ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ В ПРОРОСТКАХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ЗЕРЕН ГРИБАМИ *FUSARIUM OXYSPORUM* И *DRECHSLERA SOROKINIANA*

А. РУДАКОВА[1], С. РУДАКОВ[1], А. КЕРДИВАРЭ[1], Г. ЛУПАШКУ[2]
[1] *Государственный университет Молдовы;*
[2] *Институт генетики, физиологии и защиты растений, Республика Молдова*

Аннотация. Определялась суммарная пероксидазная активность в проростках 4 генотипов мягкой пшеницы под воздействием фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* и *Drechslera sorokiniana* – возбудителей корневых гнилей. Исследовались также электрофоретические профили изоферментов пероксидаз в контрольных и опытных образцах.

Значительное повышение активности пероксидаз наблюдалось только под воздействием *F. oxysporum* у линии L(Select x BŢ43) x Select (прирост активности составил 18%) и у сорта Aluniş (прирост 40%).

Воздействие *D. sorokiniana* не приводит к существенным изменениям пероксидазной активности в исследованных образцах. Наблюдалось незначительное увеличение активности (на 1%) в линии L(Select x BŢ43) x Select, а также слегка повысилась активность в сорте Aluniş (на 2%).

При изучении электрофоретических спектров пероксидаз в исследованных сортах пшеницы были обнаружены 6 изоферментов с молекулярными массами от 58,2 кД до 23,8 кД.

Под действием *F. oxysporum* и *D sorokiniana* не изменялся изоферментный состав пероксидаз в исследованных генотипах, однако, в некоторых образцах под влиянием *F. oxysporum* количественное соотношение отдельных изоферментов существенно менялось. В частности, в образце L(Select x BŢ 43) x Select накапливались зоны 3, 4, 5, 6, причем интенсивность зоны 5 возросла в 1,4 раза. В сорте Aluniş накапливались все зоны, кроме зоны 6, интенсивность зоны 3 возросла в 2,4 раза, интенсивность зоны 5 – в 1,6 раз.

Следовательно, при воздействии культуральных фильтратов грибов *F. oxysporum, D. sorokiniana* на зерна некоторых из исследованных генотипов мягкой пшеницы происходит генотипическое изменение пероксидазной активности растения-хозяина – стимулирование или ингибирование синтеза отдельных изоформ пероксидаз.

Ключевые слова. пероксидазная активность, генотипы пшеницы, фитопатогенные грибы, изоферменты.

Введение

Пероксидаза является одним из ферментов, участвующих в регуляции роста и развития растительных организмов, поскольку катализирует защитные реакции от повреждений различного типа, а также участвует в формировании клеточной стенки и дыхании растений (1, 2). Кроме того, известно, что пероксидаза чувствительна к различного рода неблагоприятным воздействиям и широко используется для оценки устойчивости к стрессу (3, 4).

Целью нашего исследования было определение суммарной пероксидазной активности в проростках 4-х генотипов мягкой пшеницы до и после воздействия на их зерна культуральных фильтратов фитопатогенных грибов *F.oxysporum* и *D.sorokiniana*, а также изучение изменений в электрофоретических спектрах пероксидазных ферментов.

Материалы и методы исследования

Для изучения влияния фитопатогенных грибов *F. oxysporum* и *D. sorokiniana* были отобраны 4 генотипа мягкой пшеницы (Табл.1). В качестве контроля служили зерна, обработанные буфером, в экспериментальных образцах зерна обрабатывали культуральными фильтратами указанных грибов.

Получение ферментных вытяжек из растений

Чтобы получить экстракт содержащихся в растении ферментов, пробу растительного материала растирали в ступке с кварцевым песком, с буфером для экстракции (0,1М Tris-HCl буфер, pH 7,5). Соотношение навески и буфера при экстракции составляло 1:4 (г/мл). Буфер предварительно охлаждали до 4-8°С, экстракцию проводили на льду. Экстрагирующую смесь выдерживали 30

минут в холодильнике, затем гомогенат центрифугировали в течение 10 минут при 15 тыс. об./мин. Собирали надосадочную жидкость и хранили ее при - 20°C.

Определение пероксидазной активности

Для определения пероксидазной активности в реакции с бензидином применяли метод А.Н. Бояркова, модифицированный другими авторами (5, 6). Бензидиновый реактив включал два компонента. Первый компонент состоял из 50% спиртового раствора 0,1% бензидина солянокислого, содержащего 6% ацетата натрия, 3% уксусной кислоты. Затем pH первого компонента доводили до pH 7.0 при помощи 10M NaOH. Конечная концентрация бензидина в реакционной смеси составляла 5,8 mM. Вторым компонентом являлся 0,5% раствор перекиси водорода (конечная концентрация 0,3мМ). Измерения активности осуществлялись при 520 нм на спектрофотометре СФ-46.

Выявление изоферментного спектра пероксидаз

Изоферменты разделялись методом вертикального нативного электрофореза в ПААГ по стандартному методу Дэвиса (7) при 4°C. Концентрации разделяющего и концентрирующего гелей составляли 7,5% и 5%, соответственно.

Электрофорез проводили, используя электрофоретическую камеру Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). К 0,2 мл ферментной вытяжки добавляли в качестве антиконвекционного компонента глицерин до конечной концентрации 10%. В каждый карман концентрирующего геля вносили по 20 мкл пробы. Продолжительность электрофореза при силе тока 20 мА - 2,5 часа, электрофорез проводили в холодильной камере при 4°C. Для выявления изоформ пероксидазных ферментов применяли бензидиновый реактив при pH 7,0. Перед окрашиванием геля компоненты бензидинового реактива смешивали в соотношении 1:1. После заливки геля бензидиновым реактивом окраска зон пероксидазной активности проявлялась, в зависимости от количества фермента в вытяжке, в течение 20-40 минут.

В качестве маркеров молекулярных масс использовали маркеры Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, Life Sciences, EU).

Полученные зимограммы сканировали на сканере Epson Expression 10000XL («GE Healthcare», USA). Денситометрический анализ зимограмм осуществляли при помощи программы Phoretix 1D Advansed: были определены молекулярные массы всех зон в геле, а также рассчитана интенсивность каждой зоны в треках.

Результаты и обсуждение

Значительное повышение пероксидазной активности под действием культурального фильтрата *F. oxysporum* наблюдалось только в двух генотипах – L (Select x ВҬ 43) x Select и Aluniş. (Таблица 1). Прирост активности в образце L (Select x ВҬ 43) x Select составил 18 %, а в Aluniş – 40%.

Таблица 1. Изменение активности пероксидазы в проростках 4-х генотипов пшеницы до и после обработки *F. oxysporum* (F.o.) и *D. sorokiniana* (D.s.)

№	Генотип	Активность в контроле ед./сек./г	Активность под действием F.o.	Прирост активности F.o. (%)	Активность под действием D.s.	Прирост активности D.s. (%)
1.	Moldova 66	2,68	2,31	-	2,31	-
2.	L/Select/ВҬ43/Select	1,74	2,05	18	1.76	1
3.	Odeschi 267	3,39	2,90	-	3,09	-
4.	Aluniş	2,43	3,41	40	2,48	2

Воздействие культурального фильтрата *D. sorokiniana* не вызывало существенных изменений в пероксидазной активности ни в одном из генотипов. Наблюдалось незначительное увеличение активности (на 1%) в генотипе L(Select x BƮ 43) x Select, а также слегка повысилась активность в сорте Aluniş (на 2 %).

При изучении электрофоретических спектров пероксидаз в исследованных генотипах пшеницы были обнаружены 6 изоферментов с молекулярными массами от 58,2 кД до 23,8 кД (Рис. 1).

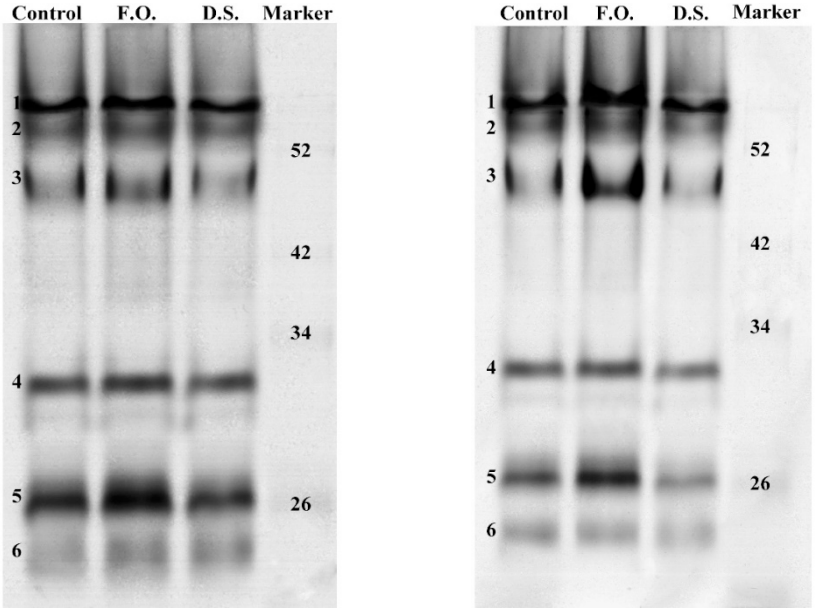


Рис. 1. Электрофоретические профили пероксидазных изоферментов в проростках пшеницы линии L (Select x BƮ 43) x Select (A) и сорта Aluniş (B) под действием грибов *F.oxysporum* (F.O.) и *D. sorokiniana* (D.S)

Воздействие фитопатогенных грибов *F. oxysporum* и *D. sorokiniana* не привело к качественным изменениям в изоферментном составе пероксидаз. Общее число пероксидазных ферментов сохранилось – по 6 зон во всех образцах. Однако существенно изменилось количественное соотношение изоферментов при воздействии *F.oxysporum* в генотипах L(Select x BƮ 43) x Select и Aluniş (Рис. 2).

В экспериментальных образцах наблюдалось увеличение интенсивности зон отдельных изоферментов относительно контроля. В частности, в образце L (Select x BƮ 43) x Select накапливаются зоны 3, 4, 5, 6, причем интенсивность зоны 5 (M_r 26 кД) возросла в 1,4 раза. В сорте Aluniş накапливаются все зоны, кроме зоны 6, но больше всего зона 3 (M_r 47 кД), интенсивность этой зоны возросла в 2,4 раза, а также существенно возросла интенсивность зоны 5 – в 1,6 раз.

Выводы

Следовательно, при воздействии фитопатогенных грибов F. oxysporum и D. sorokiniana на зерна некоторых из исследованных генотипов мягкой пшеницы происходит генотипическое изменение пероксидазной активности растения-хозяина – стимулирование или ингибирование синтеза отдельных изоформ пероксидаз.

Наибольшие изменения в интенсивности зон после воздействия F. oxysporum были обнаружены у двух изоформ пероксидаз - зоны 3 и зоны 5, что, по-видимому, свидетельствует об их большей значимости в защитной реакции растения.

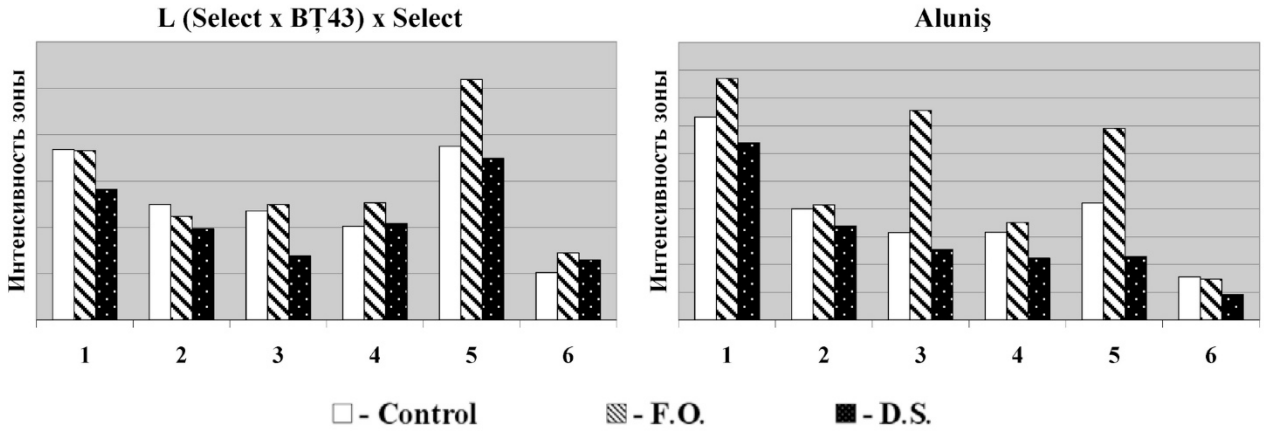


Рис. 2. Изменение количественного соотношения отдельных изоферментов пероксидаз в двух генотипах пшеницы под действием грибов *F.oxysporum* (F.O.) и *D. sorokiniana* (D.S.)

Благодарности

Исследования проведены в рамках проекта Государственной Программы 20.80009.7007.04 «Биотехнологии и генетические способы выявления, сохранения и использования агробиоразнообразия», финансируемой Национальным Агентством по Исследованиям и Развитию Республики Молдова.

Список литературы / References

1. Almagro L., Gomez R. L., Belchi-Navarro S. et al. Class III peroxidases in plant defense reactions. In: Jour. Exper. Botany, 2009, 60 (2), p. 377-390.
2. Рубин, Б.А. Физиология и биохимия дыхания растений: учебное пособие. Москва: Москов. Ун-та, 1974. 512 с.
3. Долгих, Ю.И. Селекция на осмоустойчивость кукурузы in vitro и характеристика растений – регенератов. В: Физиология растений, 1994. Т.41, №1. с.114-117
4. Baysal Furtana, G., Tipirdamaz, R. Physiological and antioxidant response of three cultivars of cucumber (Cucumis sativus L.) to salinity. In: TurK. J. Biol., 2010, V. 34. p. 287-296.
5. Рогозин, В.В. Пероксидаза: строение и механизм действия. Иркутск: Изд. ИГТУ, 2004, 200 с.
6. Землянухин, А. А. Практикум по биохимии: учебное пособие. Воронеж: Изд. ВГУ, 1993, 188 стр.
7. Davis, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. In: Annals of the NY Academy of Science, 1964, 121. p. 404-427.

CHANGES IN PEROXIDASE ACTIVITY IN SOFT WHEAT SPROUTS AFTER PROCESSING OF GRAINS WITH MUSHROOMS FUSARIUM OXYSPORUM AND DRECHSLERA SOROKINIANA

A. RUDAKOVA[1], S. RUDAKOV[1], A. KERDIVARA[1], G. LUPASHKU[2]

[1] State University of Moldova, 60, str. Mateevich, Kishinev, MD 2009 Moldova;

rud-as@mail.ru, ORCID: 0000-0001-9638-2151;

[2] Institute of Genetics, Physiology and Plant Protect

on, str. Padurii, 20, Kishinev, MD 2002, Republic of Moldova

Abstract. The total peroxidase activity was determined in the sprouts of 4 wheat genotypes under the influence of phytopathogenic fungi *Fusarium oxysporum* and *Drechslera sorokiniana* - root rot pathogens. The electrophoretic profiles of peroxidase isozymes in control and experimental samples were also studied. A significant increase in peroxidase activity was observed only under the influence of *F. oxysporum* and only in the line of L (Select x BȚ 43) x Select (an increase of 18%) and in the variety Aluniş (an increase of 40%). The treatment of grains with the *D. sorokiniana* culture filtrate did not lead to significant changes in peroxidase activity in the studied samples. There

was a slight increase in activity (1%) in the line L (Select x BŢ 43) x Select, and there was also a slight increase in activity in Aluniş (2%).

When studying the electrophoretic spectra of peroxidase enzymes in the studied wheat genotype, 6 isozymes with molecular weights from 58.2 kDa to 23.8 kDa were found. The phytopathogenic fungi *F. oxysporum* and *D. sorokiniana* did not change the isozyme composition of peroxidases in the studied cultivars, however, in some specimens influenced by *F. oxysporum* the quantitative ratio of individual isoenzymes changed significantly. In particular, in the sample L(Select x BŢ 43) x Select, zones 3, 4, 5, 6 accumulated and the intensity of zone 5 has increased 1.4 times. In the Aluniş variety, all zones except zone 6 accumulated, the intensity of zone 3 increased 2.4 times, and the intensity of zone 5 increased 1.6 times.

Consequently, when the culture filtrates of the fungi *F. oxysporum, D. sorokiniana* were exposed to the grains of some of the studied genotypes of soft wheat, a genotypic change in the peroxidase activity of the host plant occured – stimulating or inhibiting the synthesis of individual isoforms of peroxidases.

Keywords. Peroxidase activity, wheat genotypes, phytopathogenic fungi, isoenzymes.