

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

УДК 581.19:631.524.86

ВАРІОВАННЯ АКТИВНОСТІ КАТАЛАЗИ У РІЗНИХ ЗА СТІЙКІСТЮ ДО ВОВЧКА (*OROBANCHE CUMANA* WALLR.) ЗРАЗКІВ СОНЯШНИКУ

Т. Чигрин, О. Задорожна

*Інститут рослинництва імені В.Я. Юр'єва
пр. Московський, 142, Харків 61060, Україна
e-mail: olzador@ukr.net*

Активність каталази (КАТ) (КФ1.11.1.6) досліджених зразків соняшнику (*Helianthus annuus* L.) перевищувала цей показник у стандарту сприйнятливості до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.). За інокуляції зразків у більшості випадків спостерігали збільшення активності каталази. Активність КАТ варіює залежно від генотипу зразка. Гетерозис за активністю каталази спостерігали лише в окремих комбінаціях у гібридів Сх1012А/Х536В, Сх2111А/Х711В. Закономірного зв'язку між наявністю гена Og_5 і активністю каталази не виявлено.

Ключові слова: *Helianthus annuus*, *Orobanche cumana*, стійкість, активність каталази, генотип.

Під час впливу різних патогенів на рослини відбувається активація окисно-відновних процесів, що супроводжується утворенням пероксиду водню та інших активних форм кисню. Рослина має фізіологічну антиоксидантну систему, до складу якої входять окисно-відновні ферменти поліфенолоксидаза, пероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза та інші. Ця система має важливе значення в захисних реакціях рослин проти патогенів. Унаслідок функціонування цієї системи утворюються захисні сполуки і формується системний імунітет [9]. Розпізнавання патогенів включає в себе низку індуючих захисних механізмів, які роблять свій вклад у стійкість рослин. У місці інфікування відбувається синтез антимікробних речовин, фітоалексинів, синтез гідролітичних ферментів, які атакують патогени [19]. Такі реакції відбуваються внаслідок транскрипційної активності генів, які відіграють певну роль у захисті рослин. Стійкість рослин до патогенів часто залежить від можливості рослини відреагувати на ранніх етапах інфікування з утворенням некрозу тканин, який обумовлений головним чином хінонами (окисненими фенолами) [22]. Швидкість окиснення фенолів обумовлюється активністю ферментів, зокрема поліфенолоксидази (ПФО) (КФ 1.10.3.1) та пероксидази (ПОД) (КФ 1.11.1.7). Відомі роботи з визначення активності поліфенолоксидази соняшнику залежно від стійкості до патогенів [5] і паразитів [11]. Стійкі форми соняшнику, як правило, мають вищі показники активності цього ферменту. У ПОД також більш високі показники активності у стійких генотипів пшениці, ячменю, овочевих та інших культур [2, 11]. Активність пероксидази змінюється залежно від стійкості генотипу. У стійких зразків під впливом патогена активність пероксидази збільшується, а у сприйнятливих не змінюється або навіть зменшується [1, 12, 14, 16].

Відповідь рослин на біотичний і абіотичний стрес супроводжується вивільненням активних форм кисню, включаючи перекис водню, який виконує певні захисні функції. Підтримання певного гомеостазу активного кисню під час біотичного й абіотичного стресу відбувається за допомогою каталази (КАТ) (КФ1.11.1.6). Відомо, що активність каталази

вища у стійких зразків [21]. Активність каталази соняшнику під час біогічного стресу вивчена дуже обмежено.

Відомо, що активність каталази соняшнику (*Helianthus annuus* L.) варіює залежно від патогена [14]. Так при тривалому впливі збудника несправжньої борошнистої роси (*Plasmopara helianthi* Novot. f. *helianthi*) активність каталази поступово збільшується і перевищує показники здорових рослин. При інфікуванні збудником іржі (*Puccinia helianthi* Schw.) інокульовані зразки мають менші показники активності каталази, ніж контрольні. Під час інокуляції активність каталази збільшувалася. При інфікуванні рослин збудником сірої гнилі (*Phomopsis helianthi* Munt.) спостерігається спочатку збільшення, а потім зменшення активності каталази.

Крім зазначених патогенів соняшнику, слід зазначити шкідливий голопаразит вовчок (*Orobanchе cumanа* Wallr.). Втрати врожаю насіння соняшнику, внаслідок ураження вовчком, становлять 50–90% як у країнах Середземномор'я, так і у країнах Східної Європи [7, 16]. Для диференціації стійких і нестійких до вовчка генотипів використовуються різні вегетаційні, біохімічні, гістологічні та молекулярні методи [10]. Очікується можливість диференціації зразків соняшнику за стійкістю до вовчка й активністю окисно-відновних ферментів, зокрема ПФО, ПОД, КАТ. Відомо про різну активність ПФО, ПОД у різних за стійкістю ліній і гібридів соняшнику [11,12].

У зв'язку з цим метою нашої роботи було визначити активність каталази у ліній і гібридів соняшнику, різних за стійкістю до вовчка, та спробувати диференціювати зразки за цими показниками.

Матеріали та методи

Матеріалом для досліджень були лінії соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН: стерильні материнські (♀) Сх503А, Сх908А, Сх1002А, Сх1006А, Сх1010А, Сх1012, Сх2111А, Сх2552А, Сх4021А, фертильні батьківські (♂) Х114В, Х526В, Х711В, Х720В, Х762В, Х908В, PR64А71 та гібриди Сх503А/Х114В, Сх908А/Х762В, Сх1006А/Х720В, Сх1012А/Х526В, Сх2111А/Х711В. Лінії характеризувалися різною стійкістю до вовчка за даними вегетаційного аналізу [6, 7] та відрізнялися за наявністю генів стійкості до п'яти рас вовчка Og_5 [4].

Активність каталази визначали у проростків із тривалістю вегетації 14 діб. Проростки отримували шляхом пророщування насіння в умовах штучного клімату при освітленні 4000 лк, світловому періоді 16 год на добу і температурі $24\pm 2^\circ\text{C}$. Досліджували проростки, одержані з насіння, висіяного разом із насінням вовчка (інокульовані) та проростки, одержані з насіння, висіяного без нього (контроль).

У дослід добирали проростки довжиною близько 15 см. Брالی наважку 500 мг зеленого матеріалу та розтирали у фарфоровій ступці з 0,06 М фосфатним буфером (рН 7,0). Отриману ферментну витяжку центрифугували 10 хв при 5000 об/хв на центрифугу ЦУМ-1 (Завод фізичних приладів, Киргизька РСР) і аналізували активність каталази фотокolorиметричним методом [20] на фотоелектроcolorиметрі КФК-2-УХЛ 4.2 (РРФСР) при довжині хвилі 405 нм. У кювету вносили 0,2 мл ферментної витяжки, 2 мл реакційної суміші, що містила 0,06 М фосфатного буферу, рН 7,0 та 0,06 М розчин перекису водню у співвідношенні 1:1. Кювету інкубували 10 хв при 37°C на водяній бані, після чого додавали 1 мл 4% розчину молібдату амонію для зупинки реакції. Вимірювання проводили проти контролю реактивів. Активність КАТ визначали в умовних одиницях на г сірої тканини (ум.од./г тк.) та обробляли стандартними методами варіаційної статистики [3].

Результати і їхнє обговорення

За результатами досліджень встановлено різну активність каталази у ліній та гібридів соняшнику (табл. 1).

Активність каталази у більшості материнських і батьківських ліній достовірно відрізнялася від стандарту сприйнятливості. Після інокуляції у більшості зразків спостерігали тенденцію до збільшення активності каталази або достовірне її збільшення (у ліній Сх503А, Сх1006А, Сх2111А, Х526В). Міра збільшення активності каталази при інокуляції становила від 12 до 130% (табл. 1). Слід зазначити, що міра збільшення активності каталази не залежала від наявності гена Or_5 , що характеризує стійкість до п'яти рас вовчка і показника стійкості, визначеного вегетаційним методом. Це свідчить про те, що наявність гена Or_5 не може характеризувати стійкість до всіх рас вовчка та інших патогенів, і що стійкість, визначена вегетаційним методом, не завжди збігається з потенційною стійкістю даного зразка.

Аналіз активності каталази у гібридів F_1 виявив гетерозис лише у гібридів Сх1012/Х526В, Сх2111/Х711В. Інформація про активність окисно-відновних ферментів ліній порівняно з гібридами дуже обмежена [13, 15]. У більшості випадків в цих дослідженнях спостерігали гетерозис за показниками активності ферментів. На думку дослідників, це дає можливість прогнозувати стійкість рослин до негативних чинників [18].

Таблиця 1

Активність каталази у ліній і гібридів соняшнику (ум.од./г тк.)

Назва лінії, ♀, ♂, гібриду	Стійкість, визначена вегетаційним методом	Наявність інформації про ген Or_5	Активність КАТ зразків, ум.од./г тк.		Зміна активності КАТ інокульованих зразків, %
			контрольних	інокульованих	
Сх503А	середня	or_5	6,3±0,5*	8,8±0,5*.*	+40
Х114В	середня	or_5	3,4±0,5*	4,3±0,5*	+26
Сх503А/Х114В (Борей)			3,2±0,4*	2,7±0,5	-15
Сх908А	низька	or_5	2,0±0,4	3,1±0,5	+48
Х762В	висока	or_5	7,7±2,0*	4,5±0,6*	-6
Сх908А/Х762В (Кий)			4,6±0,5*	5,6±0,7*	+21
Сх1006А	висока	$Or_5 or_5$	2,6±0,4	6±0,7*.*	+130
Х720В	висока	$Or_5 or_5$	7,1±1,3*	8,0±0,6*	+12
Сх1006А/Х720В (Оскіл)			3,1±0,3*	3,5±0,5	+13
Сх1012А	середня	or_5	2,7±0,6	3,6±0,7*	+33
Х526В	висока	$Or_5 or$	1,9±0,3	3,5±0,4*.*	+84
Сх1012А/Х526В (Сайт)			6,6±0,4*	4,9±0,5*	-26
Сх2111А	середня	or_5	3,4±0,6*	5,8±0,6*.*	+71
Х711В	висока	$Or_5 or$	2,8±0,4	1,3±0,2*	-5,4
Сх2111А/Х711В (Погляд)			6,2±0,5*	6,1±0,6*	-2
Сх2552А	середня	or_5	10,0±0,7*	11,3±0,8*	+13
Сх4021А	середня	or_5	8,8±0,7*	8,2±1,1*	-7
Сх1002А	висока	Or_5	4,0±0,5	4,0±0,8*	0
Сх1010А	середня	or_5	3,5±0,6*	3,6±0,6*	+10
Х908А	ст. сприйн.	or_5	2,0±0,4	3,1±0,5	+55
PR64А71	ст. стійкості	Or_5	5,6±0,6*	6,5±0,7*	16

Примітки: * різниця за показником активності каталази між зразком та стандартом сприйнятливості достовірна при $P<0,05$; ** різниця за показником активності пероксидази між інокульованим та не інокульованим зразком достовірна при $P<0,05$; Or_5 – наявність домінуючого алеля гена Or_5 ; or_5 – наявність рецесивного алеля гена Or_5 .

У наших дослідженнях для всіх гібридних комбінацій гетерозис не спостерігали. На нашу думку, це пояснюється підбором пар для гібридної комбінації, при якому не врахували активність ферментів ліній і нових молекулярних механізмів даних гібридних комбінацій, які обумовлені диференціальною експресією генів, що призводить до фенотипових змін [23].

При аналізі середніх показників активності каталази у досліджених ліній і гібридів спостерігали незначний гетерозис у контрольному варіанті (10%) та проміжне успадкову-

вання в дослідному (рис. 1). За інокуляції спостерігали тенденцію збільшення активності КАТ у материнських форм на 60%, незначне зменшення у батьківських форм (7%) і гібридів (2%).

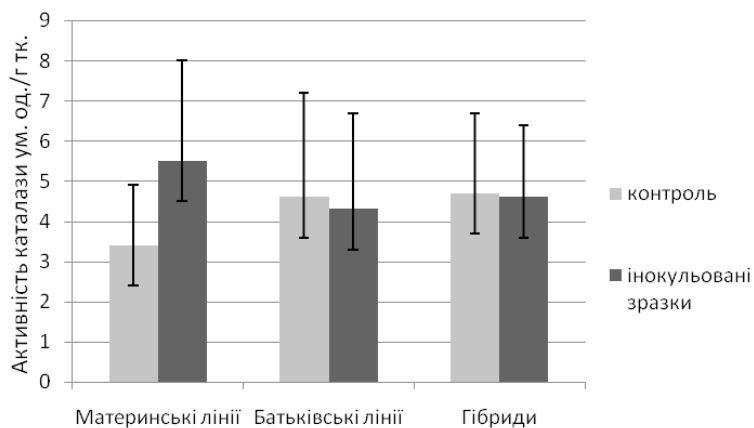


Рис. 1. Середня активність каталази у ліній і гібридів соняшнику, ум. од./г тк.

Таким чином, проведене визначення активності КАТ зразків соняшнику свідчить про залежність цих показників від генотипу зразка. Активність каталази досліджених зразків соняшнику перевищувала цей показник у стандарту сприйнятливості. Це дає змогу за активністю каталази проводити експрес-оцінку на стійкість до вовчка та диференціювати сприйнятливі зразки від зразків із різним ступенем стійкості. За активністю каталази у більшості випадків можна судити про потенційну стійкість зразків до вовчка. За інокуляції зразків у більшості випадків спостерігали збільшення активності каталази. Гетерозис за активністю каталази спостерігали тільки в окремих комбінаціях у гібридів Sx1012A/X536B, Sx2111A/X711B. Закономірного зв'язку між наявністю гена Or_5 і активністю каталази не виявлено.

Результати, описані у статті, покладені в основу корисної моделі «Спосіб прискореного визначення стійкості зразків соняшнику до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.)», номер заявки у 2012 12046

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Авраменко Р. С. Изучение качественных особенностей различных по устойчивости к заразице сортов подсолнечника: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12. Воронеж, 1973. 23 с.
2. Аксенова В. А., Кожанова О. Н. О механизме активирования пероксидазы у устойчивых и восприимчивых растений при заражении // Физиология растений. 1976. Т. 23. Вып. 2. С. 391–396.
3. Вольф В. Г. Статистическая обработка опытных данных. М.: Колос, 1966. 255 с.
4. Задорожна О. А. Ідентифікація у соняшнику гена стійкості до вовчка Or_5 за допомогою молекулярних маркерів // Аграрний вісн. Причорномор'я. 2012. Вип. 61. С. 158–163.
5. Зайчук В. Ф., Попов П. С., Калинченко Т. В. Активність поліфенолоксидази в корзинках подсолнечника // Масличные культуры. 1986. № 3. С. 30.
6. Каталог гібридів соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва / В. В. Кириченко, К. М. Макляк, В. П. Коломацька та ін. Харків, 2010. 44 с.

7. Каталог рабочей коллекции самоопыленных линий подсолнечника Института растениеводства им. В.Я. Юрьева / В.В. Кириченко, З.К. Аладина, А.Д. Гуменюк и др. Харьков, 1996. 88 с.
8. Кириченко В. В. Селекция и семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Харьков: Ин-т растениеводства, 2005. 385 с.
9. Мельничук М. Д., Дьячкова О. О., Смирнова С. О. та ін. Зміни активності пероксидази, каталази і поліфенолоксидази рослин перцю та тютюну, інфікованих вірусом тютюнової мозаїки // Физиология и биохимия культ. растений. 2003. Т. 35. № 1. С. 43–47.
10. Чигрин В. В., Шутова Е. А., Саутич М. А. Изменение активности пероксидазы у устойчивых и восприимчивых сортов пшеницы при заражении стеблевой ржавчиной // Физиология растений. 1973. Т. 20. Вып. 1. С. 79–85.
11. Чигрин Т. В., Задорожна О. А., Петренко В. П. Активність поліфенолоксидази у різних за стійкістю до вовчка (*Orobanche cumana* Wallr.) генотипів соняшника // Физиология и биохимия культ. растений. 2012. Т. 44. № 4. С. 355–360.
12. Чигрин Т. В., Задорожна О. А. Активність пероксидази у батьківських ліній та гібридів соняшнику при інокуляції вовчком // Вісн. Харків. ун-ту. Сер. біол. 2012. Вип. 15. № 1008. С. 109–115.
13. Antonova T. S., Terborg S. J. The role of peroxidase in the resistance of sunflower against *Orobanche cumana* in Russia // Weed Research. 1996. Vol. 36. N 2. P. 113–121.
14. Buze-Drăgomir L., Niculescu M. Researches on the catalase and Peroxidase activity at sunflower plants, infected by phytopatogenic fungi // Annals of the University of Craiova. 2010. Vol. 15. P. 1–8.
15. Eizenberg H., Plakhine D., Hershenhorn J. et al. Resistance to broomrape (*Orobanche* spp.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.) is temperature dependent // J. Exp. Bot. 2003. Vol. 54. N 385. P. 1305–1311.
16. Hernandez J. A., Diaz-Vivancos P., Rubio M. et al. Long-term plum pox virus infection produces an oxidative stress in a susceptible apricot, *Prunus armeniaca*, cultivar but not in a resistant cultivar // Physiologia Plantarum. 2006. Vol. 126. Is.1. P. 140–152.
17. Honiges A., Wegmann K., Ardelean A. Orobanche Resistance in sunflower // Helia. 2008. Vol. 31. N 49. P. 1–12.
18. Korn M., Gartner T., Erban A. et al. Predicting *Arabidopsis* freezing tolerance and heterosis in freezing tolerance from metabolite composition // Molecular Plant. 2010. Vol. 3. N 1. P. 224–235.
19. Lamb C. J., Lawton M. A., Dron M. et al. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack // Cell. 1989. Vol. 56. P. 215–224.
20. Luhová L., Lebeda A., Hedererová D. et al. Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions // Plant Soil Environ. 2003. Vol. 49. N 4. P. 151–157.
21. Magbanua Z. V., Moraes C. M., Brooks T. D. et al. Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? // Mol. Plant Microbe Interact. 2007. Vol. 20. 6. P. 697–706.
22. Mona C. M. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens // Plant. Physiol. 1994. Vol. 105. P. 467–472.
23. Song G.-S., Zhai H.-L., Peng Y.-G. et al. Comparative transcriptional profiling and preliminary study on heterosis mechanism of super-hybrid rice // Molecular Plant. 2010. August. P. 1–14.

CATALASE ACTIVITY VARIATION IN SUNFLOWER ACCESSIONS DIFFERENTED BY BROOMRAPE (*OROBANCHE CUMANA* WALLR.) RESISTANCE**T. Chigrin, O. Zadorozhna**

*Plant Production Institute n.a.V.Ya.Yuriev
142, Moskovsky Ave., Kharkiv 61060, Ukraine
e-mail: olzador@ukr.net*

Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) activity of investigated sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines and hybrids exceeded the activity in the line-standard susceptible to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.). CAT activity depended on the genotype. Increasing of CAT activity under inoculation was revealed in most cases. The heterosis of CAT activity only in some combinations of hybrids was detected. We have shown no correlation between Og_5 presence and CAT activity.

Keywords: Helianthus annuus, Orobanche cumana, resistance, catalase activity, genotype.

ВАРЬИРОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ У РАЗНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАРАЗИХЕ (*OROBANCHE CUMANA* WALLR.) ОБРАЗЦОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА**Т. Чигрин, О. Задорожная**

*Институт растениеводства имени В. Я. Юрьева
пр. Московский, 142, Харьков 61060, Украина
e-mail: olzador@ukr.net*

Активность каталазы (КАТ) (КФ1.11.1.6) исследованных образцов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) превышала этот показатель у стандарта восприимчивости к заразихе (*Orobanche cumana* Wallr.). При инокуляции образцов в большинстве случаев наблюдали увеличение активности КАТ. Активность КАТ варьировала в зависимости от генотипа образца. Гетерозис по активности КАТ был лишь в отдельных комбинациях у гибридов Сх1012А/Х536В, Сх2111А/Х711В. Закономерная связь между наличием гена Og_5 и активностью каталазы не выявлена.

Ключевые слова: Helianthus annuus, Orobanche cumana, устойчивость, активность каталазы, генотип.