

УДК 633.34(571.61):632.4

**ЭНЗИМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ
GLYCINE MAX И GLYCINE SOJA****Семенова Е.А., Титова С.А., Дубовицкая Л.К.***Дальневосточный государственный аграрный университет, Благовещенск,
Россия e-mail: elenasemen@yandex.ru*

Септориоз, ржавая пятнистость (возбудитель *Septoria glycines* Hemmi. Syn.), является одним из важнейших биотических факторов, снижающих урожайность сои. В данной работе была исследована динамика изменения активности ферментов (пероксидазы, каталазы и кислой фосфатазы) в листьях культурной и дикорастущей сои в зависимости от степени развития септориоза и генотипа растения. Выявлено, что активность пероксидазы и каталазы на начальном этапе, а кислой фосфатазы на поздних сроках развития заболевания может служить критерием устойчивости к данному патогену.

Ключевые слова: соя, септориоз, пероксидаза, каталаза, кислая фосфатаза**ENZYMATIC ACTIVITY OF INFECTED LEAVES OF GLYCINE MAX
AND GLYCINE SOYA****Semenova E.A., Titova, S.A., Dubovitskaya L.K.***Far East State Agrarian University, Blagoveschensk, e-mail: elenasemen@yandex.ru*

Septoria or rusty spottiness (pathogen is *Septoria glycines* Hemmi. Syn.), is one of the most important biotic factors that reduce soybean yields. In this article we studied the dynamics of the enzyme activity (peroxidase, catalase and acid phosphatase) in leaves of cultivated and wild soya, depending on the degree of development of *septoria* and plant genotype. It was revealed that the activity of peroxidase and catalase in the initial phase, and acid phosphatase in the later stages of disease development can serve as a criterion of resistance to this pathogen.

Keywords: soybean, septoria, peroxidase, catalase, acid phosphatase

Септориоз, ржавая пятнистость (возбудитель *Septoria glycines* Hemmi. Syn.), является одним из важнейших биотических факторов, снижающих урожайность сои. Проявляется болезнь в преждевременном пожелтении и опадении поражённых листьев. В отдельные годы поражённость семядолей достигает 60%, листьев – до 75% [1].

Одной из центральных проблем современной биологии растений являются исследование механизмов устойчивости растений к патогенам и изучение механизмов фитоиммунитета. Внимание исследователей к этой проблеме объясняется тем, что наличие или отсутствие иммунитета во многом определяет рост, развитие и продуктивность растений. Особенно это важно для сельскохозяйственных растений, продуктивность которых во многом определяется их способностью противостоять действию патогена.

Именно это обстоятельство обуславливает актуальность исследований, направленных на познание механизмов, определяющих устойчивость растений к действию патогенов.

Взаимодействие возбудителя и растения-хозяина вызывает значительные изменения в функциональном состоянии растений, что, прежде всего, отражается на уровне ферментативной активности.

К ферментам, обеспечивающим нейтрализацию различных по происхождению неблагоприятных факторов среды, относятся пероксидаза, каталаза и кислая фосфатаза.

Ранее были показаны изменения активности пероксидазы и каталазы в ходе онтогенеза и под влиянием стрессов (низких и высоких температур, недостаточного и избыточного увлажнения) [5, 7].

Настоящее исследование было предпринято с целью выяснения зависимости изменения активности ферментов (пероксидазы, каталазы и кислой фосфатазы) от степени поражения листьев сои септориозом и использование данных показателей в качестве предполагаемых маркеров устойчивости растений.

Материал и методы исследования

Объектом исследования послужили листья культурной (*Glycine max*) – сорта Соната, Гармония, Даурия и дикорастущей сои (*Glycine soja*) – форма КА-1344. Для выделения возбудителя септориоза в чистую культуру использовали глюкозо-картофельный агар. Инокуляцию листьев сои *Septoria glycines* Hemmi проводили в лабораторных условиях по методике ВИР [3]. Поражённость септориозом, характеризующуюся количеством некротических пятен на листьях, определяли по общепринятой шкале: 0 баллов – признаков поражения нет; 1 балл – типичные пятна, занимающие менее 10% поверхности; 2 балла – от 10 до 25%; 3 балла – от 26 до 50%; 4 балла – от 51 до 75%; 5 баллов – свыше 75%.

Активность пероксидазы (1.11.1.7) определяли по методу Бояркина, основанному на определении скорости реакции окисления бензидина под действием фермента до образования продукта окисления синего цвета определённой концентрации на фотоэлектроколориметре [2].

Активность каталазы (1.11.1.6) определяли газометрическим способом, который основан на определении объёма кислорода, выделившегося после при-

бавления к экстракту белка, содержащего каталазу, перекиси водорода. Объём выделяющегося кислорода определяли через 3 мин после начала реакции [2].

Определение активности кислых фосфатаз (3.1.3.2) проводили колориметрическим методом, основанным на количественном учёте неорганического фосфора, образующегося при расщеплении органических фосфорных соединений в строго определённых условиях под действием этого фермента [2].

Определение белка проводили методом Лоури [8]. Удельную активность ферментов выражали в единицах активности на мг белка.

Полученные данные подвергали статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования показали, что степень поражения септориозом *G. max* и *G. soja* различна. Первые проявления болезни были отмечены на 3-и сутки у сорта Соната, у сортов Гармония и Даурия на 4-е сутки и на 7-е сутки у формы КА-1344 (рис. 1). При учёте развития септориоза на

9-е сутки после инокуляции возбудителем болезни форма КА-1344 (1 балл) была классифицирована как высокоустойчивая, сорта Гармония (2 балла) и Даурия (2 балла) – как устойчивые и только сорт Соната (4 балла) был отнесен к восприимчивым.

На 12-е сутки после заражения *Septoria glycines* Hemmi только форма КА-1344 (2 балла) была отнесена к устойчивым, сорта Гармония (3 балла) и Даурия (3 балла) – к среднеустойчивым, сорт Соната (5 баллов) – к сильновосприимчивым.

При инфицировании листьев сои наблюдается изменение активности пероксидазы относительно контроля (здоровых листьев). В ряде работ показано увеличение активности пероксидазы при патогенезе [4]. Поэтому пероксидазу рассматривают как одну из важнейших каталитических систем среди биохимических факторов защиты растений от патогенных микроорганизмов, активно участвующих в саморегуляции метаболизма растений при заражении.

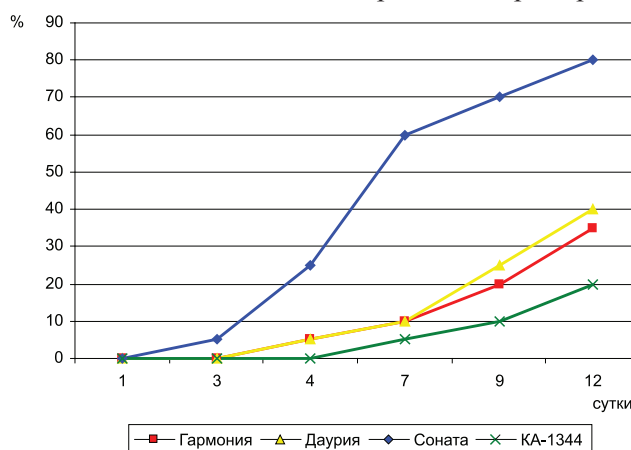


Рис. 1. Динамика развития септориоза на листьях *G. max* и *G. soja*

В наших исследованиях рост активности пероксидазы наблюдался в срезанных листьях (контроль и инфицированные) всех исследованных сортов сои. Согласно литературным данным пероксидаза обладает повышенной чувствительностью к внешним факторам и любое механическое воздействие приводит к активации фермента [4].

Увеличение активности пероксидазы относительно контроля было зафиксировано на 2–3-и сутки у всех изучаемых сортов. В наибольшей степени возрастает активность фермента у дикорастущей сои (в 4 раза), у сортов Гармония и Даурия ~ в 3 раза и 1,5 раза у сорта Соната (рис. 2).

Согласно литературным данным, активация пероксидаз является показателем раннего ответа растения на воздействие патогена и служит показателем устойчивости [9].

Второй пик активности пероксидазы в инфицированных листьях сои был зафик-

сирован на 9-е сутки и зависел от степени поражения листа (см. рис. 2). Наиболее значительное возрастание активности фермента было отмечено у сорта Соната, степень поражения листьев составила 70%. Наименьшее повышение пероксидазы по сравнению с контролем наблюдалось у дикорастущей сои, некротические пятна занимают 10% поверхности листа. Сорта Гармония и Даурия, степень поражения листьев – 20–25%, по активности пероксидазы занимают промежуточное положение.

По-видимому, активация пероксидазы на начальной стадии заражения, прежде всего, происходит за счёт активации уже имеющихся в клетке изопероксидаз или за счёт синтеза пероксидаз *de novo*. Увеличение активности фермента, по мере усиления степени поражения листьев, может происходить и за счёт пероксидазы, синтезируемой самим грибом *Septoria glycines* Hemmi.

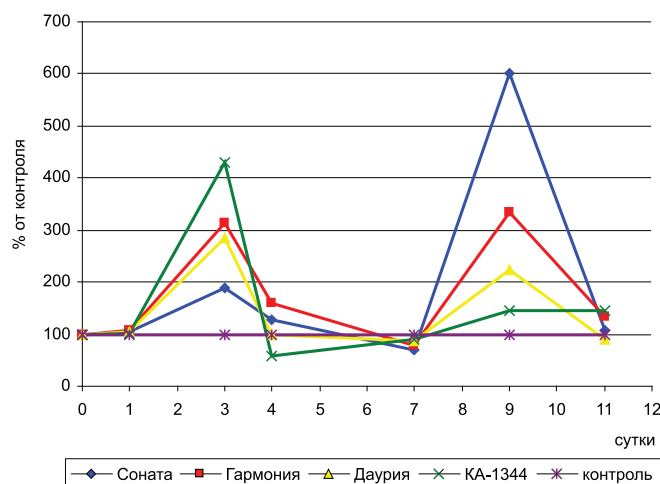


Рис. 2. Изменение активности пероксидазы в инфицированных листьях *G. max* и *G. soja*

Дальнейшее снижение активности фермента у всех исследованных образцов связано с деградацией растительной ткани.

Литературные данные о роли каталазы в формировании взаимоотношений растение – паразит противоречивы. Сообщалось о различных ответных реакциях каталазы у устойчивых растений: от сильной активации у овса при заражении корончатой ржавчиной до снижения активности у пшеницы, пораженной стеблевой ржавчиной [6].

Активность каталазы в листьях сои повышается на 1-е сутки после заражения,

у формы КА-1344 – в 2 раза, у сортов культурной сои – в 1,2–1,5 раза относительно контроля (рис. 3). По-видимому, высокая активность каталазы подавляет появление видимых некрозов после инокуляции возбудителем септориоза.

По мере развития заболевания активность каталазы в листьях, поражённых септориозом, снижается у всех исследованных образцов, в большей степени у устойчивой формы КА-1344, что приводит к существенному накоплению H_2O_2 в клетке, тем самым создаются неблагоприятные условия для патогена.

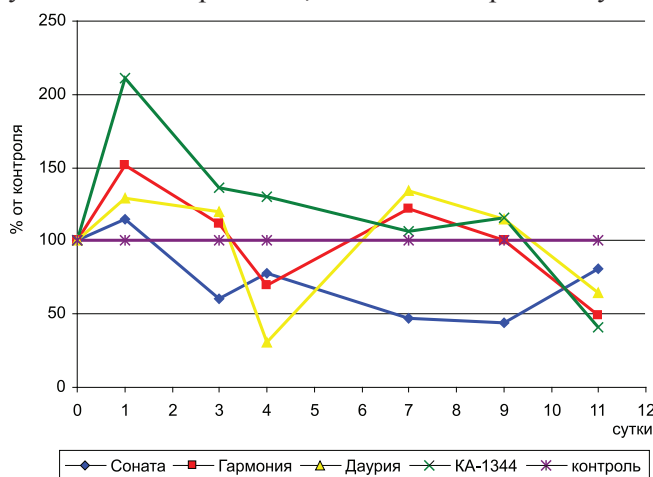


Рис. 3. Изменение активности каталазы в инфицированных листьях *G. max* и *G. soja*

Интерес к изучению отдельных групп фосфатаз определяется участием их в обмене углеводов, фосфолипидов, нуклеотидов и других соединений. Эти ферменты обладают гидролитическим и феразным действием, что имеет важное значение в обмене веществ.

Кислая фосфатаза имеет прямое отношение к адаптации растительного организма, она способна нейтрализовать действие широкого спектра инфекций, вызванных различными микроорганизмами [10].

У сильновосприимчивого сорта Соната пик активности кислой фосфатазы был зафиксирован на 1-е сутки после заражения. У сортов, слабо поражаемых септориозом, активность фермента значительно повышалась только на 3-и сутки развития болезни (рис. 4).

По мере развития заболевания активность кислой фосфатазы снижается: у сорта Соната – в 4 раза, у слабо поражаемых сортов (Гармония, Даурия) и дикорастущей сои активность близка к уровню контроля (см. рис. 4).

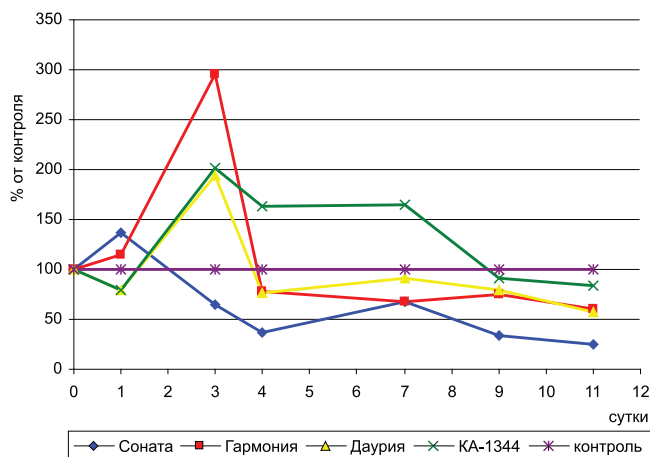


Рис. 4. Изменение активности кислой фосфатазы в инфицированных листьях *G. max* и *G. soja*

Мы считаем, что изменение активности кислой фосфатазы в листьях поражённых растений связано с нарушением углеводно-фосфорного и липидного обменов, которое происходит под влиянием возбудителя септориоза. Наибольшую устойчивость к действию возбудителя проявила форма КА-1344.

Заключение

Таким образом, инфицирование листьев сои септориозом сопровождается изменением активности ферментов на протяжении развития заболевания и зависит от генотипа растения. Выявлено, что активность пероксидазы и каталазы на начальном этапе, а кислой фосфатазы на поздних сроках развития заболевания может служить критерием устойчивости к данному патогену. Внутрисортную гетерогенность по реакции на биотический стресс (воздействие *Septoria glycines* Hemmi) можно использовать в практической селекции при создании новых сортов сои.

Список литературы

1. Заостровных В.И. Вредные организмы сои и система фитосанитарной оптимизации её посевов: монография / В.И. Заостровных, Л.К. Дубовицкая; под ред. В.А. Чулкиной. – Новосибирск, 2003. – 528 с.
2. Малый практикум по физиологии растений / под ред. А.Т. Мокроносова. – М.: МГУ, 1994. – 184 с.
3. Методические указания по изучению устойчивости сои к грибным болезням / под ред. Н.И. Корсакова. – Л.: ВИР, 1979. – 46 с.
4. Рубин Б.А. Изменение пероксидазной активности листьев пшеницы под влиянием заражения *Puccinia graminis* у сортов, различающихся по устойчивости / Б.А. Рубин, Е.В. Юрина // Докл. ВАСХНИЛ. – 1974. – №3. – С. 7–9.
5. Семенова Е.А. Изменение активности и электрофоретических спектров некоторых ферментов в листьях растений культурной и дикой сои / Е.А. Семенова, П.В. Тихончук // Доклады РАСХН. – 2008. – № 2. – С. 10–13.
6. Серова З.Я. Окислительно-восстановительные процессы инфицированного растения. – Минск: Наука и техника, 1982. – 232 с.
7. Хайрулина Т.П. Влияние низкой положительной температуры на активность каталазы, пероксидазы и продуктивность сои / Т.П. Хайрулина, П.В. Тихончук, Е.А. Семенова // Достижения науки и техники АПК. – 2010. – № 7. – С. 8–10.

8. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry et al. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265–275.
9. Mader M. Role of Peroxidase in Lignification of Tobacco Cells. I. Oxidation of Nicotinamide Dinucleotide and Formation of Hydrogen Peroxide by Cell Wall Peroxidase / M. Mader, V. Amber-Fixher // Plant Physiol. – 1982. – Vol. 70. – P. 1128–1131.
10. Naoi N. Acid phosphatases of aspergillus saitoi: purification and properties / N. Naoi, B. Teruniko // Arel and biochem. – 1977. – Vol. 4, № 10. – P. 1835–1838.

References

1. Zaostrovnyh V.I. Vrednye organizmy soi i sistema fitosanitarnoj optimizacii ejo posevov: Monografija / V.I. Zaostrovnyh, L.K. Dubovickaja; pod red. V.A. Chulkinoy. Novosibirsk, 2003. 528 s.
2. Malyj praktikum po fiziologii rastenij / pod red. A.T. Mokronosova. M.: MGU, 1994. 184 s.
3. Metodicheskie ukazaniya po izucheniju ustojchivosti soi k gribnym boleznjam / pod red. N.I. Korsakova. L.: VIR, 1979. 46 s.
4. Rubin B.A. Izmenenie peroksidaznoj aktivnosti list'ev pshenicy pod vlijaniem zarazhenija *Puccinia graminis* u sortov, razlichajuwihjsja po ustojchivosti / B.A. Rubin, E.V. Jurina // Dokl. VASHNIL. 1974. №3. S. 7–9.
5. Semenova E.A. Izmenenie aktivnosti i jelektroforeticheskikh spektrov nekotoryh fermentov v list'jah rastenij kul'turnoj i dikoj soi / E.A. Semenova, P.V. Tihonchuk // Doklady RASHN. 2008. № 2. S. 10–13.
6. Serova Z.Ja. Okislitel'no-vosstanovitel'nye processy inficirovannogo rastenija. – Mn.: Nauka i tehnika, 1982. – 232 s.
7. Hajrulina T.P. Vlijanie nizkoj polozhitel'noj temperatury na aktivnost' katalazy, peroksidazy i produktivnost' soi / T.P. Hajrulina, P.V. Tihonchuk, E.A. Semenova // Dostizhenija nauki i tehniki. 2010. № 7. S. 8–10.
8. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O.H. Lowry [et al.] // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
9. Mader M. Role of Peroxidase in Lignification of Tobacco Cells. I. Oxidation of Nicotinamide Dinucleotide and Formation of Hydrogen Peroxide by Cell Wall Peroxidase / M. Mader, V. Amber-Fixher // Plant Physiol. 1982. Vol. 70. P. 1128–1131.
10. Naoi N. Acid phosphatases of aspergillus saitoi: purification and properties / N. Naoi, B. Teruniko // Arel and biochem. 1977. Vol. 4, № 10. P. 1835–1838.

Рецензенты:

Ала А.Я., д.с.-х.н., зав. лабораторией генетики ГНУ Всероссийского НИИ сои, г. Благовещенск;
 Крылов А.В., д.б.н., профессор, гл.н.с., Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН, г. Благовещенск.
 Работа поступила в редакцию 20.12.2011.