

ТИХОНОВ П. С.^{1,2✉}, МОЛОДЧЕНКОВА О. О.¹, МОЦНИЙ І. І.¹, КАРТУЗОВА Т. В.¹¹ Селекційно-генетичний інститут-Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України,

Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, ORCID: 0000-0001-8738-7946, 0000-0003-2511-0866, 0000-0002-1812-9481, 0000-0003-4122-7298

² Одеський державний аграрний університет,

Україна, 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 99

✉ pavth@ukr.net

МІНЛИВІСТЬ ІЗОФЕРМЕНТІВ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ В СОРТІВ ТА ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, ЩО РІЗНЯТЬСЯ ЗА СТІЙКІСТЮ ДО ПОСУХИ

Мета. Вивчити мінливість компонентного складу ізоферментів супероксиддисмутази (СОД) за впливу гіпертермії та водного дефіциту у різних за стійкістю до посухи інтрогресивних ліній пшениці. **Методи.** Активність ізоформ СОД визначали за допомогою нативного електрофору в кислому середовищі в поліакриламідному гелі. **Результати.** За дії стресових факторів (підвищена температура, водний дефіцит та їх спільний вплив) у проростках пшениці стійких та сприйнятливих до посухи генотипів спостерігався перерозподіл відносного вмісту окремих ізоформ СОД у порівнянні з вирощуванням за сприятливих умов. Найбільш суттєве зменшення відбувалося за спільної дії водного дефіциту і підвищеної температури. За цих умов практично зникали ізоформи ензим середньої електрофоретичної рухливості. **Висновки.** Наявність низькорухливих ізоформ СОД в проростках пшениці за дії стресових факторів (підвищена температура та водний дефіцит) може слугувати індикаторною ознакою посухостійкості рослин пшениці.

Ключові слова: ізоферменти супероксиддисмутази, інтрогресивні лінії пшениці.

Однією з реакцій рослин на дію несприятливих факторів навколишнього середовища є утворення активних форм кисню (АФК) [1–3]. Нейтралізація активних форм кисню може здійснюватися ензиматичними антиоксидантами (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза, глутатіонпероксидаза та ін.) та неензиматичними (каротиноїди, токофероли, флавоноїди та ін.). Ключовим ензимом антиоксидантного захисту є СОД (КФ 1.15.1.11), яка виконує роль первинного кордону проти АФК. Таку функцію СОД пов'язують з тим, що цей ензим опосередковано зменшує ймовірність утворення

гідроксильних радикалів, синглетного кисню, пероксинітриду та інших АФК, які в силу високої реакційної здатності не можуть бути видалені білковими каталізаторами. СОД каталізує реакцію диспропорціонування супероксидних аніон-радикалів до молекулярного кисню та пероксиду водню. СОД представлена значною кількістю молекулярних форм. У їх активних центрах можуть бути такі метали, як Cu, Zn, Mn, Fe. Ізоформи СОД відрізняються за молекулярною масою, чутливістю до інгібіторів, локалізацією в рослинній клітині [4]. Встановлені чіткі відмінності за компонентним складом кореневої СОД у сортів ярого ячменю, що відрізняються за комплексною посухо-, соле- та кислотостійкістю [5]. Виявлено, що ізоферменти СОД будь-якої рослини можна використовувати як стабільний маркер стресостійкості рослини [6]. У зв'язку з цим дослідження ролі СОД у стійкості до біотичного та абіотичного стресу є дуже актуальним. Метою дослідження було вивчити мінливість компонентного складу ізоферментів СОД за впливу гіпертермії та водного дефіциту у різних за стійкістю до посухи генотипів пшениці.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були проростки сортів та поліпшених інтрогресивних ліній пшениці м'якої озимої (*Triticum aestivum* L.), отримані в результаті гібридизації первинних інтрогресивних ліній і амфіплоїдів за участю *Aegilops tauschii* Coss. з сучасними сортами селекції СГІ–НЦНС, що відрізнялися за рівнем стійкості до грибних хвороб та посухостійкості.

Проростки вирощували у чашках Петрі на фільтрувальному папері в темряві за температури +25° С та оптимального зволоження упродовж 7 діб. Перед пророщуванням зерно стерилізували.

© ТИХОНОВ П. С., МОЛОДЧЕНКОВА О. О., МОЦНИЙ І. І., КАРТУЗОВА Т. В.

лізували в розчині $KMnO_4$, промивали дистильованою водою. Водний дефіцит створювали перенесенням проростків на 10 % ПЕГ (6000) та в камеру з вологістю повітря 35–40 %.

Гіпертермію створювали розміщенням проростків у термостаті при 42°C. Тривалість дії водного дефіциту і гіпертермії – 6 годин.

Активність ізоформ СОД визначали за допомогою нативного електрофорезу в поліакриламідному гелі [7].

Як посухостійкі форми використовували сорти стандарти Куяльник та Антонівка, як нестійкі – сорт стандарт Панна та лінію АІЛ347/18 (табл.).

Екстрацію білків з рослинного матеріалу проводили 0,1М К-фосфатним буфером рН 8,2. Надосадову рідину після центрифугування при 10 тис. г протягом 5 хвилин використовували як екстракт СОД [5].

Для виявлення компонентів СОД після

електрофорезу гелі інкубували у 100 мл 1 М трис-НСІ буферу рН 8,2, що містив 10 мг нітросинього тетразолію, 75 мг ЕДТА-На, 3 мг рибофлавіну упродовж 30 хвилин у темряві. Потім гель витримували при ультрафіолетовому випромінюванні приблизно 10 хвилин до появи світлих смуг на фіолетовому фоні.

Результати та обговорення

Електрофореграми СОД показали наявність окремих ізоформ різної рухливості в поліакриламідному гелі. Загальна кількість компонентів коливалася від 7 до 10 залежно від зразка. Найбільш насиченою була низькорухлива зона спектру, що налічувала 5–7 компонентів. Відмінності в електрофоретичних спектрах між окремими сортами і лініями пшениці, що вирощені за сприятливих температурних умов (+25°C) та оптимальному зволоженні, не спостерігалися (рис. 1).

Таблиця. Список інтрогресивних ліній та сортів стандартів (Урожай 2020 р., ділянки 10 м², «Дачна»)

№	№ Т 2020	№ Т 2019	№ М 2018	Лінія*	Походження**	***	Lr	Sr	Ур./10 м ²	МТЗ, г	Б, %	Іпс, %	Посухостійкість
1	711	511	St	К _y	Куяльник (стандарт)	Lr3	4	3	51,4	38,5	11,4	25,3	+
2	721	621	St	Ан	Антонівка (стандарт)	Lr3	3	2	46,1	37,4	11,0	33,4	+
3	713	1947	652	PII.652/18	Селянка/ES17 F ₂ //Од.267 F ₄ /3/Гурт F ₄ (169ф-3/17)	Sr8 Pc	7	7	45,7	38,5	11,3	33,2	+
4	714	1960	929	E2776/14	Віген/Од.267//Селянка F ₆ (V=1730) Yr6	Lr6 Sr6	4	3	52,1	33,7	13,2	24,4	+
5	703	1911	347	AIL347/18	Куяльник/4/(Од.267//H7 4/90-245//Од.267 ⁴ /3/Селянка F ₇) F ₆ Pm6	Lr7 Yr7Sr8	7	7	35,6	37,6	11,5	50,7	-
6				П	Панна								-

Примітки: * E – Еритроспермум, PII – примітивна інтрогресивна лінія, AIL – удосконалена інтрогресивна лінія. ** H74/90-245 – Tom Pouce Blanc / АД (*Triticum timopheevii* Zhuk. × *Ae. tauschii* ssp. *Strangulata*) // Аврора /3/ Русалка, ES17 – *Triticum durum* Desf. / *Ae. tauschii*. *** Pc – червоний колір стебла; Pm, Lr, Yr, Sr – стійкість (бал), відповідно, до борошнистої роси, листової, жовтої і стеблової іржі; Ур. – урожайність, ц/га; МТЗ – маса 1000 зерен, г; Б – вміст білка, %; Іпс – Індекс посухо-стійкості, %.

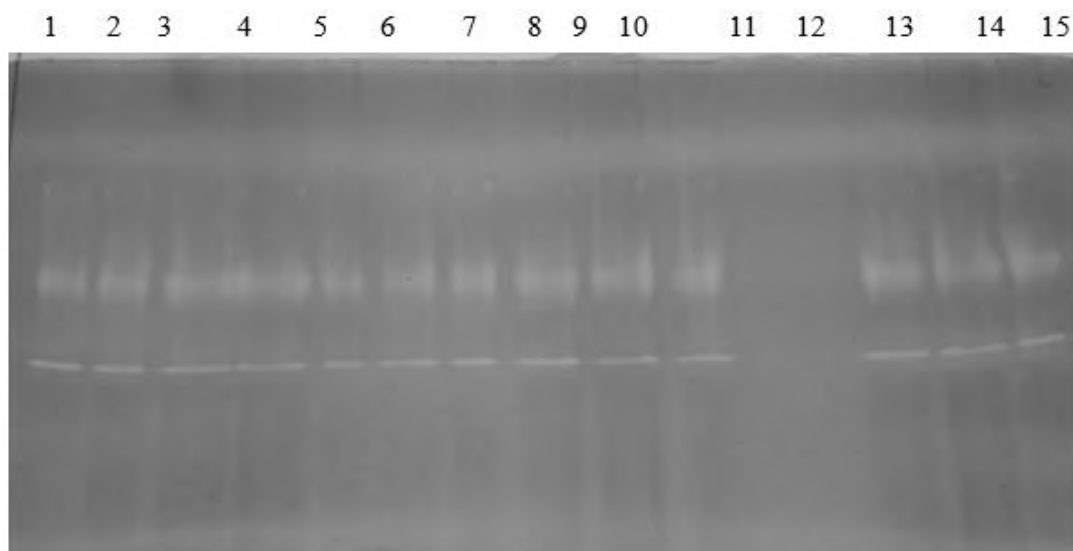


Рис. 1. Ізоферментний спектр СОД проростків інтрогресивних ліній і сортів стандартів пшениці м'якої озимої. Треки зліва направо: 1–3 Куяльник, 4–6 Панна, 7–10 Антонівка, 11, 12 пусті треки, 13–15 лінія АІЛ347/18.

За дії стресових факторів (підвищена температура — 42°C, водний дефіцит та їх спільний вплив) в проростках пшениці стійких та сприйнятливих до посухи сортів спостерігається перерозподіл відносного вмісту окремих ізоформ СОД. Так, у посухостійкого сорту Куяльник зменшується відносний вміст всіх ізоформ ферменту. Причому найбільш суттєве зменшення відбувається за спільної дії водного дефіциту і

підвищеної температури. За цих самих умов практично зникають ізоформи ферменту середньої рухливості (рис. 2).

За дії зазначених несприятливих факторів на проростки сприйнятливо до посухи сорту пшениці Панна вплив на вміст окремих ізоформ СОД є більш значним, ніж у посухостійкого сорту Куяльник.

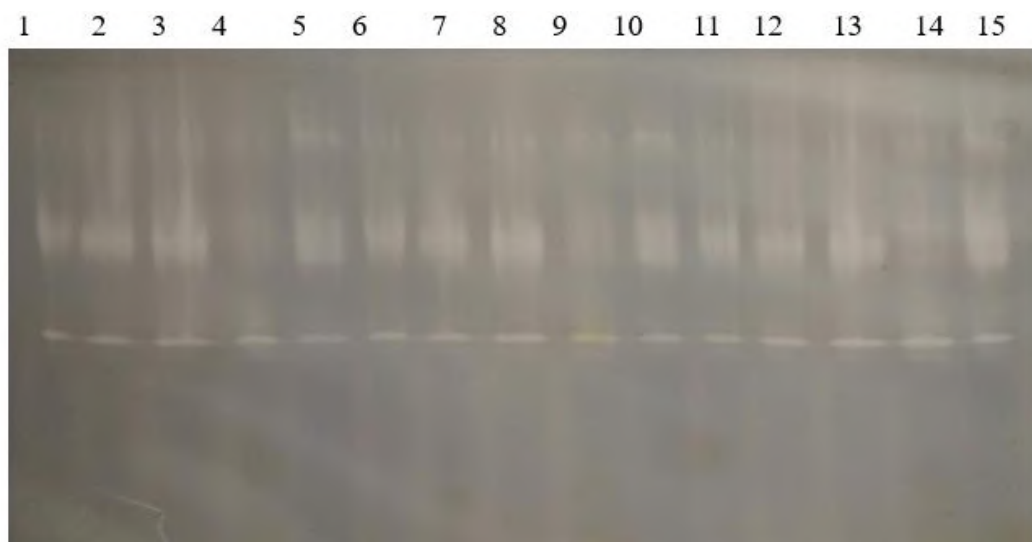


Рис. 2. Компонентний склад ізоферментів СОД за впливу гіпертермії та водного дефіциту у різних за стійкістю до посухи сортів пшениці м'якої озимої. Треки зліва направо: 1, 2 – Панна, тепловий шок; 3 – Панна, водний дефіцит; 4 – Панна, одночасний вплив водного дефіциту та температурного шоку; 5 – Куяльник, контроль; 6 – Куяльник, тепловий шок; 7 – Куяльник, водний дефіцит; 8 – Куяльник, тепловий шок; 9 – Куяльник, одночасний вплив водного дефіциту та температурного шоку; 10 – Панна, контроль; 11, 12 – Панна, тепловий шок; 13 – Панна, водний дефіцит; 14 – Панна, одночасний вплив водного дефіциту та температурного шоку; 15 – Панна, контроль.

Вміст ізоформ низької та середньої електрофоретичної рухливості значно зменшується, а найбільш низькорухливі ізоформи геть зникають. Найбільш значний вплив у цьому випадку спричиняють водний дефіцит та спільна дія водного дефіциту і підвищеної температури (рис. 2).

У рослинах пшениці ізогенної лінії NIL6B13, що вирощені за польових умов і не уражені патогенами, виявлений схожий електрофоретичний спектр СОД. Проте в цих зразках спостерігається кількісне перерозподілення окремих компонентів електрофоретичного спектру ферменту. Так, у зернах молочної стиглості у порівнянні з листям тих самих рослин, зменшується відносний вміст низькорухливих компонентів і збільшується високорухливих. У листі рослин одних і тих самих ліній (доповнена лінія O193-3 та ізогенна лінія NIL6B13) та сортів стандартів пшениці (Куяльник, Антонівка, Пана), що були зібрані в різні терміни вегетації (у

травні та червні поточного року) та не уражені патогенами, не спостерігалось суттєвих змін у кількості і співвідношенні окремих ізоформ СОД.

Висновки

За дії стресових факторів (підвищена температура, водний дефіцит та їх спільний вплив) у проростках пшениці стійких та сприйнятливих до посухи генотипів спостерігався перерозподіл відносного вмісту окремих ізоформ СОД. Найбільш суттєве зменшення відбувалося за спільної дії водного дефіциту і підвищеної температури.

Наявність низькорухливих ізоформ СОД у проростках пшениці за дії стресових факторів (підвищена температура та водний дефіцит) може слугувати індикаторною ознакою посухостійкості рослин пшениці.

References

1. Caverzan A., Casassola A., Brammer S. P. Antioxidant responses of wheat plants under stress. *Genet. Mol. Biol.* 2016. 39. P. 1–6.
2. Dumanović J., Nepovimova E., Natić M. et al. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: a concise overview. *Frontiers in Plant Science*. 2021. Vol. 11. Article 552969. doi: 10.3389/fpls.2020.552969.
3. Huang H., Ullah F., Zhou D. X. et al. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. Article 800. doi: 10.3389/fpls.2019.00800.
4. Leonowicz G., Trzebuniak K.F., Zimak-Piekarczyk P., Ślesak I. The activity of superoxide dismutases (SODs) at the early stages of wheat deetiolation. *PLoS One*. 2018. Vol. 13(3). e0194678. doi: 10.1371/journal.pone.0194678.
5. Krestinkov I. S., Netsvetaev V. P., Biriukov S. V. Genotypic variability of root superoxide dismutase in spring barley. *Bulletin of Plant Breeding & Genetics Institute-National Center of Seed and Cultivar Investigation*. 1986. Vol. 57 (4). P. 35–40. [in Ukrainian]
6. Berwal M. K., Ram C. Superoxide dismutase: A stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants. 2018. doi: 10.5772/intechopen.82079.
7. Radyuk M. S., Domanskaya I. N., Shcherbakov R. A., Shalygo N. V. The influence of freezing stress on activity of antioxidant enzymes in barley seedlings. *Plant physiology and genetics*. 2013. Vol. 45 (5). P. 442–450. [in Ukrainian]

ТЯХОНОВ П. С.^{1,2}, МОЛОДЧЕНКОВА О. О.¹, МОТСНИЙ І. І.¹, КАРТУЗОВА Т. В.¹

¹ Plant Breeding & Genetics Institute-National Center of Seed and Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odesa, Ovidiopol'skaya doroga, 3

² Odesa State Agrarian University, Ukraine, 65039, Odesa, Kanatna str., 99

VARIABILITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE ISOENZYMES IN VARIETIES AND INTROGRESSIVE LINES OF WHEAT DIFFERING IN DROUGHT RESISTANCE

Aim. To study the variability of the component composition of superoxide dismutase (SOD) isoenzymes under the influence of hyperthermia and water deficit in introgressive lines of wheat with different drought resistance. **Methods.** The activity of SOD isoforms was determined using native electrophoresis in an acidic medium in a polyacrylamide gel.

Results. Under the impact of stress factors (elevated temperature, water deficit and their combined effects), a redistribution of the relative content of individual SOD isoforms was observed in wheat seedlings of drought-resistant and drought-susceptible genotypes compared to growing under favorable conditions. The most significant decrease occurred due to the joint action of water deficit and increased temperature. Under these conditions, enzyme isoforms of medium electrophoretic mobility practically disappeared. **Conclusions.** The presence of low-mobility isoforms of SOD in wheat seedlings under the impact of stress factors (elevated temperature and water deficit) can serve as an indicator of drought resistance of wheat plants.

Keywords: isoenzymes of SOD, introgressive lines of wheat.