

РОЛЬ ИЗОПЕРОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ В СТАНОВЛЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛЕ *SCHIZAPHIS GRAMINUM*

С.Д. Румянцев, С.В. Веселова, Е.А. Черепанова, И.В. Максимов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, Уфа, Россия, *Rumyantsev-Serg@mail.ru*

Аннотация. Изучен редокс статус, активность и изоферментный состав пероксидаз у растений пшеницы трех видов *Triticum aestivum*, *T. monococtum* и *T. timopheevii*, заселенных обыкновенной злаковой тлей (*Schizaphis graminum* Rond.). Показано, что толерантные растения характеризовались высоким содержанием перекиси водорода на начальном этапе инфицирования, затем в растениях начинались процессы детоксикации активных форм кислорода. Обнаружены изменения в активности катионных, нейтральных и анионных изопероксидаз.

Ключевые слова: *Schizaphis graminum*, пшеница, редокс статус, пероксидазы

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-692-696

Интенсификация сельского хозяйства привела к существенному увеличению вредоносности тлей на зерновых культурах. Повышение устойчивости растений – один из способов лимитирующих вредоносность тлей. Однако для этого необходимо накопление информации о механизмах устойчивости. Толерантность является уникальной категорией устойчивости растений к насекомым, которую обычно связывают с сильно выраженной компенсаторной реакцией растений и неспецифичными по отношению к вредителям защитными ответами [Koch et al., 2016]. На сегодняшний день в современной литературе описано несколько механизмов, один из которых связан с детоксикацией пероксидазами (ПО) растений излишних количеств активных форм кислорода (АФК) [Koch et al., 2016]. Считается, что АФК являются главным сигналом растения на стрессовые факторы окружающей среды, а редокс-статус растения, заселенного тлей, является одним из важных показателей толерантности сорта [Koch et al., 2016]. Окислительный взрыв при инфицировании тлями считается типичной реакцией формирования устойчивости растений к вредителю, однако часто приводит к смерти клетки [Koch et al., 2016]. Детоксикация излишних количеств АФК и поддержание гомеостаза между генерацией и утилизацией АФК считается отличительной чертой толерантных растений [Koch et al., 2016]. Показано, что в этих процессах участвует ряд про-/антиоксидантных ферментов, в том числе пероксидазы [War et al., 2012]. Активация апопластных пероксидаз может играть решающую роль в развитии устойчивости растений к тлям за счет детоксикации больших количеств АФК через синтез токсичных фенольных соединений и лигнина [Koch et al., 2016; War et al., 2012]. Пероксидазы индуцируются во многих растениях в ответ на атаку насекомыми и являются важным компонентом непосредственной реакции растений на повреждение, так как регулируют ряд процессов напрямую или косвенно связанных с устойчивостью растений к насекомым [War et al., 2012].

Пероксидазы III класса являются самыми многочисленными ферментами растений, локализованными преимущественно в апопласте, клеточной стенке и вакуоли [Максимов и др., 2011]. ПО классифицируют по типу их взаимодействия с клеточной стенкой – свободно-растворимые, слабосвязанные и ионно- или ковалентно связанные. Также ПО делят по изоэлектрофоретической подвижности на анионные, нейтральные и катионные [Kukavica et al., 2012]. Основной функцией ПО является защита растительного организма от вредного воздействия АФК, образующегося при

фотосинтезе и дыхании [Максимов и др., 2011]. Однако ПО могут участвовать в процессах генерации АФК, при этом они генерируют высокотоксичный супероксид радикал. Также некоторые апопластные ПО обладают НАДФН-оксидазной и ИУК-оксидазной активностями [Максимов и др., 2011]. Физиологические функции ПО многообразны и каждая из них связана со специфической изоформой фермента, однако очень трудно определить конкретную функцию отдельной изоформы *in vivo* [Kukavica et al., 2012].

В связи с этим, целью настоящей работы являлось обнаружение связи между редокс-статусом растений, активностью свободно-растворимых пероксидаз, изменением их изоферментного состава и толерантностью растений пшеницы трех видов *Triticum aestivum*, *T. monococcum* и *T. timopheevii*, заселенных обыкновенной злаковой тлей (*Schizaphis graminum* Rond.).

В экспериментах использовали три сорта мягкой яровой пшеницы *T. aestivum* – Жница, Салават Юлаев (СЮ), Омская 35 (Ом35). Также объектами исследований служили один образец *T. monococcum* к-39471 и один образец *T. timopheevii* к-58666, из ГНУ Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (Санкт-Петербург).

Таблица.

Влияние обыкновенной злаковой тли *S. graminum* на изменение содержания H_2O_2 и активность пероксидазы в листьях трех видов пшеницы на разных стадиях инфицирования

Показатели	Время после инфицирования, сутки	Вариант	Виды пшеницы				
			<i>Triticum aestivum</i>			<i>T. timopheevii</i>	<i>T. monococcum</i>
			Жница	СЮ	Ом35	к-58666	к-39471
Генерация H_2O_2 , мкМ H_2O_2 /г сырой массы	1	Контроль	26,9±5	25,2±5,6	21±3	27,8±5,3	28,2±3,6
		<i>S. graminum</i>	22,6±3,7	12,6±1,3	41,6±6,2	58,7±5,5	53,7±5,3
	3	Контроль	24±2,9	26,8±1,7	29,7±2,8	28,9±2,8	28,7±3,1
		<i>S. graminum</i>	18,2±2,3	19±2,4	54,5±3,9	48,6±4,5	20,4±3
	6	Контроль	21,8±2,3	24,8±2,8	23,9±1,2	25,2±1,8	26,1±1,1
		<i>S. graminum</i>	57,2±4,1	53,9±0,6	23,4±0,7	21,4±2,7	19,4±1,9
Активность пероксидазы, оп.ед./мг белка мин	1	Контроль	25,9±0,7	30,4±0,7	35,2±1,5	29,6±0,4	23,6±0,5
		<i>S. graminum</i>	28,9±0,7	26,1±1	44,7±3,8	35,7±1,2	43,2±1,4
	3	Контроль	25,8±0,5	29±0,4	30,1±1,2	31,4±0,8	32,1±1,1
		<i>S. graminum</i>	31±2	25,8±0,6	41,4±3	36±0,3	60,5±2,6
	6	Контроль	30,6±0,4	30,5±1,2	25,3±0,8	34,9±1,1	37,4±0,2
		<i>S. graminum</i>	25,4±3,8	23±0,3	40,4±3,5	52±4	65,6±0,8
Смертность тлей, %			7,7±1,2	5,7±1,1	20,1±3,4	21,9±2,1	39,6±4,0

Тест на антибиоз показал наименьшую смертность тлей, кормившихся на сортах Жница и СЮ. Смертность тлей, заселенных на сорт Ом35 и образец *T. timopheevii* к-58666, была примерно в 3-4 раза выше, а самая высокая смертность была обнаружена у тлей, заселенных на образец *T. monococcum* к-39471 (таблица). Таким образом, самым восприимчивым к *S. graminum* оказался сорт Жница, а самым устойчивым – образец *T. monococcum* к-39471, что совпадает с данными литературы об устойчивости многочисленных образцов *T. monococcum* к разным видам тлей [Radchenko, 2012].

Для понимания механизмов формирования устойчивости растений к колюще-сосущим насекомым важно различать быстрые ответы, проявляющиеся у растений в течение первых 5 дней, и долгосрочные ответы, обнаруживающиеся после 5 дней

инфицирования вредителем, когда индуцированные ранним ответом защитные системы растения запускают систему детоксикации АФК и восстановления роста [Koch et al., 2016]. Изучение редокс-статуса растений пшеницы в наших экспериментах показало, что заселение восприимчивых сортов Жница и СЮ тлями приводило к уменьшению содержания H_2O_2 на начальных этапах инфицирования (1-е и 3-и сут) и резкому увеличению ее содержания на 6-е сутки инфицирования (таблица). Кроме того, у восприимчивых сортов не было обнаружено повышения активности ПО в течение всего эксперимента (таблица). Устойчивые фенотипы (Ом35, к-58666 и к-39471) отличались повышенной генерацией H_2O_2 на начальном этапе инфицирования и снижением ее генерации при долгосрочном ответе, а также повышенной активностью ПО в течение всего эксперимента (таблица). Во многих исследованиях показано, что разные виды злаковых тлей индуцируют резкое повышение активности ПО именно при питании на устойчивых фенотипах [War et al., 2012]. Эти результаты могут говорить о вовлечении H_2O_2 и ПО в синтез токсичных фенольных соединений и реорганизацию клеточных стенок растений за счет лигнификации, что может быть причиной снижения жизнеспособности вредителя [Koch et al., 2016; War et al., 2012], которое было обнаружено у устойчивых образцов в наших экспериментах (таблица).

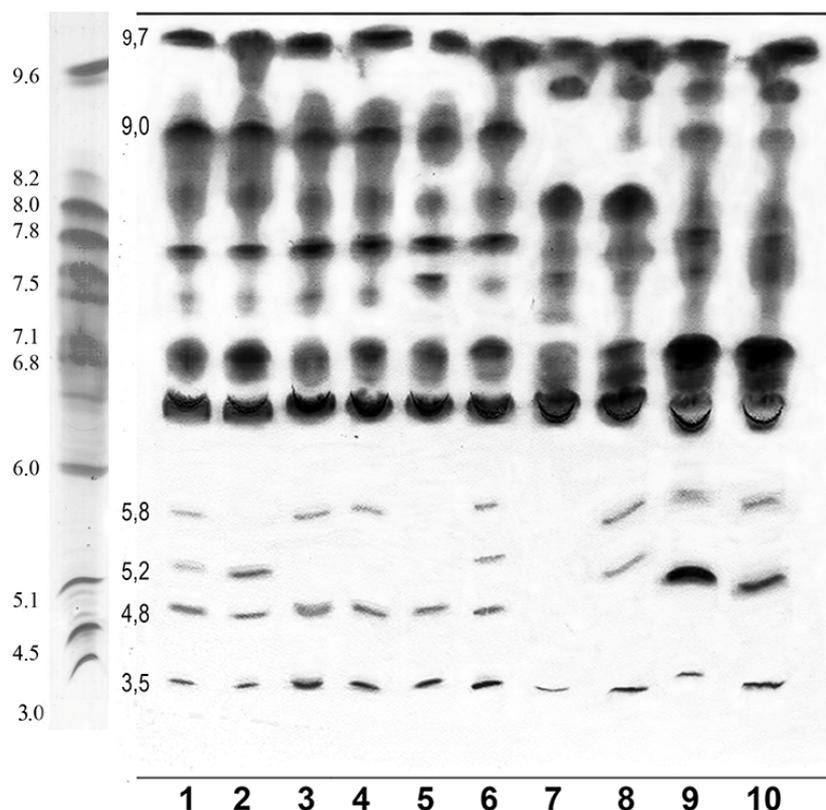


Рисунок. Фото ПААГ после ИЭФ свободнорастворимой фракции пероксидазы, выделенной из листьев пшеницы трех видов: *T. aestivum*, *T. timopheevii* и *T. monococcum*, через 2 дня после инфицирования *S. graminum*. 1, 2 - *T. aestivum* (Жница); 3, 4 - *T. aestivum* (СЮ); 5, 6 - *T. aestivum* (Ом35); 7, 8 - *T. timopheevii* к-58666; 9, 10 - *T. monococcum* к-39471; 1, 3, 5, 7, 9 – контрольные растения; 2, 4, 6, 8, 10 – растения, инфицированные злаковой тлей.

Анализ изоэлектрического спектра пероксидаз в свободнорастворимой фракции белка показал, что три сорта пшеницы вида *T. aestivum* отличались от образцов *T.*

timopheevii к-58666 и *T. топососсит* к-39471 как спектром анионных, так и катионных пероксидаз (рисунок). Так, у образцов к-58666 и к-39471 отсутствовала изоПО с $pI \sim 4.8$ (рисунок). Заселение растений тлями изменяло спектр пероксидаз у всех изученных образцов. Нейтральные изоПО с $pI \sim 6.8$ и 7.1 проявляли довольно сильную активность только у образцов к-58666 и к-39471 на протяжении всего эксперимента. Заселение тлями устойчивых фенотипов (Ом35, к-58666 и к-39471) индуцировало анионную изопероксидазу с $pI \sim 5.8$ и ингибировало изопероксидазу с $pI \sim 5.2$ у образца *T. топососсит* к-39471 через 2-ое сут. инфицирования (рисунок). У восприимчивого сорта Жница в этот же период заражения наблюдали индукцию изоПО с $pI \sim 5.2$ и ингибирование изопероксидазы с $pI \sim 5.8$, т.е. реакцию противоположную устойчивому образцу к-39471 (рисунок). Стоит отметить, что через 6 сут после заселения тлей изопероксидаза с $pI \sim 5.2$ проявляла наибольшую активность у устойчивого образца *T. топососсит* к-39471 (данные не указаны). Наши результаты показывают, что генерация H_2O_2 изменялась обратно пропорционально индукции данной изоПО с $pI \sim 5.2$ (таблица, рисунок). Также стоит отметить изменения в активности двух катионных изоПО с $pI \sim 9.0$ и 9.6 . Устойчивые фенотипы отличались повышением, а восприимчивые снижением активности изоПО с $pI \sim 9.6$ через 1 сут после заселения тлей (данные не указаны). В этот же период инфицирования наблюдали противоположную реакцию изменения активности у изоПО с $pI \sim 9.0$ – снижение активности у восприимчивых и повышение у устойчивых фенотипов (данные не указаны). Таким образом, повышение генерации H_2O_2 у устойчивых фенотипов коррелировало с увеличением активности изоПО с $pI \sim 5.8, 6.8, 7.1$ и 9.6 , а отсутствие таковой у восприимчивых фенотипов сопровождалось увеличением активности изоПО с $pI \sim 5.2, 9.0$ и ингибированием активности или низкой активностью изоПО с $pI \sim 5.8, 6.8, 7.1$ и 9.6 . Наши результаты согласуются с данными литературы о том, что анионные ПО обладают способностью к детоксикации АФК и участвуют в синтезе лигнина и суберина, а катионные ПО могут участвовать в продукции H_2O_2 и обладать НАДФН-оксидазной активностью [Максимов и др. 2011; Kukavica et al. 2012].

Таким образом, наши результаты показывают, что толерантные растения характеризовались высоким содержанием H_2O_2 на начальном этапе инфицирования, а затем излишние количества АФК обезвреживались, скорее всего, за счет синтеза фенольных соединений и лигнина. Наиболее вероятно, что ПО участвовали в этих процессах. Нейтральные изоПО с $pI \sim 6.8, 7.1$ и катионная изоПО с $pI \sim 9.6$ могли принимать участие в генерации АФК, а анионная изоПО с $pI \sim 5.2$ – в детоксикации H_2O_2 .

Литература

Максимов И.В., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Сорокань А.В, Кузьмина О.И. Структурно функциональные особенности изопероксидаз растений (Обзор) // Биохимия. – 2011. – Т. 76, № 6. – С. 749–763.

Kukavica B.M., Jovanovic S.D., Menckhoff L., Luthje S. Cell wall-bound cationic and anionic class III isoperoxidases of pea root: biochemical characterization and function in root growth // Journal of Experimental Botany. – 2012. – V. 63, No. 12. – P. 4631–4645.

Koch K.G., Chapman K., Louis J., Heng-Moss T., Sarath G. Plant tolerance: a unique approach to control hemipteran pests // Front. Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 1363.

Radchenko E.E. N.I. Vavilov's theory on natural immunity of plants to harmful organisms and breeding of cereal crops for aphid resistance // Agricultural biology. – 2012. – No. 5. – P. 54–63.

War A.R., Paulraj M.G., Ahmad T., Buhroo A.A., Hussain B., Ignacimuthu S., Sharma H.C. Mechanisms of plant defense against insect herbivores // Plant Signal. Behav. – 2012. – V. 7, No. 10. – P. 1306–1320.

THE ROLE OF WHEAT ISOPEROXIDASES IN PLANT DEFENSE RESPONSE AGAINST GREENBUG APHID *SCHIZAPHIS GRAMINUM*

S.D. Rumyantsev, S.V. Veselova, E.A. Cherepanova, I.V. Maksimov

Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Science Centre RAS, Ufa, Russia,
Rumyantsev-Serg@mail.ru

Abstract. Redox status, peroxidase activity and isoform content in *Triticum aestivum*, *T. monococcum* and *T. timopheevii* plants infected by greenbug aphid (*Schizaphis graminum* Rond.) were studied. It was shown that tolerant plants contained high level of hydrogen peroxide at the initial stage of infection and were capable to neutralize the reactive oxygen species after defense. Changes of the activity of cationic, neutral and anionic isoperoxidases were found.

Keywords: *Schizaphis graminum*, wheat, redox status, peroxidase