

Е.Н. Бирюк, младший научный сотрудник
Институт плодоводства НАН Беларуси
УДК 634.11:58.036.5

Изменения в пероксидазном составе листьев яблони под воздействием низких температур

С помощью метода электрофореза в полиакриламидном геле в 2001-2002 гг. изучался полиморфизм пероксидазы листьев яблони в зависимости от температуры и сроков промораживания. Дан сравнительный анализ электрофореграмм пероксидазы при различных температурах и сроках промораживания. Установлено, что специфические изоформы после промораживания появляются только у сортов со слабой устойчивостью к морозу.

В настоящее время актуальной проблемой является поиск методов оценки исходного материала на холодоустойчивость и устойчивость к болезням. А это требует современных, быстрых, надежных и высокочувствительных методов. Использование пероксидазы в этом плане представляется наиболее перспективным, поскольку ей придается большое значение в обеспечении устойчивости растений к различным патогенам и неблагоприятным факторам среды [1, 7, 13, 14].

Большинство работ по изучению роли пероксидазы направлено на определение влияния низких температур на растительный организм, поскольку температура является одним из важнейших экологических факторов, действующих на растения. При этом все большее внимание исследователей привлекают изменения в ферментативных системах, сопутствующие температурным флуктуациям. Известно, что при воздействии низких температур на листья растений озимой пшеницы, различающихся по морозоустойчивости, исчезали одни изоферменты и появлялись другие. Ряд исследователей отмечает, что при этом количество изоферментов не менялось, а происходила лишь конформация молекул под воздействием низкотемпературного стресса [10].

With the help of the method of polyacrylamide gel electrophoresis the author studied the polymorphism of peroxidase in the apple leaves depending on the temperature and the terms of frost in 2001-2002. The article provides the comparative analysis of the isoenzymes of peroxidase at various temperatures and terms of frost. It was determined that specific isoenzymes occur after frost only at the grades with a weak resistance to the frost.

Последнее время многие авторы отмечают возможность использования отдельных изоферментов в качестве маркеров генетических систем. Увеличение активности пероксидазы дает не только возможность обнаруживать признаки стресса по присутствию характерных изоферментов в генетически неоднородном материале [6, 8, 11], но также рассматриваются возможности их использования для идентификации семенного материала [2, 3, 4, 5].

Важное значение имеют сроки, в которые проводится отбор материала и определение изоферментного состава. Gelvonauskis и Siksnianiene [15] при изучении полиморфизма пероксидазы и полифенолоксидазы в листьях яблони показали, что число изоферментов у различных сортов яблони меняется на протяжении всего вегетационного периода. Однако наилучшее проявление изоферментов пероксидазы было отмечено в июле, а полифенолоксидазы – в конце периода вегетации.

В связи с этим целью нашей работы являлось определение оптимальных сроков отбора листьев, оптимальных температур и сроков промораживания, при которых отмечается наилучшее проявление пероксидазных изоферментов, а также поиск отдельных изоферментов, по которым можно судить об устойчивости растений к низким температурам.

Условия, объекты и методы исследований

Объектами лабораторных исследований служили сорта яблони: Память Сьюбаровой, Чулановка, Антоновка обыкновенная, Антей, Имант, Белорусское сладкое, Элстар, Ред Боскоп и гибрид 84-50/9, протестированные полевым методом и относящиеся к разным группам зимостойкости и устойчивости к болезням.

В качестве исследуемого материала были использованы листья, отобранные в мае, июне, августе, сентябре и октябре 2001-2002 гг.

Моделирование повреждающих факторов проводилось с помощью холодильной камеры. Листья промораживались в течение 16 часов, 1, 2 и 5 суток при температуре -10°C , -17°C и -30°C . Контролем служили листья, не подвергшиеся воздействию низких отрицательных температур.

Изоферментный состав определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле по С.С. Чайановой и Э.Е. Хавкину [12] с некоторыми модификациями. Для проведения электрофореза была использована камера Hoefer SE 600.

Результаты исследований и обсуждение

Наши исследования проводились в мае, июне, августе, сентябре и октябре 2001-2002 гг. В 2001 г. листья промораживались при -10°C , -17°C и -30°C . Во всех случаях наблюдались изменения в пероксидазном составе листьев. Однако было установлено, что наиболее оптимальной температурой для проведения данного анализа является температура -17°C . Поэтому в 2002 г. листья промораживали только при -17°C , а также исключили промораживание в течение 16 часов, поскольку существенной разницы между промораживанием в течение 16 часов и 1 суток не наблюдалось.

В 2002 г. был изменен буфер для приготовления выляжки из листьев. Вместо предложенного в методике по С.С. Чайановой и Э.Е. Хавкину [12] использовали буфер из методики Б.А. Писарева с соавторами [9]. В результате были получены более четкие электрофореграммы пероксидазы. Кроме того, в сентябре и октябре 2002 г. были использованы другой подход в нанесении образцов на гель. На один гель одновременно наносили и контрольный вариант, и опытные (рис. 1, 2). Таким

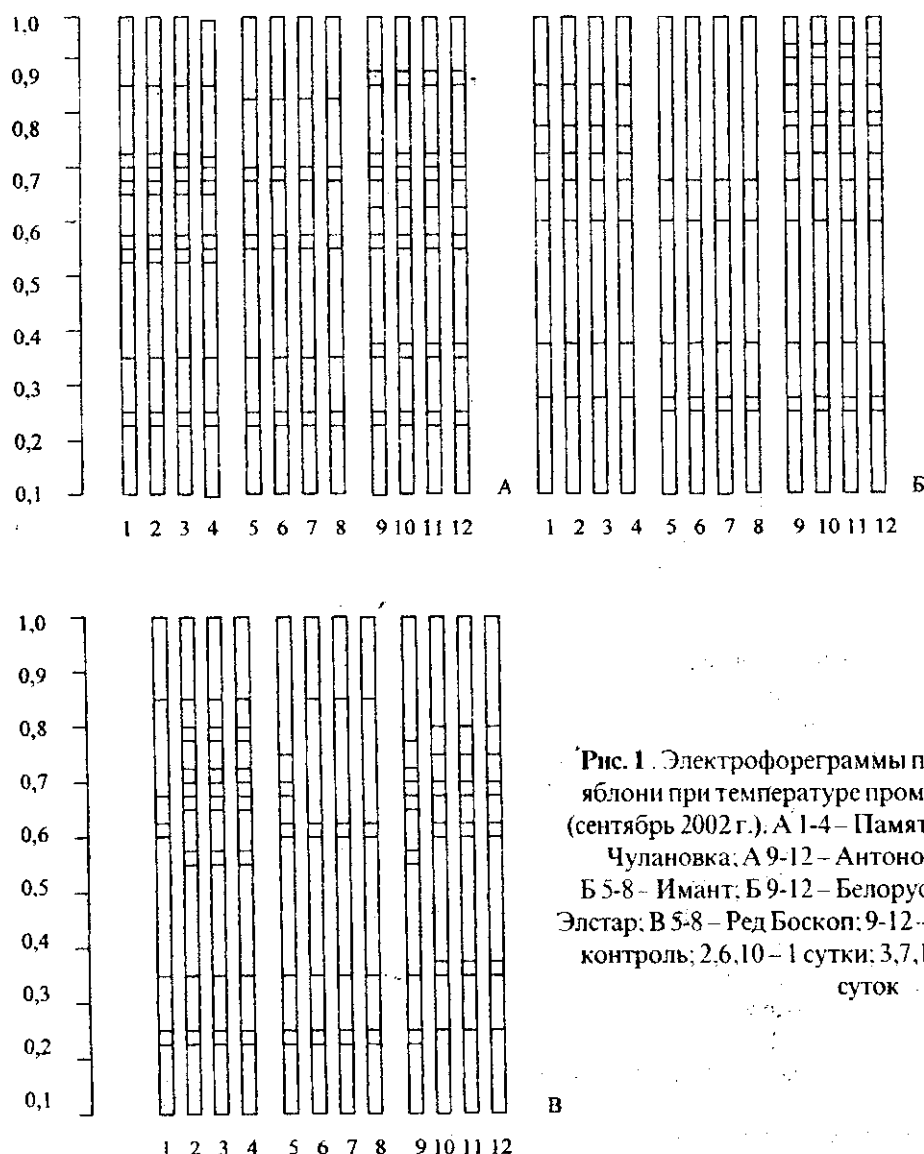


Рис. 1. Электрофореграммы пероксидазы листьев яблони при температуре промораживания -17°C (сентябрь 2002 г.). А 1-4 – Память Сьюбаровой; А 5-8 – Чулановка; А 9-12 – Антоновка; Б 1-4 – Антей; Б 5-8 – Имант; Б 9-12 – Белорусское сладкое; В 1-4 – Элстар; В 5-8 – Ред Боскоп; 9-12 – гибрид 84-50/9. 1, 5, 9 – контроль; 2, 6, 10 – 1 сутки; 3, 7, 11 – 2 суток; 4, 8, 12 – 5 суток

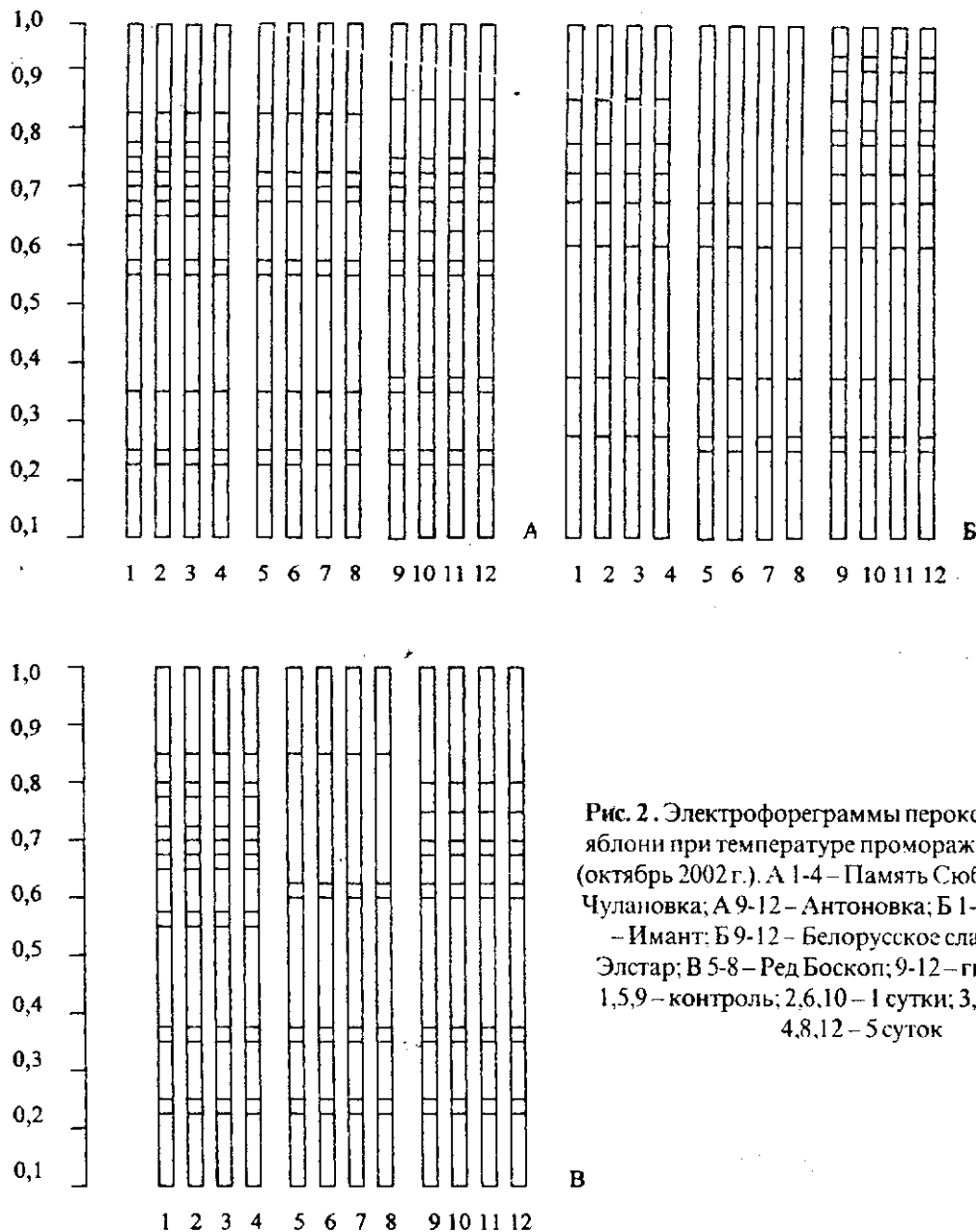


Рис. 2. Электрофореграммы пероксидазы листьев яблони при температуре промораживания -17°C (октябрь 2002 г.). А 1-4 – Память Сюбаровой; А 5-8 – Чулановка; А 9-12 – Антоновка; Б 1-4 – Антей; Б 5-8 – Имант; Б 9-12 – Белорусское сладкое; В 1-4 – Элстар; В 5-8 – Ред Боскоп; 9-12 – гибрид 84-50/9. 1, 5, 9 – контроль; 2, 6, 10 – 1 сутки; 3, 7, 11 – 2 суток; 4, 8, 12 – 5 суток

образом, и контрольный вариант, и опытные находились в абсолютно одинаковых условиях при проведении электрофореза. И только в этом случае можно судить о различиях, возникающих между контрольными и опытными вариантами.

На рисунке 1 представлены электрофореграммы пероксидазы листьев яблони, отобранных на анализ в сентябре 2002 г. Морозоустойчивые сорта Память Сюбаровой, Чулановка и Антоновка представлены 8-12 изоформами. Изоформы с Rf 0,22; 0,24; 0,34; 0,55; 0,58; 0,68 и 0,71 являются общими для всех трех сортов. Изоформы с Rf 0,74 и 0,85 есть только у сортов Память Сюбаровой и Антоновка. Кроме того, каждый сорт характеризуется и специфическими изоформами. Для сорта Память Сюбаровой это изоформы с Rf 0,51; 0,64, для сорта Чулановка – с Rf 0,83 и для сорта Антоновка – с Rf 0,36; 0,62 и 0,87. Однако различий между количеством и расположением изоформ пероксидазы в контрольных и опытных вариантах морозоустойчивых сортов не обнаружено (рис. 1А).

Сорта со средней устойчивостью к морозу (Антей, Имант и Белорусское сладкое) имеют общие изоформы с Rf 0,26; 0,37; 0,60 и 0,68. Изоформы с Rf 0,74; 0,78 и 0,85 есть у Антея и Белорусского сладкого и отсутствуют у сорта Имант. Специфической для сорта Имант является изоформа с Rf 0,24. Для Белорусского сладкого специфическими являются изоформы с Rf 0,81; 0,90 и 0,92. Для Антея специфических изоформ не отмечено. Для сортов со средней устойчивостью также не отмечено различий между контрольными и опытными вариантами (рис. 1Б).

Сорта Элстар, Ред Боскоп и гибрид 84-50/9 имеют только две общие изоформы с Rf 0,24 и 0,34. Все остальные изоформы представлены либо у двух сортов и отсутствуют у гибрида, либо представлены у одного из сортов и гибрида и отсутствуют у другого сорта. В целом сорта со слабой устойчивостью к морозу представлены 6–12 изоформами в зависимости от сорта и варианта. Кроме того, для этих сортов характерны различия между контрольным вариантом и опыт-

ными (рис. 1В). У сорта Элстар контрольный вариант представлен 7 изоформами с Rf 0,22; 0,24; 0,34; 0,61; 0,64; 0,68 и 0,84. После промораживания исчезают изоформы с Rf 0,61 и 0,64 и появляются с Rf 0,56; 0,57; 0,65; 0,70; 0,74; 0,78 и 0,81. У сорта Ред Боскоп контрольный вариант представлен 8 пероксидазными изоформами с Rf 0,22; 0,24; 0,34; 0,61; 0,64; 0,68; 0,70 и 0,74. После промораживания у этого сорта исчезают 3 изоформы с Rf 0,68; 0,70 и 0,75 и появляется изоформа с Rf 0,84. Контрольный вариант гибрида 84-50/9 представлен 10 изоформами с Rf 0,22; 0,24; 0,34; 0,56; 0,57; 0,65; 0,68; 0,70; 0,74 и 0,78. После промораживания исчезают изоформы с Rf 0,22; 0,56; 0,57; 0,65; 0,74 и 0,78 и появляются с Rf 0,37; 0,61; 0,64; 0,75 и 0,81.

Электрофореграммы листьев, отобранных на анализ в октябре 2002 г., показаны на рисунке 2. Сорта Память Сябаровой и Антоновка представлены 12 изоформами. Чулановка – 9. Изоформы с Rf 0,22; 0,24; 0,34; 0,55; 0,58; 0,68; 0,71 и 0,74 являются общими для всех сортов. Специфической для сорта Память Сябаровой является изоформа с Rf 0,64, а изоформы с Rf 0,62 и 0,65 отмечены у сорта Антоновка (рис. 2А).

Электрофореграммы сортов Антей, Имант и Белорусское сладкое совпадают с электрофореграммами, полученными в сентябре (рис. 2Б).

В октябре у сортов Элстар, Ред Боскоп и гибрида 84-50/9 контрольные варианты не отличались от замороженных. Вероятно, это связано с тем, что накануне отбора листьев ночью были заморозки до -3...-4 °С и они привели к изменению пероксидазного состава листьев. Это предположение подтверждается тем, что контрольные варианты вышеуказанных сортов совпадают с опытными, полученными как в октябре, так и в сентябре.

В заключение можно сделать следующие выводы:

- 1) наиболее оптимальной температурой промораживания является -17 °С;
- 2) электрофорез контрольного варианта и опытных нужно проводить на одном геле;
- 3) отбирать листья на анализ необходимо до наступления заморозков;
- 4) специфические изоформы появляются после промораживания только у слабоустойчивых сортов Элстар, Ред Боскоп и гибрида 84-50/9.

Литература

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. 1988. Москва: Наука. 1988. – 128 с.
2. Гольшикина Л.В. Вишня: распределение множественных молекулярных форм ферментов в различных тканях и органах вишни методом электрофореза // Совершенствование сортимента и технологии возделывания косточковых культур (Тезисы докладов и выступлений на научно-методической конференции. Орел, 14–17 июля 1998 г.). – Орел: ВНИИСПК. 1998. – С. 36-38.
3. Гольшикина Л.В. Возможности использования полиморфных белков как генетических маркеров в идентификации различных генотипов плодовых культур // Проблемы оценки исходного материала и подбора родительских пар в селекции плодовых растений: Сборник докладов и сообщений XVI Мичуринских чтений 26-27 октября 1995 года. – Мичуринск. 1995. – С. 105-107.
4. Гольшикина Л.В. Идентификация сортов плодовых и ягодных культур по молекулярным маркерам // Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур. – Орел: ВНИИСПК, 1999. – С. 226-234.
5. Гольшикина Л.В., Долматов Е.А. Некоторые особенности сортов и селекционных форм груши // Совершенствование сортимента и технологии возделывания груши. – Орел, 1997. – С. 19-21.
6. Гольшикина Л.В., Джигало Е.Н. Роль ферментов в механизме устойчивости вишни к грибным болезням // Новые методы селекции и создание адаптивных сортов сельскохозяйственных культур: результаты и перспективы. Тезисы докладов научной сессии (1-3 июля 1998 г.). – Киров, 1998. – С. 112-113.
7. Граскова И.А., Владимирова С.В., Рихванов Е.Г. Механизм активации пероксидазы при бактериальном патогенезе различается в клетках устойчивого и неустойчивого к патогену сортов картофеля // Доклады Академии наук. – 2001. – Т. 379. – № 2. – С. 267-269.
8. Джигало Е.Н., Гольшикина Л.В. Физико-биохимические особенности форм вишни, устойчивых к коккомикозу // Генетико-селекционные проблемы устойчивости плодовых растений к неблагоприятным биотическим факторам: Сборник докладов и сообщений XVII Мичуринских чтений (29-30 октября 1996 г.). Тамбов. – 1998. – С. 147-151.
9. Писарев Б.А., Трофимец Л.Н., Анисимов Б.В., Мусин С.М., Князев В.А., Мусина Р.А., Руснова Е.А. Методы оценки оздоровленных сортов и меристемных линий в элитном семеноводстве картофеля. Москва: Росовощплодпром. 1991. – 40 с.
10. Савич И.М. Пероксидазы – стрессовые белки растений // Успехи современной биологии. – 1989. – Т. 107. – Вып. 3. – С. 406–417.
11. Фомина Н. К. Ранняя диагностика устойчивости к стрессу гибридов яблони по УФ-спектрам анодных изопероксидаз // Генетика. – 1994. – Т. 30. – С. 167.
12. Чайнова С.С., Хавкин Э.Е. Использование нейтрального полиакриламидного геля для изоферментного анализа пероксидаз и эстераз // Физиология растений. – 1990. – Т. 37. – Вып. 5. – С. 1036-1039.
13. Biles C.L., Bruton B.D., Zhang J.X., Russo V. Characterization of muskmelon fruit peroxidases at different developmental stages // *Biologia plantarum*. – 2000. – V. 43(3). P. 373–379.
14. Gajewska E., Urbanek H. The changes in H₂O₂ level and H₂O₂-decomposing enzymes in tomato leaves after infection with fungus // *Ekofizjologiczne aspekty reakcji roslin na dzialanie czynnikow stresowych*. – 1999. – Cz.2. – P. 549–554.
15. Gelvonauskis B., Siksnianiene J. Peroxidase and polyphenoloxidase. Polymorphism in apple cultivars of different scab resistance // Scientific works of the Lithuanian institute of Horticulture and Lithuanian university of Agriculture. Horticulture and Vegetable growing. – 2001. – V. 20(3). – P. 3744.