

МАМЕНКО Т.П.[✉], СІРАНТ Л.В., ДИКУН М.О., ПОЧИНОК В.М.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: t_tamenko@ukr.net

[✉] t_tamenko@ukr.netЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ СПЕКТРИ ТА АКТИВНІСТЬ ПЕРОКСИДАЗИ
У РОСЛИНАХ ПШЕНИЦІ РІЗНИХ СОРТІВ

Мета. Дослідити електрофоретичні спектри та активність пероксидази у проростках сортів пшениці, які відрізняються за генетично-детермінованими ознаками. **Методи.** Біохімічні з використанням нативного гель-електрофорезу та спектрофотометра. **Результати.** Серед досліджуваних сортів найвищою пероксидазною активністю у проростках відрізнялися сорти озимої м'якої пшениці Астарта, ярої спельти Полба Голіковська та пшениця із високим вмістом амілози НАW. У ході порівняння молекулярних форм ферменту виявлено, що у проростках досліджуваних сортів було по 8–9 ізоформ із пероксидазною активністю, які відрізнялися за відносною електрофоретичною рухливістю. Малорухлива ізоформа та ізоформи із відносно швидкою рухливістю були стабільними і зафіксовані в усіх досліджуваних сортах. Виявлені форми із середньою електрофоретичною рухливістю були у 90 % досліджуваних сортів. **Висновки.** Електрофоретичні спектри пероксидази у проростках досліджуваних сортів суттєво відрізняються за кількістю та рухливістю її множинних молекулярних форм. Електрофоретичні спектри пероксидази та пероксидазна активність можуть бути використані в якості діагностичних ознак для порівняльного аналізу досліджуваних рослин на ранніх фазах онтогенезу. **Ключові слова:** пероксидаза, електрофоретичні спектри, сорт, пшениця (*Triticum L.*).

Сучасні світові та передові вітчизняні розробки в галузі генетики і селекції, пов'язані із створенням нових сортів рослин, характеризуються широким застосуванням як класичних методів (гібридизація, експериментальний мутагенез, хромосомна інженерія), так і новітніх молекулярно-генетичних розробок у цій галузі. Поєднання різноманітних новітніх генетично-молекулярних технологій із традиційною селекцією дозволяє одержувати нові високопродуктивні, високотехнологічні, адаптовані до сучасних кліматичних умов сорти сільськогосподар-

ських культур [1]. Розширення і поглиблення досліджень у цьому напрямку передбачає комплексне використання фізіолого-генетичних підходів для більш ґрунтовного вивчення стану рослинного організму, розкриття суті інтегральних процесів, які визначають рівень і спрямованість ключових ланок метаболізму та функціонування регуляторних систем рослин на різних рівнях їх організації.

Одним із методів, що дає змогу виявити особливості метаболізму різних видів рослин, є метод вивчення молекулярно-генетичного поліморфізму ферментів [2, 3]. Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) є поліморфним ферментом, вона характеризується поліфункціональністю і високою гетерогенністю своєї ізоферментної системи [4, 5]. Виявлена кореляція між окремими її ізоформами і деякими господарсько цінними ознаками [3]. Відомі також спроби залучення пероксидаз як генетичних маркерів під час аналізу поліморфізму природних популяцій рослин і з'ясування філогенетичних зв'язків [3, 6]. Пероксидаза виконує регуляторні та захисні функції в рослинах і завдяки мінливості своїх форм може складати основу адаптаційного механізму рослин до несприятливих умов зовнішнього середовища [8].

Кожен білок – унікальний продукт свого гена, він може служити надійним маркером цього гена [3]. При цьому спосіб маркування визначається характером ознаки й організацією кодувальної системи [8]. У випадку пероксидази окремі її ізоформи також можуть бути унікально представлені у різних генотипах рослин. Це дає можливість виявити генотипи за наявністю характерних для них ізоформ у генетично неоднорідному матеріалі. Автор [8] також вважає, що за спектрами поліморфних білкових систем найбільш ефективною є оцінка популяцій на екологічну пластичність [8]. Чисельні дослідження учених пропонують використовувати спектр ізоформ пероксидаз та інших ферментів у якості діагностичної ознаки для біохімічних

© МАМЕНКО Т.П., СІРАНТ Л.В., ДИКУН М.О., ПОЧИНОК В.М.

досліджень [3, 9, 10]. Про використання молекулярних форм ферментів у якості генетичного тесту пишуть Сміт із співавторами. Вони проаналізували 61 вид роду *Nicotiana* та виявили, що для рослин цих видів характерна наявність 33-х ізоформ пероксидаз у різних поєднаннях, що відрізняються у видів рослин цього роду [11]. Автори вважають, що спектр зимограм пероксидази є хорошим тестом для порівняльного аналізу досліджуваних рослин.

Метою нашої роботи було дослідити електрофоретичні спектри та активність пероксидази у сортів пшениці, які відрізняються за генетично-детермінованими ознаками.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження слугували семи-добові проростки пшениці різних сортів, які відрізнялися за чіткими генетично-детермінованими ознаками:

✓ за генетичним потенціалом зернової продуктивності: Астарта – високоінтенсивний сорт високоврожайного спрямування і Малинівка – високобілковий сорт інтенсивного типу універсального використання (оригінація обох сортів – Інститут фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ));

✓ за методами створення: Куяльник – створений методом аналітичної селекції (оригінація – Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовицтва (СГП)) та Смуглянка – створений методом експериментального мутагенезу (оригінація – ІФРГ НАН України та Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України);

✓ за ознакою забарвлення зернівки: Білява – забарвлення зернівки білого кольору і Чорноброва – забарвлення зернівки чорного кольору (оригінація обох сортів – СГП);

✓ пшениці спеціального технологічного використання зі змінним вмістом крохмалю: із високим вмістом амілози або НАВ (high amylose wheat) та пшениця ваксі із високим вмістом амілопектину сорту Софійка (оригінація – СГП);

✓ пшениця видів із плівчастим зерном, так звана полбяна пшениця: озима спельта – Зоря України і Європа (оригінація – Всеукраїнський науковий інститут селекції) та яра полба – Полба Голіковська (оригінація – Інститут рослинництва ім. В.І. Юр'єва).

Зерно пшениці перед пророщенням знеза-

ражували 5 % розчином перманганату калію протягом хвилини та промивали під проточною водою. Проростки пшениці вирощували у лабораторних кюветах протягом 7-ми діб за температури 22°C.

Для визначення активності пероксидази у якості субстрату використовували гваякол. Для отримання ензимного екстракту наважку рослинного матеріалу (0,2 г) розтирали у ступці з 4 мл 50 мМ фосфатного буфера (рН 7,5), який містив 2 мМ ЕДТА, 1 мМ PMSF, 5 мМ β-меркаптоетанолу і 1 % (в/о) полівінілпіролідону. Гомогенат центрифугували за 10000 об/хв. протягом 20 хв. за 4°C. Супернатант використовували для визначення активності ензимів за допомогою спектрофотометра «Smart Spec Plus». Активність гваякол пероксидази визначали за збільшенням оптичної густини за 470 нм протягом 2 хв. у результаті окиснення гваяколу (коефіцієнт екстинції $E = 26,6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [12]. Повторність визначень 6-кратна. Вміст загального розчинного протеїну у ферментному екстракті визначали за Бредфорд [13]. Статистичну обробку даних проводили з використанням критерію Стьюдента.

Умови проведення електрофорезу. Для отримання ферментного екстракту наважку рослинного матеріалу розтирали у фарфоровій ступці з середовищем для екстракції у співвідношенні 1 : 5, яке містило: 0,01 М трис-гліциновий буфер (рН 8,3), 10 % сахарозу, 0,3 % аскорбат та 0,04 % цистеїн гідрохлорид [14]. Екстрагування тривало 1 год, після чого суміш центрифугували за 5500 г упродовж 10 хв. Електрофоретичне розділення аніонних ізоформ пероксидази проводили в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) у вертикальних блоках за температури 4–6°C у 0,2 М трис-гліциновому (рН – 8,3) буфері [15]. Як лідерний барвник використовували бромфеніловий синій. У кожен лунку вносили по 15 мкл препарату (кількість підібрана експериментально з урахуванням вмісту білка у пробі). Для візуалізації ізоформ пероксидази гелі інкубували протягом 10 хв в охолодженому 5 мМ розчині бензидину в Na-ацетатному буфері (рН – 5,2), промивали дистильованою водою і витримували у 0,3 % розчині пероксиду водню до появи синього забарвлення [16]. За використання для інкубації пероксидази розчину, який містить гваякол із пероксидом водню, неможливо було зафіксувати повний ізоферментний спектр пероксидази, що відмічено й іншими

дослідниками [10]. Електрофорез проводили у 4-кратній повторності.

Результати та обговорення

Для порівняння молекулярних ізоформ ферменту в різних сортів пшениці проводили аналіз аніонних ізоформ пероксидази у складі цитоплазматичних білків надземної маси проростків. Аналіз компонентного складу ферменту проводили за кількістю його ізоформ із пероксидазною активністю та їх відносною електрофоретичною рухливістю (Rf).

Досліджено, що у сортів озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum*) Астарта і Малинівка, які відрізняються за генетичним потенціалом зернової продуктивності, виявлено різну кількість ізоформ пероксидази на електрофореграмі (рис. 1). Зокрема, у проростках пшениці сорту Малинівка зафіксовано 8 ізоформ ферменту, тоді як у сорту Астарта їх було 6. Зокрема, у проростках пшениці сорту Астарта не було зафіксовано двох ізоформ із середньою електрофоретичною рухливістю, які виявлені у проростках сорту Малинівка. Крім того досліджено, що у проростках пшениці сорту Астарта активність пероксидази була в 2,5 раза вищою, ніж у високобілкового сорту Малинівка (рис. 3).

У сортів озимої пшениці Куяльник та Смуглянка набір молекулярних форм пероксидази був однаковий – 8 ізоформ, які за електрофоретичною рухливістю були схожими до виявлених ізоформ ферменту більшості сортів (рис. 2). В екстрасильного сорту озимої пшениці Куяльник пероксидазна активність у проростках була майже удвічі вищою у порівня-

нні з сортом Смуглянка (рис. 3).

Порівняння отриманих ізоформ пероксидази у проростках озимої пшениці сортів Білява і Чорноброва показали, що вони були однаковими за кількістю (8 ізоформ) та відносною електрофоретичною рухливістю (рис. 1). При цьому схожий набір молекулярних форм ферменту зафіксовано у більшості досліджуваних нами сортів. Названі сорти пшениці незначно відрізнялися за пероксидазною активністю – вона була удвічі вищою у проростках сорту Білява порівняно із сортом Чорноброва (рис. 3).

Пшениця спельта (*Triticum spelta*) відноситься до так званої полбяної пшениці – групи видів із плівчастим зерном [17]. Генотип спельти, як і у пшениці, містить 42 хромосоми і має формулу A^uA^uBBDD , він близькоспоріднений із гексаплоїдною м'якою пшеницею. Має форми ярого та озимого типу розвитку. Полба має генотип $AABB$, кількість хромосом 28 і рідше застосовується у виробництві, ніж спельта.

Показано, що сорти озимої спельти Зоря України та Європа практично не відрізнялися за пероксидазною активністю у проростках, однак відрізнялися за електрофоретичними спектрами пероксидази. Зокрема, у сорту Зоря України виявлено додаткову молекулярну ізоформу ферменту на ензимограмі, яка відрізнялася високою електрофоретичною рухливістю та була відсутньою у сорту Європа та в усіх інших досліджуваних сортів пшениці (рис. 1, 2). Загалом у сорту озимої спельти Зоря України зафіксовано 9 молекулярних ізоформ ферменту, тоді як у сорту Європа їх було 8.

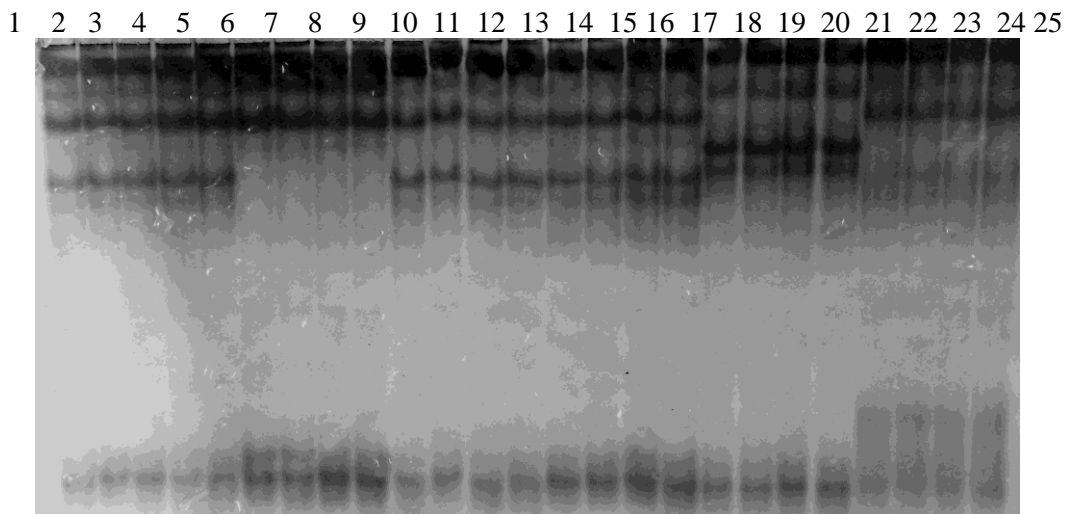


Рис. 1. Електрофоретичні спектри пероксидази у проростках пшениці різних сортів: Малинівка – 1–5; Астарта – 6–9; Білява – 11–13; Чорноброва – 14–17; Полба Голіковська – 18–21; Зоря України – 22–25.

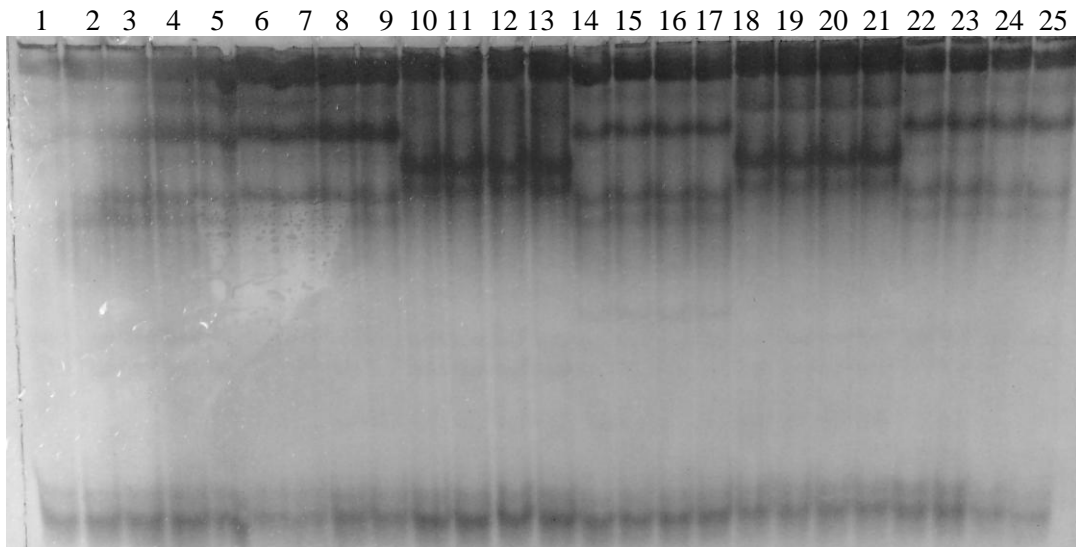


Рис. 2. Електрофоретичні спектри пероксидази у проростках пшениці різних сортів: Смуглянка – 1–5; Куяльник – 6–9; HAW – 10–13; Софійка – 14–17; Полба Голіковська – 18–21; Європа – 22–25.

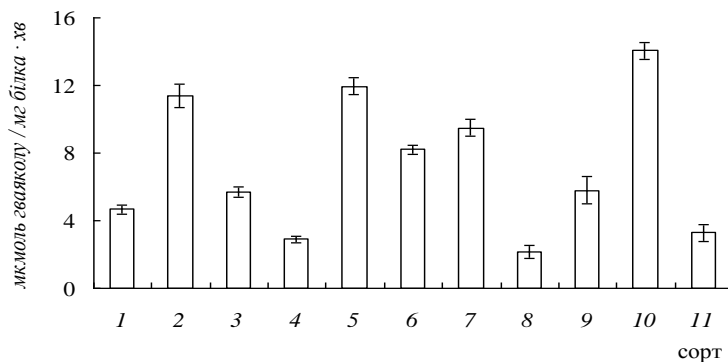


Рис. 3. Активність пероксидази у проростках пшениці різних сортів. 1 – Малинівка; 2 – Астарта; 3 – Білява; 4 – Чорноброва; 5 – Полба Голіковська; 6 – Європа; 7 – Зоря України; 8 – Смуглянка; 9 – Куяльник; 10 – HAW (haigh amylose wheat); 11 – Софійка.

У ярого сорту Полба Голіковська активність пероксидази була майже в 1,5 раза вищою від попередніх двох сортів озимої спельти (рис. 3). При цьому яра полбяна пшениця суттєво відрізнялася за набором ізоформ пероксидази у проростках порівняно із рослинами озимої спельти сортів Зоря України та Європа (рис. 1, 2). У проростках Полби Голіковської виявлено додаткову молекулярну ізоформу пероксидази, яка відрізнялася середньою електрофоретичною рухливістю та була відсутньою як в обох сортів озимої спельти, так і у більшості інших досліджуваних нами сортів пшениці. Схожий до ярого сорту Полба Голіковська набір ізоформ пероксидази як за кількістю виявлених ізоформ – 9, так і за їх електрофоретичною рухливістю, зафіксовано у так званій пшениці HAW (Haigh amylose wheat) із високим вмістом амілози

(рис. 2) [18].

На сьогоднішній день перспективним є створення сортів пшениці спеціального технологічного використання, зокрема із високим вмістом амілози або HAW [17, 18]. У такої пшениці активність пероксидази у проростках найбільш інтенсивно зростала у порівнянні з усіма іншими досліджуваними сортами (рис. 3).

Нами проведено дослідження пшениці сорту Софійка, яка належить до пшениці ваксі зі змінним хімічним складом крохмалю, який на 100 % складається із амілопектину та взагалі не містить амілози. Показано, що пероксидазна активність у рослинах цього сорту була майже у 4 рази нижчою від активності ферменту у пшениці із високим вмістом амілози (HAW) (рис. 3). Водночас за набором молекулярних

форм пероксидази пшениця ваксі сорту Софійка була подібною до більшості досліджуваних сортів – Малинівка, Білява, Чорноброва, Смуглянка, Куяльник, Європа (рис. 2).

Аналіз отриманих результатів показав, що серед досліджуваних сортів найвищою пероксидазною активністю у проростках відрізнялися сорти озимої м'якої пшениці Астарта, ярої спельти Полба Голіковська та пшениця із високим вмістом амілози NAW. Найменшу пероксидазну активність зафіксовано у проростках озимої м'якої пшениці сортів Чорноброва і Смуглянка та у пшениці ваксі сорту Софійка. Під час порівняння молекулярних форм ферменту виявлено, що у проростках досліджуваних сортів було по 8–9 ізоформ із пероксидазною активністю, які відрізнялися за відносною елек-

трофоретичною рухливістю. Малорухлива ізоформа та ізоформи із відносно швидкою рухливістю були стабільними і зафіксовані в усіх досліджуваних сортів. Виявлені форми із середньою електрофоретичною рухливістю були у 90 % досліджуваних сортів.

Висновки

Отже, електрофоретичні спектри пероксидази у проростках досліджуваних сортів суттєво відрізняються за кількістю та рухливістю її множинних молекулярних форм. Електрофоретичні спектри пероксидази та пероксидазна активність можуть бути використані в якості діагностичних ознак для порівняльного аналізу досліджуваних рослин на ранніх фазах онтогенезу.

Література

1. Тищенко В.Н., Чекалкин Н.М. Генетические основы адаптивной селекции озимой пшеницы в зоне Лесостепи. *Селекция озимой пшеницы с помощью молекулярно-генетических маркеров*: зб. наук. праць. Полтава, 2005. С. 184–203.
2. Марченко М.М., Шелифіст А.Є., Чебан Л.М. Характеристика електрофоретичних спектрів пероксидаз та пероксидазної активності експлантів *Saussurea discolor* (Willd) DC., культивованих in vitro. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2007. Т. 39. С. 419–425.
3. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 128 с.
4. Kay L.E., Basile D.V. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol*. 1987. Vol. 84. P. 99–105.
5. Auxtova O., Cholvodova B., Khandlova E., Samaj J. Isoperoxidase and isopolyphenol oxidase spectra in male and female tissues of *Actinidia deliciosa* in vitro. *Biol. Physiol*. 1994. Vol. 36. P. 535–541.
6. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск: Наука, СО, 1986. 143 с.
7. Титов А.Ф. Полиморфизм ферментных систем и устойчивость растений к экстремальным (низким) температурам. *Успехи совр. биологии*. 1978. Т. 85 (1). С. 63–68.
8. Конарев В.Г. Белки растений как генетические маркеры. М.: Колос, 1983. 320 с.
9. Марченко М.М., Шелифіст А.Є., Чебан Л.М. Характеристика електрофоретичних спектрів естераз експлантів *Saussurea discolor* (Willd) DC. та *Saussurea porcii* Degen. *Біотехнологія*. 2011. Т. 4. С. 86–91.
10. Нецветаев В.П. К особенностям выявления изоэнзимов пероксидазы и их генетический контроль у ячменя. *Генетика*. 2008. Т. 44. С. 1287–1288.
11. Smith H.H., Hamill D.E., Waever E.A., Tompson K.H. Multipler molecular forms of peroxidases and esterases among *Nicotiana* species and amphiploids. *Plant Physiol*. 1976. Vol. 57. P. 203–212.
12. Egley G.H., Paul R.N., Vaughn K.C., Duke S.O. Role of peroxidase in the development of water impermeable seed coats in *Sida sprinosa* L. *Planta*. 1983. Vol. 157. P. 224–232.
13. Bradford M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising: the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
14. Davis B.I. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.I. Acad. Sci*. 1964. Vol. 121 (2). P. 404–427.
15. Lemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
16. Сафонов В.И., Сафонова М.Р. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле. *Биохимические методы в физиологии*. М.: Наука, 1971. 113 с.
17. Рибалка О.І. Якість пшениці та її поліпшення. К.: Логос, 2011. 495 с.
18. Sestili F., Janni M., Doherty A. Botticella E., D'Ovidio R., Masci S., Jones H.D., Lafiandra D. Research article increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes. *Plant Biology*. 2010. Vol. 10 (144). P. 1–12.

References

1. Tishchenko V.N., Chekalkin N.M. Genetic bases of adaptive selection of winter wheat in the forest-steppe zone. *Selection of winter wheat using molecular genetic markers*: Zb. sciences Works. Poltava, 2005. P. 184–203.
2. Marchenko M.M., Shelifist A.E., Cheban L.M. Characterization of electrophoretic spectra of peroxidases and peroxidase activity of *Saussurea discolor* (Willd) DC. Explants cultured in vitro. *Physiology and biochemistry cult. Plants*. 2007. Vol. 39. P. 419–425.
3. Andreyeva V.A. Enzyme peroxidase: Participation in the protective mechanism of plants. Moscow: Nauka, 1988. 128 s.

4. Kay L.E., Basile D.V. Specific peroxidase isoenzymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.* 1987. Vol. 84. P. 99–105.
5. Auxtova O., Cholvodova B., Khandlova E., Samaj J. Isoperoxidase and isopolyphenol oxidase spectra in male and female tissues of *Actinidia deliciosa* in vitro. *Biol. Physiol.* 1994. Vol. 36. P. 535–541.
6. Levites E.V. Genetics of plant isoenzymes. Novosibirsk: Science, CO, 1986. 143 s.
7. Titov AF Polymorphism of enzyme systems and plant resistance to extreme (low) temperatures. *Usp. Sovr. biology.* 1978. T. 85 (1). S. 63–68.
8. Konarev V.G. Plant proteins as genetic markers. M.: Kolos, 1983. 320 s.
9. Marchenko M.M., Shelifist A.E., Cheban L.M. Characterization of electrophoretic spectra of *Esuresira* explants *Saussurea discolor* (Willd) DC. and *Saussurea porcii* Degen. *Biotechnology.* 2011. Vol. 4. S. 86–91.
10. Neetsvetayev V.P. On the features of detection of isoenzymes peroxidase and their genetic control in barley. *Genetics.* 2008. Vol. 44. P. 1287–1288.
11. Smith H.H., Hamill D.E., Waever E.A., Tompson K.H. Multipler molecular forms of peroxidases and esterases among *Nicotiana* species and amphiploids. *Plant Physiol.* 1976. Vol. 57. P. 203–212.
12. Egly G.H., Paul R.N., Vaughn K.C., Duke S.O. Role of peroxidase in the development of water impermeable seed coats in *Sida sprinosa* L. *Planta.* 1983. Vol. 157. P. 224–232.
13. Bradford M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilising: the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72. P. 248–254.
14. Davis B.I. Disc electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. I. Acad. Sci.* 1964. Vol. 121 (2). P. 404–427.
15. Lemmly U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 680–685.
16. Safonov VI, Safonova M.R. Investigation of proteins and plant enzymes by electrophoresis in a polyacrylamide gel. *Biochemical methods in physiology.* M.: Nauka, 1971. 113 s.
17. Ribalka O.I. Yakist pshenytsi ta yii polipshennia. K.: Logos, 2011. 495 s.
18. Sestili F., Janni M., Doherty A. Botticella E., D'Ovidio R., Masci S., Jones H.D., Lafiandra D. Research article increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the *SBEIIa* genes. *Plant Biology.* 2010. Vol. 10 (144). P. 1–12.

MAMENKO T.P., SIRANT L.V., DIKUN M.O., POCHINOK V.M.

Institute of Plant Physiology and Genetics of Natl. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 03022, Kiev, Vasylykivskaya str., 31/17, e-mail: t_mamenko@ukr.net

ELECTROPHORETIC SPECTRA AND ACTIVITY OF PEROXIDASE IN WINTER PLANTS OF DIFFERENT VARIETIES

Aim. To study electrophoretic spectra and activity of peroxidase in seedlings of wheat varieties, which differ in genetically determined characteristics. **Methods.** Biochemicals using a native gel-electrophoresis and a spectrophotometer. **Results.** Among the studied varieties, the highest peroxidase activity in seedlings varied winter wheat varieties of As-tarta, spruce sparrows Polba Golikovskaya and high-amylose wheat HAW. When comparing the molecular forms of the enzyme, it was found that in the seedlings of the studied varieties there were 8–9 isoforms with peroxidase activity, which differed in relative electrophoretic mobility. Inactive isoforms and isoforms with relatively fast mobility were stable and recorded in all studied varieties. The revealed forms with average electrophoretic mobility were in 90 % of the studied varieties. **Conclusions.** Electrophoretic spectra of peroxidase in seedlings of the studied varieties differ significantly in number and mobility of its multiple molecular forms. Electrophoretic spectra and activity of peroxidase can be used as diagnostic features for comparative analysis of the studied plants in the early phases of ontogeny. **Keywords:** peroxidase, electrophoretic spectra, varieties, wheat (*Triticum* L.).