

Спанкулова З.Б., Ли Т.Е.,
Дидоренко С.В.,
Оразбаева У.М.

**Оценка засухоустойчивости
сои по активности ферментов-
антиоксидантов
и альдегидоксидазы**

Spankulova Z.B., Li T.E.,
Didorenko S.V.,
Orazbaeva U.M.

**Evaluation of drought tolerance
of soybean on antioxidant
enzymes and aldehyde**

Спанкулова З.Б., Ли Т.Е.,
Дидоренко С.В.,
Оразбаева У.М.

**Антиоксидант-ферменттер
және альдегидоксидаза
бойынша сояның
құрғақшылыққа төзімділігін
бағалау**

Целью данной работы являлось изучение ферментов-антиоксидантов – пероксидазы (ПОД), супероксиддисмутазы (СОД) и альдегидоксидазы (АО) на уровне энзиматической активности для скрининга засухоустойчивости генотипов сои на ранних этапах онтогенеза.

Объектами исследования служили 4 сортообразца культурной сои *Glycine max* L. из мировой коллекции, по предварительным данным обладающие признаками засухоустойчивости: сорта Устя (Украина), К 589109 (Россия), К583583 HMAS 84 (США), и относящиеся к ультраскороспелой группе с периодом вегетации 85-95 дней. В качестве стандарта был использован сорт отечественной селекции скороспелый Алматы.

Определение ферментативной активности СОД, ПОД и АО в листьях сои было проведено в условиях полива и засухи в двух репродуктивных фазах вегетации, наиболее чувствительных к дефициту влаги – в фазе цветения R1 и налива бобов R5.

По результатам определения ферментативной активности СОД, ПОД и АО наибольшую засухоустойчивость проявили казахстанский сорт Алматы и К583583 (США).

Ключевые слова: индексы засухоустойчивости, активные формы кислорода, ферменты-антиоксиданты, альдегидоксидаза.

The aim of this study was to investigate the expression of antioxidant enzymes – peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD), aldehyde oxidase (AO) at the level of enzyme activity in order to increase the efficiency of breeding drought-tolerant soybean genotypes.

We have studied the cultivated soybean *Glycine max* L. of the world collection according to the preliminary data having signs of drought resistance: vr. Ustyia (Ukraine), K589109 (Russia), K583583 HMAS 84 (USA) and related to early maturing group with vegetation period of 85-95 days. The standard used was variety of domestic breeding – Almaty.

Determination of the enzymatic activity of SOD, POD and AO in the leaves of soybean was conducted under irrigation and drought in two reproductive phases of vegetation, the most sensitive to moisture deficit – in the flowering stage R1 and bean filling R5.

Screening of the enzymatic activity of SOD, POD and AO showed the distinct correlation links between activity and drought tolerance in Almaty (Kazakhstan) and K583583 (USA) varieties.

Key words: drought resistance indices, reactive oxygen species, antioxidant enzymes, aldehyde oxidase.

Осы жұмыстың мақсаты соя генотиптерінің құрғақшылыққа төзімділігін онтогенездің ерте сатысында скринингтеу үшін энзиматикалық белсенділік деңгейінде антиоксидантты ферменттер – пероксидаза (ПОД), супероксиддисмутаза (СОД) және альдегидоксидазаны (АО) зерттеу болып табылады.

Зерттеу объектісі ретінде әлемдік коллекциядан *Glycine max* L. соя культурасының құрғақшылыққа жоғары төзімділік қасиетіне ие сортүлгілері: Устя (Украина), К589109 (Ресей), К583583 HMAS 84 (АҚШ) алынды. Бұл сорттар ультражылдам пісетін, вегетация кезеңі 85-95 күн болатын топқа жатады. Стандарт ретінде отандық коллекциядан – жылдам пісетін Алматы сорты қолданылды.

Суғарылған және құрғақшылық жағдайындағы соя жапырақтарының СОД, ПОД және АО ферментативті белсенділігін анықтау су жетіспеушілікке аса сезімтал екі репродуктивті фаза – гүлдену R1 және бұршақтануда R5 жүргізілді.

СОД, ПОД және АО ферментативті белсенділігін анықтау нәтижесі қазақстандық Алматы және К583583 (АҚШ) сорттарының құрғақшылыққа төзімді екенін көрсетті.

Түйін сөздер: құрғақшылыққа төзімділік көрсеткіштері, оттегінің белсенді формалары, антоксидант-ферменттер, альдегидоксидаза.

ОЦЕНКА ЗАСУХОУС- ТОЙЧИВОСТИ СОИ ПО АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ- АНТИОКСИДАНТОВ И АЛЬДЕГИДОКСИДАЗЫ

Введение

Растения живут в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, подвергаются действию различных абиотических и биотических факторов природы. Им приходится адаптироваться к этим факторам и формировать механизмы противодействия их негативному влиянию. Засухоустойчивость – это способность растений в условиях засухи с наименьшим ущербом проходить рост и развитие [1].

Соя – сравнительно засухоустойчивая культура. Критический период в водопотреблении приходится на репродуктивные фазы развития – цветение, образование и налив бобов [2]. Известно, что реакция растения на любые отклонения факторов среды от нормы включает специфические и неспецифические ответные реакции. Неспецифической реакцией является образование свободных радикалов и таких активных форм кислорода, как супероксид анион кислорода и перекись водорода, которые вызывают перекисное окисление мембранных липидов, разрушение пигментов и клеточных структур, подавление роста и развития растения. Некоторые авторы обнаружили прямую связь между уровнем индукции антиоксидантной системы и степенью засухоустойчивости растений [3-5].

Таким образом, изучение экспрессии ключевых ферментов перекисного окисления липидов пероксидазы, супероксиддисмутазы и альдегидоксидазы позволит нам раскрыть механизмы адаптации сои к стрессу засухи.

Стресс сопровождается не только чрезмерной генерацией активных форм кислорода (АФК), но и изменением активности ферментов-антиоксидантов в ту или другую сторону. Полагают, что уровень антиоксидантной защиты и способность быстро среагировать на опасную ситуацию увеличением активности ферментов определяют устойчивость растений к стрессу [6-8].

Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) играет важнейшую роль в адапционных ответах растения на стрессы, такие как засуха и засоление. Ключевым ферментом синтеза данного гормона является альдегидоксидаза – катализирующая последний этап синтеза [9].

АО предположительно также вовлечена в биосинтез другого фитогормона – индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) через окисление альдегидоксидазой субстрата индол-3-ацетальдегида [10].

Целью данной работы являлось изучение ферментов-антиоксидантов – пероксидазы, супероксиддисмутазы и альдегидоксидазы на уровне энзиматической активности для скрининга засухоустойчивости генотипов сои на ранних этапах онтогенеза.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 4 сортаобразца культурной сои *Glycine max L.* из мировой коллекции, по предварительным данным обладающие признаками засухоустойчивости: сорта Устя (Украина), К 589109 (Россия), К583583 НМАС 84 (США), и относящиеся к ультраскороспелой группе с периодом вегетации 85-95 дней. В

качестве стандарта был использован сорт отечественной селекции скороспелый Алматы.

Растения выращивали в условиях оранжереи и на приусадебном участке ИББР, теплицы и полях КазНИИЗиР (п. Алмалыбак, Алматинская область). Подобраны оптимальные условия температурного, светового режимов, условий влагообеспечения: оптимальная интенсивность света 60-70³ Лк, температура 21⁰С, световой период 17 часов с использованием специальных ламп накаливания, полив до 50% полевой влагоемкости.

Почвенную засуху моделировали путем прекращения полива, степень воздействия стрессорного фактора оценивали по содержанию влаги в почве с помощью влагомера (рисунок 1 А, Б).

Симулирование первого стресса по недостатку влаги для сои было проведено перед периодом начало цветения (R1), второй стресс по недостатку влаги был организован перед периодом налив бобов (R5).



А



Б

Рисунок 1 – Содержание влаги в почве при поливе (А) и в процессе развития засухи (Б) до момента отбора образцов сои

Образцы растений были отобраны на физиолого-биохимические анализы при появлении первых признаков увядания на 10 день развития стресса засухив двух репродуктивных фазах вегетации, наиболее уязвимых к дефициту влаги – в фазе цветения (R1) и налива бобов (R5).

Определение активности СОД было проведено по Beauchamp et. al. [11].

Определение активности ПОД проводили согласно методу Лебедева и др. [12].

Нативный ЭФ протеинов АО проводился с индол-3-ацетальдегидом в качестве субстрата с образованием индолил-3-уксусной кислоты. АО активность оценивалась на базе восстановления

метил тиазолилдифенил-тетразолиум бромид (МТТ) по развитию специфических бендов формазана. Альдегидоксидазная активность в образцах определялась по методу Rothe [13].

Нативный электрофорез проводился в 7,5% ПААГ в буферной системе по Laemmli [14] в отсутствии SDS при 4⁰С.

Содержание белка анализировали по методу Лоури [15].

Результаты и их обсуждение

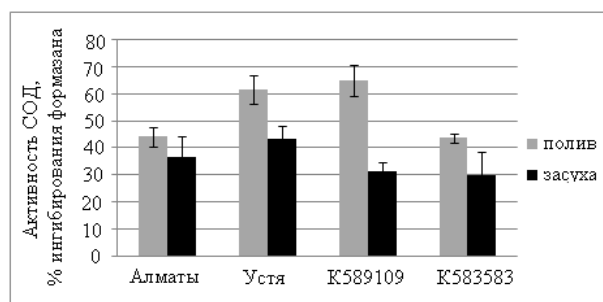
Определение ферментативной активности СОД, ПОД и АО в листьях сои было проведено в

условиях полива и засухи в двух репродуктивных фазах вегетации, наиболее чувствительных к дефициту влаги – в фазе цветения R1 и налива бобов R5.

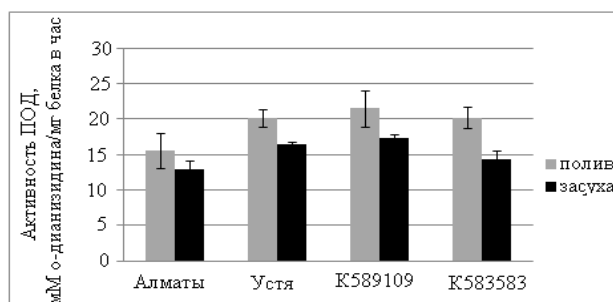
Биохимическое определение ферментативной активности СОД у сортообразцов сои показало, что в фазе цветения наблюдалось ее понижение в стрессированных растениях: Алматы, Устя, К583583 ~ 10-20%, К589109 – в 2 раза (ри-

сунк 2 А), а в фазе налива бобов наблюдалось повышение активности СОД: Алматы, К589109, К583583 – 10%, Устя – в 2 раза (рисунок 2 Б).

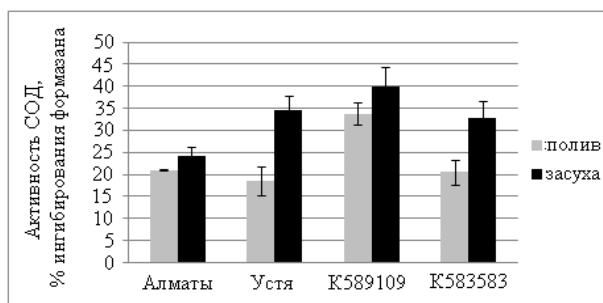
Ферментативная активность ПОД в фазах цветения и налива бобов понижалась в условиях засухи для всех испытанных сортообразцов в большей степени для Алматы и К589109 – в 2 раза (рисунок 3 А, Б).



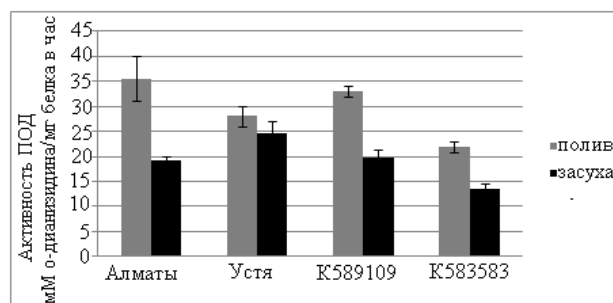
А



А



Б



Б

Рисунок 2 – Активность СОД в листьях сои, выращенных при контрольных (полив) и опытных условиях (засуха): А – в фазе цветения; Б – в фазе налива бобов

Рисунок 3 – Активность ПОД в листьях сои, выращенных при контрольных (полив) и опытных условиях (засуха): А – в фазе цветения; Б – в фазе налива бобов

Биохимическое определение ферментативной активности АО у сортообразцов сои показало наличие двух бендов. Экспрессия верхнего бенда не менялась в стрессированных растениях

и не было заметного различия между образцами. Экспрессия АО была более выраженной у сортов сои во второй фазе развития – фазе налива бобов (Рисунок 4 А,Б).

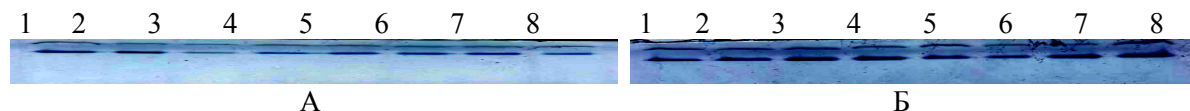


Рисунок 4 – Электрофореграмма АО, выделенной из сои: А – фаза цветения; Б – фаза налива бобов. 1 – Алматы, полив; 2 – Алматы, засуха; 3 – Устя, полив; 4 – Устя, засуха; 5 – К583583, полив; 6 – К583583, засуха; 7 – 589109, полив; 8 – 589109, засуха

Биохимическое определение ферментативной активности СОД показало, что в фазе цветения наблюдалось ее понижение, а в фазе налива бобов, наоборот, наблюдалось повышение активности СОД в стрессированных растениях.

Биохимическое определение ферментативной активности ПОД у сортообразцов сои показало: в фазе цветения и в фазе налива бобов наблюдалось ее понижение у всех стрессированных растениях.

Нативный электрофорез в 7,5% ПААГ обнаружил две изоформы АО у сои. Экспрессия АО была более выраженной, также как и СОД, в фазе налива бобов.

По результатам определения ферментативной активности СОД, ПОД и АО наибольшую засухоустойчивость проявили казахстанский сорт Алматы и K583583(США).

Литература

- 1 Tardieu F. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress // *Comp. Rend. Geosci.* – 2005. – Vol. 337. – P. 57-67.
- 2 Fehr W.R., Caviness C.E., Burmood O.T. and Pennington J.S. Stage of development description for soybeans *Glycine max(L.)* // *Merril. Crop Sci.* – Vol.11. – P. 929-931.
- 3 Chaves M.M., Oliveira M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture // *J.Exp. Bot.* –2004. –V. 55. –No.55. –P.2365-2384.
- 4 Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. – Киев: Основа, 2010. – 351 с.
- 5 Maevskaya S.N., Nikolaeva M.K. Response of Antioxidant and Osmoprotective Systems of Wheat Seedlings to Drought and Rehydration. // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 2013.–V. 60. – No.3. –P.351–359.
- 6 Varga B., Janda T., La'szlo' E., Veisz O. Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals. // *Acta-Physiol Plant.* –2012.–Vol.34. –P.849–858.
- 7 Helena M. Carvalho C. Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling // *Plant Signal Behav.* – 2008. – Vol. 3. – P.156-165.
- 8 Suzuki N, Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant.* – 2006. – Vol. 126. – P. 45-51.
- 9 Walker-Simmons M., Kudrna D.A., Warner RL. Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley // *Plant Physiol.* –1988. –Vol. 90. – P. 728-733
- 10 Koshiha T., Saito E., Ono N., Yamamoto N., Sato M. Purification and properties of flavin and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize // *Plant Physiol.* –1996. – Vol.110. – P.781-789.
- 11 Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels // *Anal. Biochem.* –1971. – Vol. 44. – P. 276-287.
- 12 Лебедева О.В., Угарова Н.Н., Березин И.В. Кинетическое изучение реакции окисления о-дианизидина H₂O₂ в присутствии пероксидазы хрена // *Биохимия.* –1977.–Т.42. – С.1372-1379.
- 13 Rothe G.M. Aldehyde oxidase isoenzymes (EC 1.2.3.1) in potato tubers (*Solanum tuberosum*). // *Plant Cell Physiol.* – 1974. – Vol.15.–P.493-499.
- 14 Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature.* –1970. –Vol.4. – №227. – P. 680-685.
- 15 Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A.Lewis Farr and Rose J. Randall Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* –1951. –Vol. 193. – P. 265-275.

References

- 1 Tardieu F. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress // *Comp. Rend. Geosci.* – 2005. – Vol. 337. – P. 57-67.
- 2 Fehr W.R., Caviness C.E., Burmood O.T. and Pennington J.S. Stage of development description for soybeans *Glycine max(L.)* // *Merril. Crop Sci.* – Vol.11. – P. 929-931.
- 3 Chaves M.M., Oliveira M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture // *J.Exp. Bot.* –2004. –V. 55. –No.55. –P.2365-2384.
- 4 Kolupaev Y.E., Karpets Y.V. Formation of adaptive responses of plants to abiotic stressors action. –Kiev: Osнова, 2010. – 351 p.
- 5 Maevskaya S.N., Nikolaeva M.K. Response of Antioxidant and Osmoprotective Systems of Wheat Seedlings to Drought and Rehydration. // *Russian Journal of Plant Physiology.* – 2013.–V. 60. – No.3. –P.351–359.
- 6 Varga B., Janda T., La'szlo' E., Veisz O. Influence of abiotic stresses on the antioxidant enzyme activity of cereals. // *Acta-Physiol Plant.* –2012.–Vol.34. –P.849–858.
- 7 Helena M. Carvalho C. Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling // *Plant Signal Behav.* – 2008. – Vol. 3. – P.156-165.

- 8 Suzuki N, Mittler R. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction // *Physiol. Plant.* – 2006. – Vol. 126. – P. 45-51.
- 9 Walker-Simmons M., Kudrna D.A., Warner RL. Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley // *Plant Physiol.* –1988. – Vol. 90. –P. 728-733
- 10 Koshiba T., Saito E., Ono N., Yamamoto N., Sato M. Purification and properties of flavin and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize // *Plant Physiol.* –1996. – Vol.110. –P.781-789.
- 11 Beauchamp C., Fridovich J. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels // *Anal. Biochem.* –1971.–Vol. 44. –P. 276-287.
- 12 Lebedev O.V., Ugarov N.N., Berezin I.V. Kinetic study of the oxidation reaction of o-dianisidine in the presence of H₂O₂ horseradish peroxidase // *Biochemistry.* – 1977. – Vol.42.– P.1372-1379.
- 13 Rothe G.M. Aldehyde oxidase isoenzymes (EC 1.2.3.1) in potato tubers (*Solanum tuberosum*). // *Plant Cell Physiol.* –1974.– Vol.15.–P.493-499.
- 14 Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature.* –1970. –Vol.4. – №227. –P.680-685.
- 15 Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A.Lewis Farr and Rose J. Randall Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* –1951. –Vol.193. – P. 265-275.