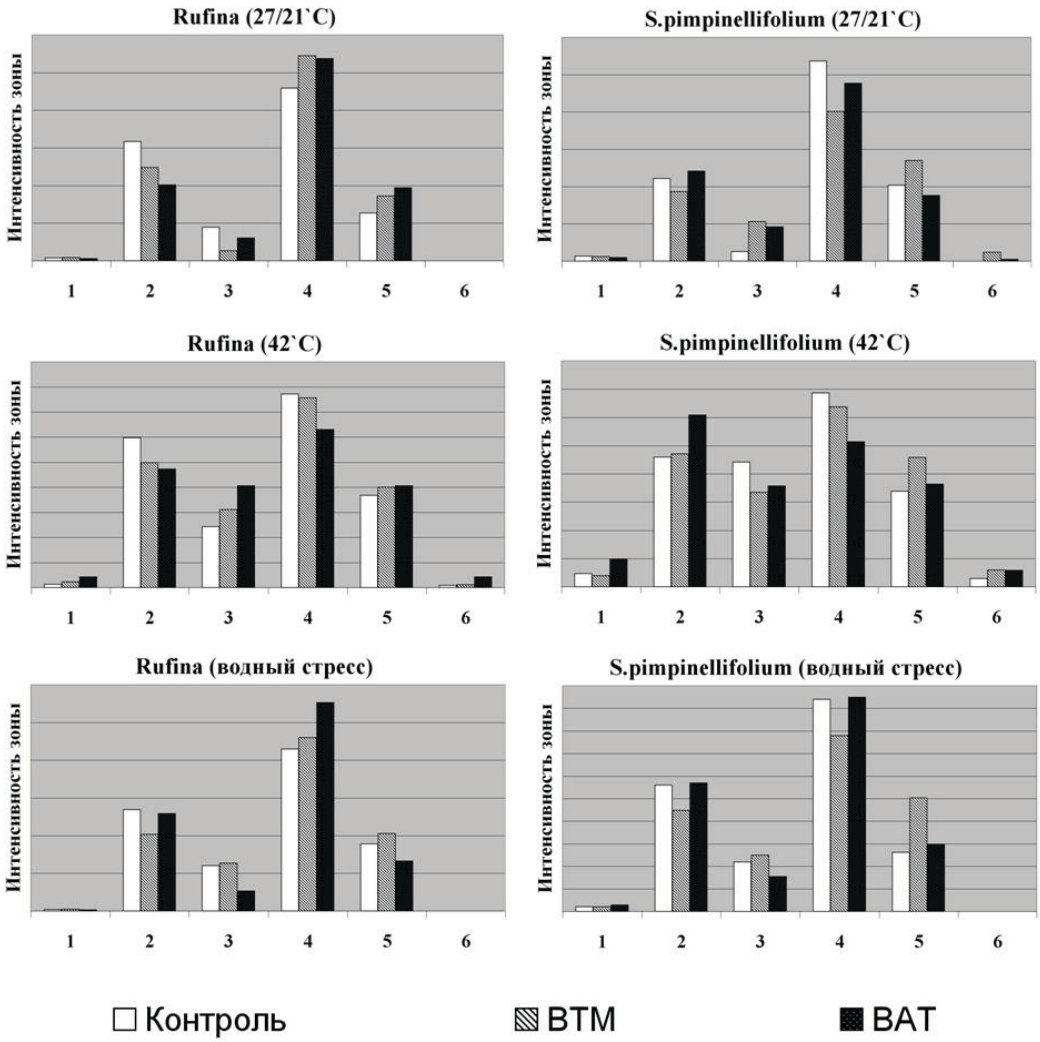


Рис. 2. Изменение интенсивностей зон пероксидазных изоферментов в генотипах томатов Rufina и S. pimpinellifolium в оптимальных условиях и в условиях температурного и водного стрессов в вариантах ВТМ или ВАТ вирус-ифицированых растений. Молекулярные массы зон изоформ, кДа: **1**- 92,0; **2**- 65,6; **3**- 42,0; **4** - 38,0; **5** - 32,8; **6** - 27.8.

Аналогичная картина наблюдается в варианте ВАТ: №4 (+17%) и №5 (+53%). Повышение температуры влияет на интенсивность зоны №3 (+37%) и зоны №5 (+45%). Воздействие ВТМ в этом температурном режиме еще сильнее сказывается на активности зоны №3 (+75%) и зоны №5 (+58%). ВАТ также способствует росту

активностей этих двух зон: №3 (+129%) и №5 (+60%). Водный стресс у этого генотипа поднял интенсивность зон №3(+35%) и №5 (+41%), схожий эффект отмечен в потомстве ВТМ инфицированных растений – увеличение этих зон до 43% и 62%, соответственно. Однако, если в условиях водного стресса при факторе ВАТ, растет зона №4 (20%) и очень незначительно зона №5 (+5%).

При оптимальных условиях воздействие вируса ВТМ на генотип *S. pimpinellifolium* выражается в резком подъеме интенсивности зоны №3 (+320%) и небольшом повышении зоны №5 (+32%) по сравнению с контролем. В варианте ВАТ наблюдается незначительное увеличение интенсивности зоны №2 (+9%) и существенный прирост зоны №3 (+262%). Повышение температурного режима до 42^{o} С приводит к повышению интенсивности зоны №1 (+79%) и крайне высокому подъему зоны № 3 (+773%). Воздействие ВТМ в этом температурном режиме также существенно повышает интенсивность зоны №1 (+53%) и зоны № 3 (+561%). Влияние ВАТ также сказывается на зоне №1 (+280%), зоне №2 (+37%) и зоне №3 (+606%).

В условиях водного стресса у генотипа *S. pimpinellifolium* существенно повышается интенсивность зоны № 3 (+332%) и незначительно зоны № 2 (+26%). Воздействие ВТМ и ВАТ в предыдущем поколениии приводит в стрессовых условиях к повышению интенсивности зоны №3 (+392%) и (+205%) соответственно.

Обобщая полученные результаты можно отметить, что под воздействием стрессовых условий на растения изученных сортов томатов в электрофоретических спектрах не обнаружено дополнительных зон изоформ пероксидаз, т.е. стрессы не приводят к экспресии дополнительных генов пероксидаз. Во всех условиях стресса у всех сортов в определенной степени увеличивалась интенсивность зон пероксидаз, что совпадает с данными определения суммарной активности при стрессах [10].

ВЫВОДЫ

В электрофоретических спектрах изученных 4 генотипов растений томатов были идентифицированы 6 изоформ пероксидаз. Температурный и водный стрессы вызвали значительные количественные изменения в активности этих изоформ. Характерные изменения активности проявились и в потомстве вирус- инфицированных растений.

У изученных генотипов томата, в вариантах ВТМ и ВАТ в оптимальных условиях, отмечено увеличение интенсивности определенных изоформ ферментов пероксидазы по сравнению со здоровыми растениями (контроль). Повышение интенсивности изоформ пероксидаз с низкой молекулярной массой наблюдалось в потомстве инфицированных томатов сорта Rufina (зоны № 4,№5), носящего ген устойчивости к ВТМ, и у дикой разновидности S.pimpinellifolium (зона №5)

В потомстве восприимчивых сортов томатов Jacota и Mary Gratefully при температурном и водном стрессах, а также в вирус-инфицированных растениях, опи-

сан наиболее значительный прирост интенсивностей зон со средней молекулярной массой изоформ пероксидаз (зоны №2 и №3).

Два сорта томатов - Jacota и S.pimpinellifolium - продемонстрировали наиболее значительное увеличение пероксидазной активности в условиях температурного и водного стрессов, и при дополнительном воздействии вирусных факторов ВТМ и ВАТ, что отражалось на приросте интенсивностей зон изоформ пероксидаз №2 и №3, Jacota, и зона №3, S.pimpinellifolium.

Библиография:

1. РОГОЖИН, В.В. *Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов*. СПб.: ГИОРД, 2004. 240 с.
2. АНДРЕЕВ, И.М. Функции вакуоли в клетках высших растений. В:*Физиология растений*, 2001. т.48, с.777-778.
3. BORCHERT, R. Time course and special distribution of phenylalanine ammonia lyase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissue. In: *Plant Physiology*, 1978. v. 62, p.789-793.
4. АНДРЕЕВА, В.А. *Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений*. М. Наука, 1988. с. 8-40.
5. FARKAS, G. L., STAHMANN, M.A. On the nature of changes in peroxidase isozymes in bean leaves infected by Southern Bean Mozaic Virus. In: *Phytopathology*, 1966. v.196656. p.669-677.
6. ROHRINGER, R., SAMBORSKI, D.J. Aromatic compounds in the host-parasite interaction. In: *Annual Reiew Phytopathology*, 1967. v.19675. p.77-86.
7. LEHRER, R.I. Antifungal effects of peroxidase systems. In: *Journal Bacteriology*, 1969. v.99. p.361-365.
8. GOVE, J.P., HOYLE, M.C. The isozymic similarity of indoleacetic acid oxidase to peroxidase in bich and horseradish. In: *Plant Physiology,*1975. v. 197556. p.684-687.
9. ЗЕМЛЯНУХИНА, О.А. и др. Сравнительный анализ методов определения активности и изоферментного спектра пероксидаз различного происхождения. В:*Успехи современного естествознания*, 2017. №9. стр.13-21.
10. MĂRII, L. et al. Diferențierea reacției antioxidative a genotipurilor de tomate la stresul termic sau hidric la descendenții plantelor infectate cu virusuri. În: *Ştiinţa în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective*. Ediția 6, 2022. p. 97-101. Conferința "Știința în Nordul Republicii Moldova: realizări, probleme, perspective" Bălți, Moldova, 20-21 mai 2022.

Работа выполнена в рамках проекта 20.80009.7007.04 „Биотехнологии и генетические способы выявления, сохранения и использования агробиоразнообразия", финансированного Национальным Агентством по Исследованиям и Развитиям.