

УДК 581.19:582.951.4

Дьяченко Л. Ф.¹, канд. біол. наук, пров. наук. сп.,
Топтіков В. А.¹, канд. біол. наук, пров. наук. сп., Міресь С. Л.¹, асп.,
Бабаянц Л. Т.² канд. сільгосп. наук., зав. відділом фітопатології та ентомології,
Тоцький В. М.¹, д-р біол. наук., проф., зав. каф.

¹ Одеський національний університет, кафедра генетики та молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

² Селекційно-генетичний інститут УААН,
Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна

МНОЖИННІ МОЛЕКУЛЯРНІ ФОРМИ ДЕЯКИХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ І РЕЗИСТЕНТНІСТЬ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ДО ФУЗАРІОЗУ

Наведено електрофоретичні спектри множинних молекулярних форм (ММФ) пероксидази (ПО) (КФ 1.11.1.7), супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1), фенолоксидази (ФО) (КФ 1.10.3.1) та цитохромоксидази (ЦХО) (КФ 1.9.3.1) в тканинах етіологованих паростків деяких видів егілопсів, сортів та ліній озимої м'якої пшениці, які відрізняються ступенем стійкості до фузаріозної інфекції. Спектрам усіх досліджуваних ферментів властиві певні генотипові особливості. Деякі з ММФ можуть слугувати показниками стійкості до фузаріозної інфекції та генетичного походження цієї ознаки у рослин.

Ключові слова: пероксидаза, супероксиддисмутаза, множинні молекулярні форми ферментів, стійкість, імунітет

Гриби роду *Fusarium* здатні викликати загибель сходів та розрідження посівів, а у дорослих рослин — побуріння та відмирання вторинних коренів і основ стебел. Це призводить до появи колосся зі шуплим зморшкуватим зерном і може значно впливати на врожай [1]. Зменшення шкоди від захворювання можна досягти шляхом використання сортів, відносно стійких до фузаріозу. В зв'язку з цим актуальною стає проблема визначення та прогнозування стійкості рослин до цієї хвороби. В останні роки для зазначеної мети часто використовують множинні молекулярні форми (ММФ) деяких ферментів [2, 3]. Серед них важливе місце займають супероксиддисмутаза (СОД), пероксидаза (ПО) та ін. Пероксидаза, наприклад, є важливим компонентом захисної реакції рослин на вплив патогену [4, 5]. Вважають, що швидке виникнення вільних радикалів та висока активність кисню в клітинах провокують сукупність процесів, які створюють метаболічні та структурні бар'єри на шляху розвитку фузаріозу [6, 7].

Метою даних досліджень було з'ясування закономірностей стійкості до фузаріозної інфекції, поглиблення сучасних уявлень про роль ген-ензимних систем у процесах формування резистентності до цього захворювання. Для цього досліджували множинні молекулярні форми деяких окислювально-відновних ферментів у сортів та ліній м'якої пшениці, які відрізнялися ступенем стійкості щодо захворювання фузаріозом.

Матеріали і методи

Використовували етіологовані тижневі паростки *Aegilops cylindrica*, *Ae. squarrosa*, *Ae. tauschii* (високостійкі дикі форми) і різних ліній м'якої пшениці, які відрізнялися показниками стійкості до *F. graminearum*. Ці лінії було надано відділом фітопатології та ентомології Селекційно-генетичного інституту УААН, м. Одеса.

Екстракцію ферментів з тканин здійснювали буфером (0,05 М трис-НСІ, рН 6,8, 0,1% дитіотреїтол, 0,1% аскорбінова кислота, 15% цукроза, 1% тритон X-100) у співвідношенні тканина: буфер — 1: 1. З метою кращої екстракції гомогенати залишали на ніч у холодильнику, потім центрифугували. Надосадова рідина містила легкорозчинні та мембранозв'язані форми ферментів.

Електрофорез цих ферментів провадили за варіантом неперервної системи Девіса [8] у 10% поліакриламідному гелі; після закінчення електрофорезу вияв пероксидазу здійснювали за допомогою бензидину [9], а також бензидину з додатковими реагентами — флороглюцином та феруловою кислотою [10]. Супероксиддисмутазу (СОД) виявляли за методом [11], цитохромоксидазу (ЦХО) — [12], фенолоксидазу (ФО) — [13].

Оцінку стійкості рослин до фузаріозу здійснювали за відсотками уражених зерен у колосі та у балах [14].

Результати електрофоретичного розподілу ферментів обробляли за допомогою спеціальної комп'ютерної програми [15].

Результати досліджень та їх аналіз

Експерименти провадили на чистих лініях м'якої пшениці, наведених у таблиці 1 та диких формах егілопсів.

Таблиця 1

Показники стійкості до фузаріозу у досліджуваних ліній озимої м'якої пшениці

Лінія	Рівень стійкості (бал)	Ураження зерна у колосі, (%)	Кількість домінуючих генів	Можливий донор стійкості
Од. напівкарликова	1,0	98,5	—	—
Еритроспермум 898/91	7,8	3,1	3	Обрій, Промінь
8/77—91	8,6	2,4	3	<i>Aegilops cylindrica</i>
Еритроспермум 2593/90	7,7	4,0	2	Промінь
Еритроспермум 729/96	7,5	5,0	2	<i>Triticum palmovae</i>
5/20-91	8,9	1,5	3	<i>Aegilops cylindrica</i>
Еритроспермум 3059/92	7,0	13,8	1	92/69-153/ІМН/ІМНДW
5/81-91	8,7	2,0	3	<i>Aegilops cylindrica</i>
Еритроспермум 2582/89	7,8	13,0	3	Обрій
Обрій	7,0	12,1	1	Red River
Ringo Sytan	7,7	3,2	3	?

Як видно з наведених у таблиці даних, Одеська напівкарликова є своєрідним еталоном: вона не містить генів стійкості до фузаріозу і тому сильно уражується

цим захворюванням. Решта досліджуваних рослин містить від одного до трьох домінуючих генів стійкості різного походження і характеризується досить високою резистентністю до фузаріозу за десятибальною шкалою її оцінки, яка віддзеркалює ступінь ураження патогенним грибом зерна в колосі. Особливо стійкими є лінії 8/77-91, 5/20-91, 5/81-91, які отримали гени стійкості від *Aegilops cylindrica*. Не виключено, що у цих міжвидових гібридів проявляється ефект адаптивного гетерозису відносно стійкості до фузаріозу.

На рисунках 1-4 представлені електрофоретичні спектри деяких оксидоредуктаз із паростків досліджуваних егілопсів та ліній м'якої пшениці. З'ясувалося, що

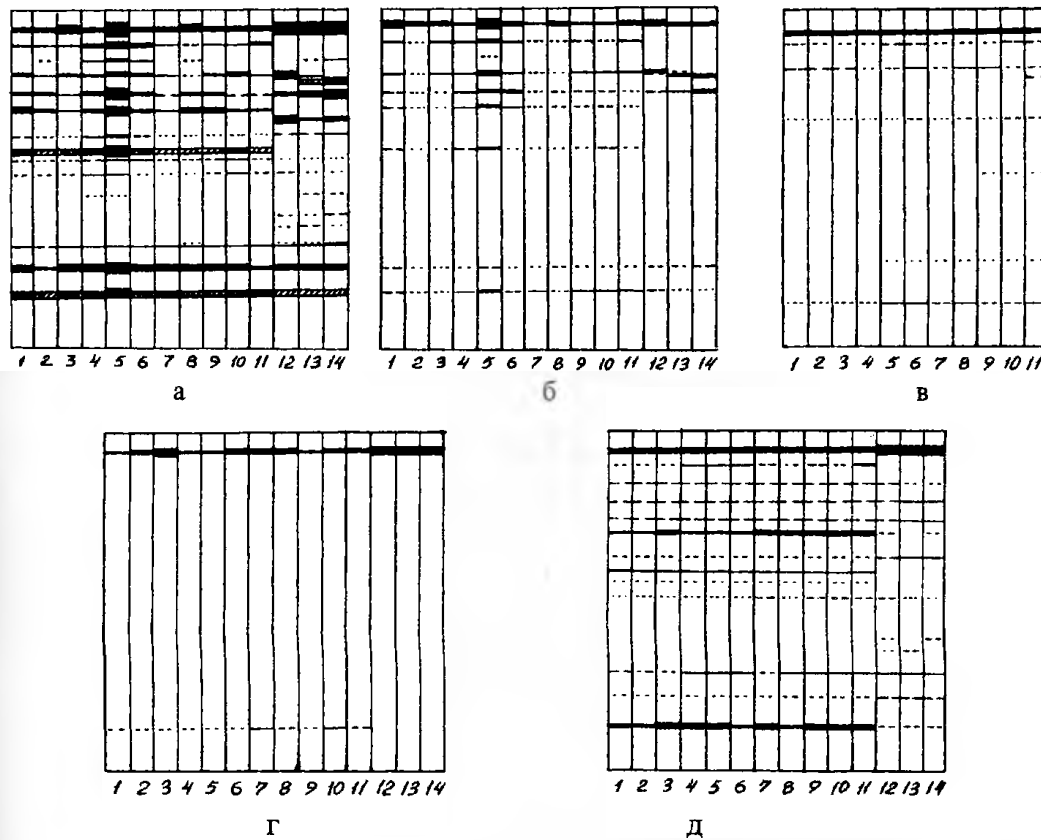


Рис. 1. Електрофоретичні спектри пероксидази за різних способів забарвлення: а — забарвлення бензидином, 5 мМ; б — забарвлення бензидином, 5 мМ з доданням флороглюцина, 2 мМ; в — забарвлення бензидином, 5 мМ з доданням ферулової кислоти, 1 мМ; г — забарвлення пірокатехіном, 20 мМ; д — забарвлення п-фенілендіаміном, 10 мМ. 1 — Одеська напівкарликова; 2 — Еритроспермум 898/91; 3 — 8/77; 4 — Еритроспермум 2593/90; 5 — Еритроспермум 729; 6 — 5/20; 7 — Еритроспермум 3059/92; 8 — 5/81-91; 9 — Еритроспермум 2582/89; 10 — Обрій; 11 — Ringo Sytan; 12 — *Aegilops cylindrica*; 13 — *Aegilops squarrosa*; 14 — *Aegilops tauschii*.

кількість множинних молекулярних форм пероксидази за зафарблення бензидином досягає 17 (рис. 1а). Розташування та інтенсивність забарвлення смуг ПО на електрофореграмах у різних ліній пшениці досить подібні; відмінності спостерігаються лише у деяких форм. Найбільш помітні генотипові особливості спостерігаються серед ММФ з Rf 0,08, 0,10, 0,13, 0,29-0,3 та ін. У порівнянні з пшеницею у досліджених видів егілопса відсутні ММФ пероксидази з Rf 0,06 і 0,21. Використання інших

засобів забарвлення електрофореграм (бензидин + флороглюцин, бензидин + ферулова кислота, пірокатехін, n-фенілендіамін) веде до зменшення кількості ізоформ ферменту до 2-13 (рис. 1 б-д). За усіх способів забарвлення виявляються одні і ті ж відмінності між окремими генотипами пшениць та пшеницею і егілопсами.

Електрофоретичний розподіл ММФ фенолоксидази показав наявність 15 смуг (рис. 2). Найбільше різноманіття виявляється серед ММФ з Rf 0,06, 0,16 та серед високорухливих фракцій з Rf 0,29 і більше. У егілопсів немає форм з Rf 0,06, 0,21, 0,23, але виявляються додаткові форми з Rf 0,32 та 0,33.

За аналізом спектрів цитохромоксидази найбільші відмінності у генотипів пшениці виявлено серед смуг Rf 0,06 — 0,16 (рис. 3). Досліджені види егілопсів відрізняються від пшениць спектрами форм з високою рухливістю: у егілопсів відсутні електрофоретичні фракції з Rf 0,21, 0,23, але на відміну від пшениць виявляються ММФ з Rf 0,29, 0,32, 0,33.

Електрофоретичні спектри СОД (рис. 4) у досліджених генотипів пшениці дуже подібні; невеликі розбіжності спостерігаються серед малорухливих форм з Rf 0,02-0,07 та швидкорухливих з Rf 0,56. Спектри СОД егілопсів, як і інших досліджуваних ферментів, дещо своєрідні; зокрема, у егілопсів відсутні форми СОД з Rf 0,05 і 0,07, але виявляється інша форма з відносною рухливістю 0,14.

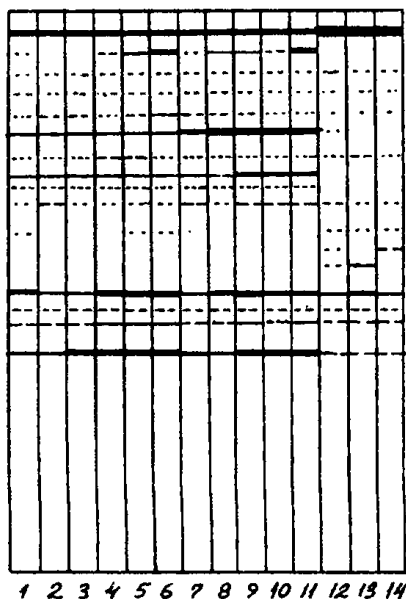


Рис. 2. Електрофоретичні спектри фенолоксидази:

1 — Одеська напівкарликова; 2 — Еритроспермум 898/91; 3 — 8/77; 4 — Еритроспермум 2593/90; 5 — Еритроспермум 729; 6 — 5/20; 7 — Еритроспермум 3059/92; 8 — 5/81-91; 9 — Еритроспермум 2582/89; 10 — Обрій; 11 — Ringo Sytan; 12 — *Aegilops cylindrica*; 13 — *Aegilops squarrosa*; 14 — *Aegilops tauschii*.

Функціональний аналіз спектрів досліджуваних ферментів стикається з певними труднощами, оскільки значна частина генотипових відмінностей у спектрах ферментів пов'язана з кількісними показниками, які визначаються також способом та інтенсивністю зафарблення ізозимів. Незважаючи на це, комп'ютерний аналіз електрофореграм дав можливість встановити деякі достовірні співвідношення між особливостями спектрів ферментів, з одного боку, та фізіологічними і генетичними параметрами

досліджених рослин, з другого. Так, за аналізу спектрів ПО, отриманих після зафарблення пірокатехіном (рис. 1 г), виявлено пряму пропорційну залежність між резистентністю рослин до захворювання, вираженою в балах, і ступенем забарвлення множинної форми з Rf 0,03: у Одеської напівкарликової ця смуга слабка порівняно з “лідерами” стійкості — лініями 5/81-91, 5/20-91, 8/77-91 і 898/-91. За інших способів зафарблення пероксидази достовірних кореляцій між інтенсивністю забарвлення смуг та показниками стійкості рослин до збудника фузаріозу не виявлено. В цілому слід зазначити, що отримання гену стійкості до фузаріозу від *Triticum palmovae* супроводжується загальним підвищенням пероксидазної активності. Особливо це помітно у випадку форми з Rf 0,08, виявленої після зафарблення бензидином і флороглюцином. Лінію сорту Обрій і *Aegilops cylindrica* можна оцінити як генетично споріднені донори стійкості, тому що у всіх реципієнтних рослин спостерігаються схожі відмінності щодо зафарблення бензидином (як правило, зниження інтенсивності цілого ряду смуг з Rf 0,05, 0,16, 0,21, 0,45). Цікаво, що у егілопсів ці форми або відсутні, або мають значно нижчу інтенсивність забарвлення, ніж у пшениць (смуга Rf 0,45).

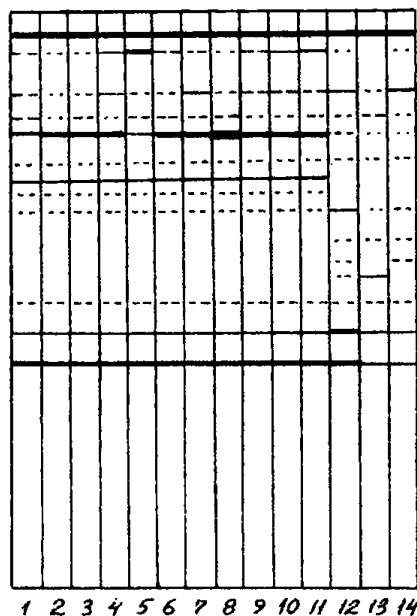


Рис. 3. Електрофоретичні спектри цитохромоксидази:

1 — Одеська напівкарликова; 2 — Еритроспермум 898/91; 3 — 8/77; 4 — Еритроспермум 2593/90; 5 — Еритроспермум 729; 6 — 5/20; 7 — Еритроспермум 3059/92; 8 — 5/81-91; 9 — Еритроспермум 2582/89; 10 — Обрій; 11 — Ringo Sytan; 12 — *Aegilops cylindrica*; 13 — *Aegilops squarrosa*; 14 — *Aegilops tauschii*.

Аналіз електрофоретичного розподілу ММФ фенолоксидази (ФО) також підтверджує наявність генетичних взаємозв'язків між Обрієм і егілопсом як донорами стійкості до фузаріозу для інших досліджених генотипів м'якої пшениці. Наявність у досліджуваних генотипів генів з обох цих джерел веде, як правило, до зменшення ступеня зафарблення смуг з Rf 0,10, 0,21, 0,25, 0,37. Паралельно простежується взаємозв'язок між рівнем резистентності рослин і активністю форми з відносною рухливістю 0,13 — чим вища резистентність до фузаріозу, тим більш інтенсивно забарвлення ця ізоформа ФО.

Схожі висновки можна зробити після аналізу спектрів ЦХО: отримання тою

чи іншою м'якою пшеницею гена стійкості від *Aegilops cylindrica* супроводжується інтенсивним забарвленням смуги ЦХО з Rf 0,13, хоча на електрофореграмах самого донора ця смуга не виділяється серед інших. Можна припустити наявність у пшениць — реципієнтів певної взаємодії генів, яка призводить до підвищення активності або синтезу даної ізоформи ЦХО.

Збільшення стійкості рослин до фузаріозної інфекції супроводжується зниженням інтенсивності зафарблення форм СОД з Rf 0,07. У "лідерів" стійкості ця форма взагалі не виявляється.

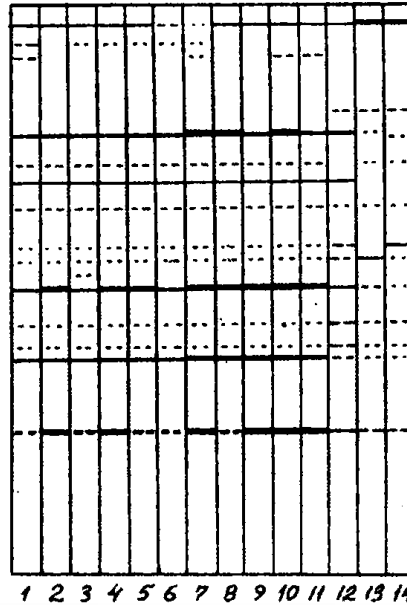


Рис. 4. Електрофоретичні спектри супероксиддисмутази:

1 — Одеська напівкарликова; 2 — Еритроспермум 898/91; 3 — 8/77; 4 — Еритроспермум 2593/90; 5 — Еритроспермум 729; 6 — 5/20; 7 — Еритроспермум 3059/92; 8 — 5/81-91; 9 — Еритроспермум 2582/89; 10 — Обрій; 11 — Ringo Sytan; 12 — *Aegilops cylindrica*; 13 — *Aegilops squarrosa*; 14 — *Aegilops tauschii*.

В цілому отримані результати підтверджують відому закономірність про залежність експресії гена від його генетичного оточення. Дійсно, однакові множинні молекулярні форми ферментів, які визначаються одними і тими ж алелями, мають неоднакову інтенсивність зафарблення на електрофореграмах різних генотипів пшениць, що свідчить про різну експресію алельних генів залежно від генного оточення та типів взаємодії генів.

Результати наших досліджень варто враховувати в селекції за створення стійких до фузаріозу генотипів пшениць. Наведені дані свідчать про те, що кількісний склад та інтенсивність електрофоретичних форм досліджуваних ферментів можуть слугувати критеріями прогнозу стійкості генотипів м'якої пшениці до фузаріозу, а також маркерами генетичної спорідненості сортів та ліній за цією ознакою.

Література

1. Пересипкин В. А. Атлас болезней полевых культур. — Киев: Урожай, 1981. — 247 с.
2. Monfalbini P. Superoxide dismutases and peroxidase activities in rust-infected *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* leaves // Riv. Pathol. veg. — 1987. — V. 23. — P. 99-108.

3. Castillo F. J. Peroxidases and stress // In: Penel C., Gaspar T., Grippin H. eds. Plant peoxidases 1980-1990. — University of Geneva Press, Switzerland. — 1992. — P. 187-203.
4. Фомченко Н. С. Изоферментный состав пероксидазы и аспаратаминтрансферазы у пшеницы при инфицировании бурой ржавчиной // VI съезд белорус. о-ва генетиков и селекционеров, Горки, 2-4 июля 1992: тез докл. — Горки, 1992. — С. 75.
5. Moerschbacher M. B. Plant peroxidases involvement in response to pathogen // In: Penel C., Gaspar T., Grippin H. eds. Plant peoxidases 1980-1990. — University of Geneva Press, Switzerland. — 1992. — P. 91-99.
6. Weigend M., Lyz H. The involvement of oxidative stress in the pathogenesis of *Botrytis cinerea* on *Vicia faba* leaves // Z. Pflanzenkrankh Pflanzenschutz. — 1996. — V. 103. — P. 310-320.
7. Wu G., Shah B. J., Lawrence E. B., Leon J., Fitzsimmons K., Levine E. B., Raskin I., Shah D. Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants // Plant Physiol. — 1997. — V. 115. — P. 427-435.
8. Davis B. I. Disk-electrophoresis. 2. Method and application to human serum protein // Ann. N. - J. cad. Sci. — 1964. — V. 121. — P. 404-427.
9. Сафонов В. И., Сафонова М. Р. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений. — М.: Наука. — 1971. — 113 с.
10. Топтиков В. А., Дьяченко Л. Ф., Тоцкий В. Н. Влияние некоторых соединений на электрофоретические спектры множественных молекулярных форм пероксидазы // Укр. біохім. журн. — 1997. — Т. 69, № 1. — С. 41-49.
11. Гааль Э., Медьеши Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. — М.: Мир, 1982. — 448 с.
12. Берстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 455 с.
13. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Агропромиздат, 1987. — 430 с.
14. Бабаянц О. В., Мирось С. Л., Залогіна М. А., Мирось О. Л. Стійкість рослин різних сортів озимої пшениці до *Fusarium graminearum* // Вісник ОДУ. — 2000. — Т. 5, вип. 1 — С. 81-85.
15. Календарь Р. Н. Компьютерные программы для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков // Материалы конф. "Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений". — Киев, 1994. — С. 25-26.

Дьяченко Л. Ф.¹, Топтиков В. А.¹, Мирось С. Л.¹, Бабаянц Л. Т.², Тоцкий В. Н.¹

¹Одесский национальный университет, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

²Селекционно-генетический институт УААН, Овидиопольская дорога, 3. Одесса, 65036, Украина

МНОЖЕСТВЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ НЕКОТОРЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ К ФУЗАРИОЗУ

Резюме

Представлены электрофоретические спектры множественных молекулярных форм (ММФ) пероксидазы (КФ 1.11.1.7), супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), фенолоксидазы (КФ 1.10.3.1) и цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) в тканях этиолированных проростков некоторых видов эгиллопсов, сортов и линий озимой мягкой пшеницы, отличающихся степенью резистентности к фузариозной инфекции. Спектры всех исследованных ферментов характеризуются определенными генотипическими особенностями. Некоторые ММФ могут служить показателями устойчивости к фузариозной инфекции и генетического происхождения этого признака у растений.

Ключевые слова: пероксидаза, супероксиддисмутаза, множественные молекулярные формы ферментов, стойкость, иммунитет

Diachenko L. F.¹, Topikov V. A.¹, Miros S. L.¹, Babayants L. T.², Totsky V. N.¹

¹Odessa State University, Department of Genetic and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

²Plant Breeding and Genetics Institute,
Ovidiopolskaya St., 3, Odessa, 65036, Ukraine

**MULTIPLE MOLECULAR FORMS OF SOME OXIDOREDUCTASE
AND THE RESISTANCE OF WINTER WHEAT SORTS PLANT
TO FUSARIUM HEAD BLIGHT**

Summary

The electrophoretic spectra of multiple molecular forms of peroxidase (E. C. 1.11.1.7), superoxide dismutase (E. C. 1.15.1.1), phenoloxidase (E. C. 1.10.3.1) and cytochromoxidase (E. C. 1.9.3.1) in some winter wheat varieties and lines have been studied. These spectra had some special genotypical features. Some multiple forms of the enzymes can be used as resistance indices to fusarium head blight and testify of genetic origin of the same sign in the wheat plants.

Key words: peroxidase, superoxide dismutase, multiple molecular forms of enzyme, resistance immunity.