



ФЕРМЕНТ ПЕРОКСИДАЗА – УНІВЕРСАЛЬНИЙ МАРКЕР ЗИМОСТІЙКОСТІ РОСЛИН

А.В. КАПУСТЯН

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 01032 Київ, вул. Комінтерну, 1

Запропоновано способи прогнозування зимостійкості рослин, що базуються на властивості ферменту пероксидаза збільшувати активність за умов низькотемпературного стресу.

Зимостійкість рослин — один з головних чинників інтродукційної здатності рослин. Для її діагностування існує багато способів. Крім звичайних, досить трудомістких способів проморожування рослини в цілому або її частини, відомі нетрадиційні, що ґрунтуються на різних фізіолого-біохімічних дослідженнях. У теперішній час все більшого визнання набуває точка зору, що складні процеси інтродукції та акліматизації рослин значною мірою залежать від генетичної спадковості та фізіолого-біохімічних процесів саме у рослинах. Важливо мати надійні біохімічні тести, які б дозволили на ранніх етапах інтродукції діагностувати зимостійкість тієї чи іншої рослини. Останніми роками велику увагу дослідників привертають зміни у ферментній системі — головної з регулювальних сил живої клітини. Визначенню рівня активності пероксидази в рослині надається особливе значення щодо стійкості її до несприятливих умов зовнішнього середовища. Так, в осінньо-зимовий період підвищену активність пероксидази пов'язують із більшою зимостійкістю рослинного організму. Розроблений в Ботанічному саду ім. акад. О.В. Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка спосіб прогнозування зимостійкості рослин базується на залежності між зимостійкістю та підвищенням активності пероксидази в умовах експерименту [1, 3]. Автори виходили з того, що зимостійкі рослини мають лабільну

пероксидазну систему, яка швидко перебудовується при різкому зниженні температури. У зимостійких рослин активність пероксидази підвищується, а у менш зимостійких — активність залишається без змін або зменшується (2). Встановлено, що зимостійкі рослини мають коефіцієнт відношення активності пероксидази за низької температури (0 ... + 2 °С) до активності за оптимальної — більше одиниці, а у менш зимостійких цей показник дорівнює одиниці або менше її. Значення цього співвідношення вказує ще і на успішність інтродукції.

Слід зазначити, що цей метод має недолік: проводити аналіз можна лише в короткий проміжок часу — після осіннього загартування рослин до настання морозів. Тому основною метою нашої роботи став підбір умов експериментального загартування рослин. На даний час нам вдалося підібрати такі умови для проростків озимих зернових, які дають змогу проводити роботи з прогнозування зимостійкості в будь-яку пору року [4, 5].

Літературні дані свідчать про те, що в захисних реакціях рослинного організму проти стресу беруть участь не всі, а лише деякі ізоферменти даного ферменту [7, 8, 10, 11]. Для електрофоретичного аналізу нами було взято сорт жита Київське 9 (еталон зимостійкості) та лінію пшениці 11004 (Інституту землеробства), яка, за нашими даними, є незимостійкою. Було показано, що збільшення активності пероксидази при загартуванні та низькотемпературному стресі у жи-



та пов'язане з підвищенням активності лише окремих ізопероксидаз з відносною електрофоретичною рухливістю 0,14, 0,20 та 0,23. У незимостійкої лінії пшениці за таких умов активність пероксидази не підвищується і не спостерігаються зміни в ізоферментному спектрі. В останньому випадку не відбулися процеси загартування. Підвищення активності окремих ізопероксидаз може бути одним із багатьох тестів для характеристики здатності рослин до загартування і їх зимостійкості.

Більш точно розуміння ролі специфічних ізоензимів в рослинах може бути отримано при застосуванні генетичного аналізу експресії пероксидази, бо більшість генів пероксидази є тканиноспецифічними. Гени *rox1*, *rox2* та *rox4* в більшості випадків експресуються в коренях. Нижчі рівні експресії помічені для генів *rox4* і *rox3* в листках [9].

Як відомо, іРНК містить транскрибовану з певних генів інформацію і є матрицею для визначення послідовності амінокислот, які входять в поліпептидний ланцюг білка або ферменту, тому іРНК генів пероксидази, що експресуються в листках, за оптимальних умов та за низькотемпературного стресу можна використовувати як маркер зимостійкості озимих сортів пшениці. Тому постає питання дослідження рівня експресії генів пероксидази *rox3* і *rox4* за рівнем іРНК.

Щоб виявити експресію генів пероксидаз в листках пшениці за оптимальних умов та за низькотемпературного стресу, очищену РНК, виділену з листків озимих сортів пшениці, ізолювали і визначали експресію цих генів за допомогою ампліфікації продуктів, отриманих на іРНК-матриці з використанням реакції зворотної транскрипції RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) [6].

Об'єктами досліджень були сорти та лінії пшениці (*Triticum aestivum* L.): Миронівська 808 і Мірлебен — зимостійкі; лінії 11014, 11071 — незимостійкі. Для виявлення експресії генів пероксидази за рівнем іРНК нами підбрано пари маркерів до чотирьох генів пероксидази: *rox1* — 1) 5'-ccttcgagcatctctcaggccca-3', 2) 5'-ctgggtccgagtgaggagccctt-3'; *rox2* — 1) 5'-ccttcgagcgtctctcaaggcca-3', 2) 5'-ctgggtccgagtgaggagccctt-3'; *rox3* —

1) 5'-ccttcgacacatctctcaggccca-3', 2) 5'-ctgggtccgagtgaggagccctt-3'; *rox4* — 1) 5'-ccttcgcaacatctctcaggccca-3', 2) 5'-ctgggtccgagtgaggagccctt-3.

Щодо впливу низьких температур (0... +2 °С), то у зимостійких сортів пшениці, таких як Миронівська 808 та Мірлебен, зростає кількість іРНК-генів *rox3* та *rox4*, у незимостійких (лінії 11014, 11071) — змін в кількості іРНК-генів не відмічено.

Таким чином, визначення загальної активності пероксидази, електрофоретичний аналіз та застосування генетичного аналізу експресії пероксидази дало змогу встановити, що для зимостійких рослин характерне підвищення активності пероксидази за низькотемпературного стресу. Отже, фермент пероксидаза може бути використаний як універсальний маркер зимостійкості рослин.

1. А. с. 1681785 СССР, А 01 Н 1/4. Способ диагностики зимостойкости растений / В.П. Кучеренко, В.И. Северин, Л.И. Коваль.
2. А. с. 98073930. Позитивне рішення від 03.99 р. / В.П. Кучеренко, А.В. Капустян, Л.М. Шередеко, М.М. Мусієнко. — Спосіб прогнозування зимостійкості озимих зернових.
3. Капустян А.В., Кучеренко В.П., Мусієнко М.М. Вплив низькотемпературного стресу на активність пероксидази проростків пшениці // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка: Біологія. — 1999. — Вип. 29. — С. 43—45.
4. Кучеренко В.П., Северин В.И., Коваль Л.И. Прогнозирование зимостойкости растений по показателям активности пероксидазы / Физиология и биохимия культур. растений. — 1992. — 24, № 2. — С. 179—182.
5. Кучеренко В.П., Капустян А.В., Шередеко Л.М. Прогнозування зимостійкості озимих зернових за показниками активності пероксидази // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка: Інтродукція та збереження рослинного різноманіття. — 1999. — Вип. 2. — С. 72—73.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Дж. Сэмбрук. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
7. Петрова О.В., Мишустина П.С. Изоферменты пероксидазы в листьях кукурузы при пониженных температурах // Физиология и биохимия культур. растений. — 1973. — 5, № 2. — С. 194—199.
8. Христова Й., Салчева Г. Исследование электрофоретических спектров растворимых белков и изоформ пероксидазы в процессе ее закалки низкой температурой // Физиол. на раст. (НРБ). — 1978. — 4, № 1. — С. 28.
9. Baga Monica, Ravindra N. Molecular cloning and expression analysis of peroxidase genes from wheat // Plant Molecular Biology. — 1995. — 29. — P. 647—662.
10. Krasnuk M., Jung G.A., Witham F.H. Electrophoretic studies of the relationship of peroxidase, polyphenol oxidase and indoleacetic acid oxidase to cold tolerance



- rance of alfalfa // Cryobiology. — 1975. — 12, N 1. — P. 62—80.
11. *Saniewski M.* Electrophoretic patterns of some enzyme in *Muscari botryoides* bulbs in relation to cold treatment // Bull. Acad. pol. sci. Ser. sci. biol. — 1980. — 28, N 4. — P. 259—265.

Надійшла 20.03.2000

**ФЕРМЕНТ ПЕРОКСИДАЗА — УНИВЕРСАЛЬНЫЙ
МАРКЕР ЗИМОСТОЙКОСТИ РАСТЕНИЙ**

А.В. Капустян

Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко, Украина, Киев

Представлены способы прогнозирования зимостойкости растений, которые основаны на свойстве фермента

пероксидаза увеличивать активность при низкотемпературном стрессе.

**ENZYME PEROXIDASE — UNIVERSAL MARKER
OF PLANTS WINTER HARDINESS**

A.V. Kapustian

Taras Shevchenko Kyiv
National University, Ukraine, Kyiv

The methods of prediction of winter-resistance of plants are offered which are based on the property of the enzyme peroxidase to increase activity at a low-temperature stress.

УДК 633.812:665.527.64:665.521.54

НАСЛЕДОВАНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ И КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЭФИРНОГО МАСЛА ПРИ МЕЖВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ РОДА THYMUS L.

С.П. КОРСАКОВА

Государственный Никитский ботанический сад УААН
Украина, 98648 Ялта

Приводятся данные о массовой доле и составе эфирного масла у межвидовых гибридов чабреца, полученных от направленного скрещивания различных хемотипов. Обсуждаются закономерности наследования содержания эфирного масла и основных его компонентов. Дана биохимическая характеристика трансгрессивных форм, выделенных для дальнейшей селекции.

Род *Thymus L.* характеризуется высоким полиморфизмом, который создается, в основном, за счет лабильности признаков и отсутствия надежной корреляции между ними, что обуславливает огромное разнообразие их сочетаний [1]. Представители рода являются ценными эфиромасличными растениями и содержат богатый комплекс биологически активных соединений, в связи с чем широко применяются в парфюмерной, пищевой промышленности и медицине [2]. Вместе с тем высокая степень внутривидового полиморфизма и низкая продуктивность дикорастущих видов не позволяют

их использовать в качестве промышленной культуры. Поэтому необходимо проведение индивидуального отбора форм на хозяйственно-ценные признаки для дальнейшей селекции.

С целью создания и выделения высокопродуктивных генотипов с определенным составом эфирного масла проведены направленные межвидовые скрещивания 6 интродуцированных видов чабреца, которые по биосинтезу терпеновых соединений разделены нами на три группы: 1) тимолкарвакрольная, состоящая из двух хемотипов — тимольного с содержанием тимола 40 % и выше (*Thymus vulgaris L.*, *Th. striatus Vahl.*, *Th. serpyllum L.*) и карвакрольного, ко-

© С.П. КОРСАКОВА, 2000