

CZU: 635.64:632.38

DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.4980464>

VARIABILITATEA PEROXIDAZELOR ÎN TOMATE SUB ACȚIUNEA VIRUSURILOR MOZAICULUI TUTUNULUI ȘI ASPERMIEI TOMATELOR

*Angela RUDACOVA, Serghei RUDACOV, Ala CHERDIVARĂ
Liliana MĂRÎÎ*, Larisa ANDRONIC **

Universitatea de Stat din Moldova

**Instituția Publică Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor*

Pentru a studia influența infecțiilor virale (virusul mozaicului tutunului, VMT, și virusul aspermiei tomatelor, VAT) asupra activității și poliformismului peroxidazelor au fost examinate 20 de genotipuri de tomate, selectate de cercetătorii din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor.

Sub influența virusului mozaicului tutunului a fost detectată o creștere a activității peroxidazelor totale la 9 genotipuri de tomate. Dintre acestea, cel mai mare efect a fost stabilit în probele nr.20 (+143%) și nr.21 (+117%). La virusul aspermiei tomatelor au reacționat printr-o creștere a activității peroxidazelor 12 genotipuri. Cea mai semnificativă majorare a activității a fost demonstrată, de asemenea, la eșantionul nr.20 (+444%). Genotipul nr.14 și genotipul nr.19 au arătat o creștere semnificativă a activității – cu 160% și cu 181%, respectiv.

În rezultatul evaluării spectrelor electroforetice ale enzimelor peroxidazice la genotipurile studiate de tomate s-au identificat 8 izoenzime cu masele moleculare de la 45,5 kD la 23,1 kD. Peroxidazele cu masa moleculară mare au fost desemnate în mod convențional ca zone A1, A2, A3, A4; zonele cu masa moleculară mai mică au fost notate prin B1, B2, B3 și B4.

Cea mai mare cantitate de enzime peroxidazice a fost găsită în proba nr.20, pentru care au fost identificate toate cele 8 izoforme de peroxidaze. Într-una dintre probe, și anume – în cea cu nr.19, au fost detectate 5 zone inițiale de peroxidază (A1-A4 și B2), dar sub influența virusului aspermiei tomatelor în spectrul electroforetic au apărut 2 zone noi – B1 și B3; în plus, intensitatea zonelor A2-A4 și B1-B3 a crescut de 2,8 ori. Intensitatea zonelor A1, A2 și A4 sub influența virusului mozaicului tutunului a crescut de 1,75 ori.

În patru probe (nr.14, nr.1, nr.2, nr.3) au fost identificate 7 zone de izoenzime – A1-A3 și B1-B4. Dintre probele cercetate, cele mai expresive devieri au fost atestate la proba nr.14 (+160%). Sub influența virusului aspermiei tomatelor, intensitatea tuturor zonelor a crescut semnificativ, în special a crescut intensitatea zonelor A2 (de 4,9 ori) și A1 (de 2 ori).

Cuvinte-cheie: *peroxidaze, izoenzime, tomate, infecții virale.*

VARIABILITY OF PEROXIDASES IN TOMATOES UNDER THE ACTION OF TOBACCO MOSAIC AND TOMATO ASPERMY VIRUSES

To study of the peroxidase activity under the influence of tobacco mosaic and tomato aspermy viruses, samples of 20 tomato genotypes were selected by the team staff of the Institute of Genetics, Physiology and Plant Protection and evaluated.

Under the influence of the tobacco mosaic virus, an increase in the total activity of peroxidases was detected in 9 genotypes of tomatoes. Among them, the greatest effect was established in samples no.20 (+143%) and no.21 (+117%). The tomato aspermy virus was reacted to by an increase in the activity of 12 of the studied genotypes. The most significant increase in activity was also exposed by the sample no.20 (+444%). The genotype no.4 and no.19 showed a significant increase in activity – by 160% and by 181%.

When studying the electrophoretic spectra of peroxidase enzymes in the studied tomato genotypes, 8 isoenzymes with molecular weights from 45.5 kD to 23.1 kD were found, peroxidases with a large molecular weight were conventionally designated as zones A1, A2, A3, A4, zones with a lower molecular weight were noted B1, B2, B3 and B4. The largest number of peroxidase enzymes was found in sample no.20, in which all 8 isoforms of peroxidases were found. In one of the samples, namely, in sample no.19, 5 initial zones of peroxidases (A1-A4 and B2) were detected, but under the action of the tomato aspermy virus, 2 new zones appeared in its peroxidase spectrum – B1 and B3, in addition, the intensity of zones A2-A4 and B1-B3 increased by 2.8 times. Under the influence of the tobacco mosaic virus the intensity of zones A1, A2 and A4 increased by 1.75 times.

In four samples (no.14, no.1, no.2, no.3) there were 7 zones of isoenzymes A1-A3 and B1-B4. Among these samples, the most interesting was sample no. 14 (+160%). Under the influence of the tomato aspermy virus, the intensity of all its zones increased significantly, but the intensity of zone A2 (4.9 times) and zone A1 (2 times) increased the most.

Keywords: *peroxidase, isoenzymes, tomatoes, viral infections.*

Introducere

Peroxidazele (PO) aparțin clasei oxidoreductazelor, a cărei funcție principală este de a cataliza reacția de oxidare a compușilor chimici datorită peroxidului de oxigen cu formarea de complexe intermediare [1].

Peroxidaza este una dintre enzimele implicate în reglarea creșterii și dezvoltării organismelor vegetale, deoarece catalizează reacțiile de protecție împotriva diferitelor tipuri de daune și participă, de asemenea, la formarea peretelui celular și la respirația celulară [2,3].

În plus, enzima este sensibilă la multiple efecte adverse și este utilizată pe scară largă pentru a evalua rezistența la stres [4,5]. Peroxidaza este o enzimă inductibilă care poate fi indusă de diverși factori chimici, fizici sau biologici. La stresul organismului vegetal, sunt activate mai întâi peroxidazele bazice, ca o etapă ulterioară de protecție are loc o creștere a sintezei peroxidazelor acide.

Astfel, identificarea izoformelor PO poate dezvălui diferențele dintre o specie de plantă de altă, stadiul regenerării plantelor, influența factorilor de stres și vârsta ontogenetică a plantei.

Scopul cercetării a fost determinarea activității peroxidazelor totale în extractele vegetale de tomate infectate cu virusurile mozaicului tutunului și aspermiei tomatelor, precum și studierea spectrelor electroforetice ale enzimelor peroxidazice.

Material și metode

În scopul studierii influenței infecțiilor virale (virusul mozaicului tutunului, VMT, și virusul aspermiei tomatelor, VAT) asupra activității și polimorfismului peroxidazelor au fost evaluate 20 de genotipuri de tomate (Tab.1), selectate de cercetătorii din cadrul Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecția Plantelor.

Obținerea preparatelor enzimatică din țesuturile plantelor. Pentru a obține extracte vegetale de enzime, proba de material vegetal este măcinată într-un mojar cu nisip de cuarț în soluție tampon de extracție (0,1 M tampon Tris-HCl, pH 7,5). Raportul dintre eșantion și tampon este de 1:4 (g/v). Soluția tampon a fost prerăcită la -8°C; extracția a fost efectuată la rece. Omogenatul a fost centrifugat în Eppendorf timp de 10 minute la 20.000 g, +4°C. Supernatantele au fost depozitate la -4°C.

Determinarea activității peroxidazelor. Pentru a determina activitatea PO prin reacția cu benzidină, a fost aplicată metoda A.N. Boyarkov, dezvoltată pentru prima dată în 1951 [6]. Reactivul benzidinic include două componente [7]. Prima constă dintr-o soluție de benzidină 0,1% în alcool 50%, conținând 6% acetat de sodiu, 3% acid acetic. Apoi pH-ul a fost ajustat la valoare neutră (pH = 7,0) cu NaOH cristalin, măcinat în pulbere (pentru a menține volumul amestecului neschimbat). Concentrația finală de benzidină în amestecul de reacție este de 5,8 mM. Al doilea component este o soluție de peroxid de hidrogen de 0,5% (concentrație finală 0,3 mM). Pentru a simplifica procedura de măsurare a activității PO, într-o cuvă de cuarț se introduc 3 ml din prima componentă a reactivului benzidinic, încălzit anterior până la temperatura camerei și se adaugă 18 μl de H₂O₂. Măsurările au fost efectuate la 520 nm, la spectrofotometrul SF-46.

Identificarea spectrului izoformic al peroxidazelor. Izoenzimele au fost separate prin electroforeza verticală nativă, PAGE, conform metodei standard Davis [8] la 4°C. Concentrația gelurilor de separare și concentrare a fost de 7,5% , respectiv 5%.

Electroforeza a fost efectuată într-o cameră Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., SUA). În calitate de markeri ai maselor moleculare a fost utilizată Prestained Protein Ladder („Thermo Scientific”, USA). În fiecare buzunar al gelului de concentrare s-au introdus câte 20 μg de proteine. Concentrația de proteine în preparatele enzimatică a fost determinată preliminar prin metoda de legare a coloranților conform Bradford [9]; BSA a fost utilizat ca standard. Electroforeza a fost efectuată la temperatura de 10 ... 15°C, la 10 V/cm timp de 2,5 ore. La sfârșitul electroforezei, gelul a fost tratat cu reactivul benzidinic pH 7,0. Înainte de colorarea gelului, componentele reactivului benzidinic sunt amestecate într-un raport 1:1. După adăugarea reactivului benzidinic, culoarea zonelor de activitate peroxidazică apare în decurs de 30-40 de minute.

Electroforegramele obținute au fost scanate cu un scanner Epson Expression 10000XL (GE Healthcare, SUA). Evaluarea fiecărui eșantion (valoarea R_f a tuturor zonelor din profil, calculul maselor moleculare conform markerilor, calculul cantității relative a fiecărei zone din profil) a fost efectuată utilizând software-ul Phoretix 1D Advanced (TotalLab, Ltd., Marea Britanie).

Rezultate și discuții

Pentru a studia efectul virusurilor asupra diferitelor genotipuri de tomate, a fost evaluată activitatea peroxidazelor totale din frunzele plantelor de tomate. În calitate de martor au servit plantele sănătoase tratate cu

soluție tampon și două variante – plante care au au fost expuse influenței virusului mozaicului tutunului (VMT) sau influenței virusului aspermiei tomatelor (VAT).

Sub influența virusului mozaicului tutunului a fost detectată o creștere a activității peroxidazelor la 9 genotipuri de tomate (*a se vedea* Tabelul). Cea mai semnificativă creștere a activității s-a determinat în probele nr.20 și nr.21, creșterea activității în aceste eșantioane a fost, respectiv, cu 150% și 117%. Modificări semnificative în activitatea PO au fost stabilite în probele nr.19 (+75%), nr.18 (+56%), nr.7 (+33%). În alte genotipuri, activitatea PO a variat nesemnificativ – cu 4 - 20%.

Tabelul 1

Activitatea peroxidazelor din tomate

№	Genotip	Activitatea în proba martor unități/sec./g	Activitatea sub influența mozaicului tutunului (VMT)	Creșterea activității VMT (%)	Activitatea sub influența aspermiei tomatelor (VAT)	Creșterea activității VAT (%)
1.	Venet x Jacota	0,89	0,51	-	0,47	-
2.	MGF x Flacăra	0,35	0,37	6	0,56	60
3.	MGF x Anatolie	0,40	0,48	20	0,43	7,5
4.	MGF x Venet	0,33	0,13	-	0,30	-
5.	Flacăra x Prestij	0,41	0,49	20	0,48	17
6.	Jacota x Prestij	0,91	0,49	-	0,46	-
7.	Flacara x Tomiș	0,36	0,48	33	0,42	17
8.	Jacota x Mihaela	0,54	0,37	-	0,36	-
9.	Venet	0,84	0,29	-	0,46	-
10.	Jacota	0,61	0,41	-	0,90	47,5
11.	MGF	0,98	1,10	12,2	2,00	104
12.	Flacăra	0,47	0,43	-	0,49	4
13.	Tomiș	0,69	0,61	-	0,43	-
14.	Mihaela	1,04	0,92	-	2,71	160
15.	Prestij	0,86	0,37	-	0,46	-
16.	Rufina	1,08	0,59	-	0,73	-
18.	<i>S.pimpinellifolium</i>	0,43	0,67	56	0,78	81
19.	<i>S.chilense</i>	0,16	0,28	75	0,45	181
20.	<i>S.peruvianum</i>	0,16	0,39	143	0,87	444
21.	<i>S.hirsutum</i>	0,84	1,82	117	1,29	53

La infectare cu virusul aspermiei tomatelor 12 dintre genotipurile studiate au reacționat prin creșterea activității PO. Cea mai semnificativă creștere a activității PO cu 444% (de 5,4 ori) a fost stabilită în proba nr.20. Genotipul nr.14 și genotipul nr.19 au arătat o creștere semnificativă a activității PO – cu 160% și cu 181%, respectiv. Activitatea PO în genotipul nr.11 (MGF) a crescut cu 104%. În probele nr.18, nr.2 și nr.21, activitatea a crescut cu 80%, 60% și, respectiv 53%. În restul probelor (5 genotipuri) creșterea activității a variat de la 4% la 47%.

La studierea spectrelor electroforetice ale enzimelor peroxidazice din genotipurile studiate de tomate au fost detectate 8 izoenzime cu masele moleculare cuprinse între 45,5 kD și 23,1 kD. (Fig.1,2).

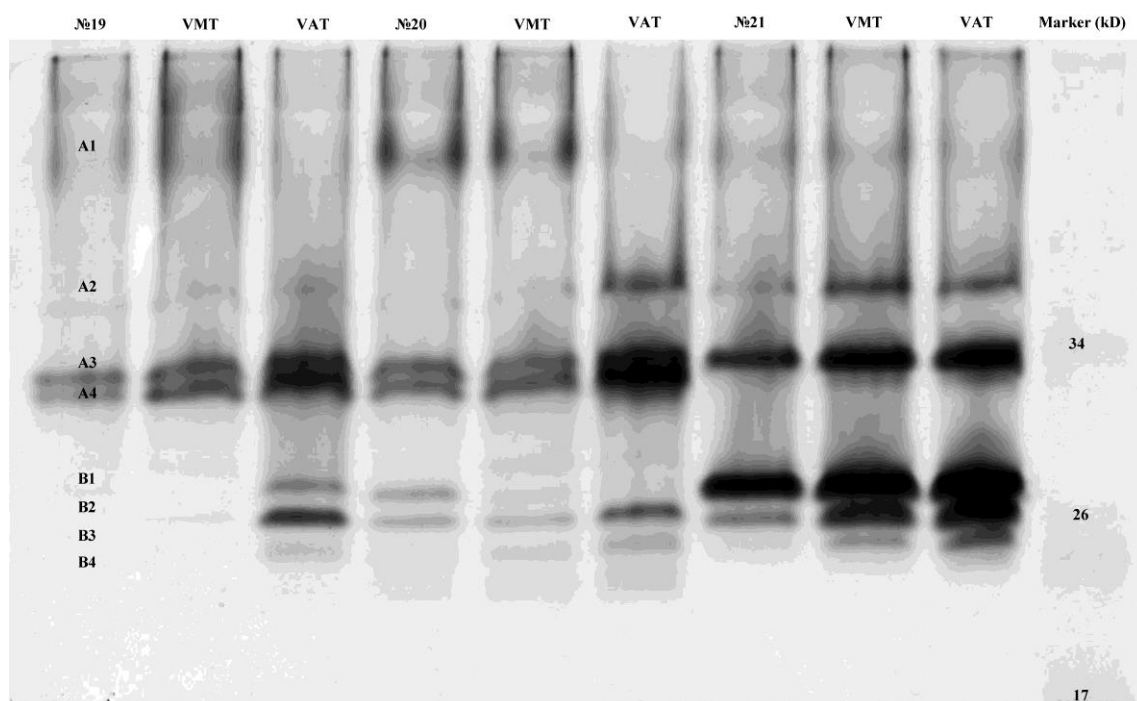


Fig.1. Profilurile electroforetice ale izoenzimelor peroxidazice în genotipurile tomatelor studiate nr.19 - nr.21 sub influența virusurilor mozaicului tutunului (VMT) și aspermiei tomatelor (VAT). În stânga sunt indicate denumirile zonelor peroxidazice prezente în probe, ultima pistă din dreapta – masele moleculare ale markerilor (17-45 kD). În partea de sus sunt numerele probelor în conformitate cu Tabelul.

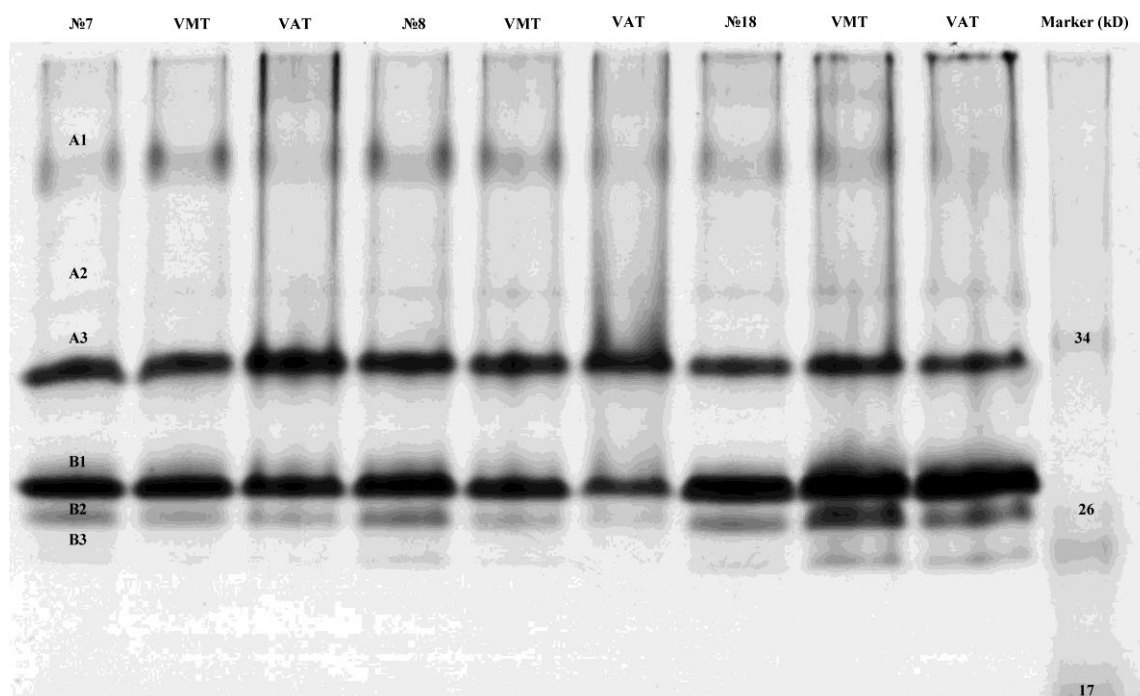


Fig.2. Profilurile electroforetice ale izoenzimelor peroxidazei în genotipurile tomatelor studiate nr.7, nr.8 și nr.18 sub influența virusurilor mozaicului tutunului (VMT) și aspermiei tomatelor (VAT).

Peroxidazele cu masa moleculară mare au fost desemnate în mod convențional ca zone A1, A2, A3, A4, iar cele cu masele moleculare mai mici – ca zone B1, B2, B3, B4 (Fig.3).

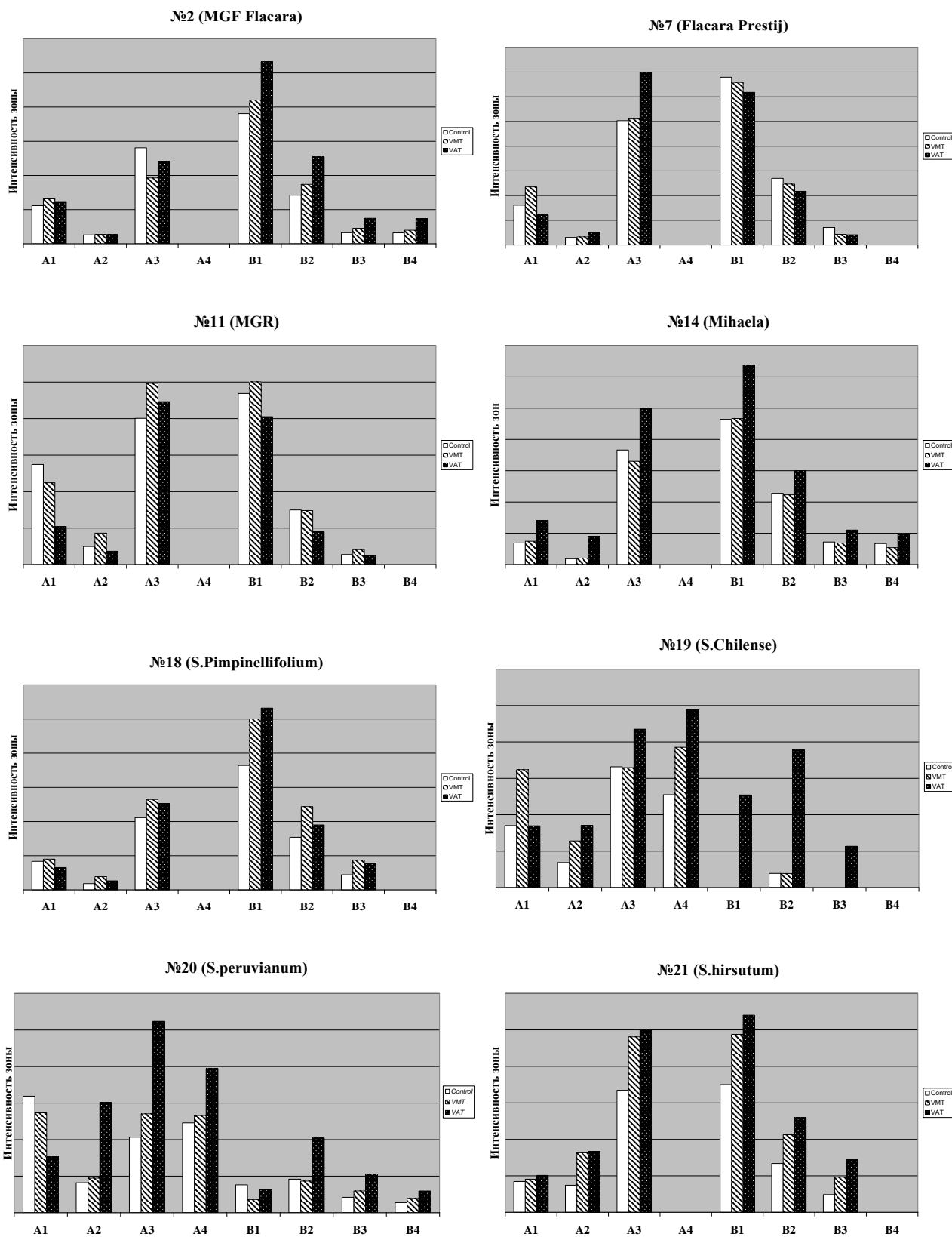


Fig.3. Modificările activității peroxidazice a izoenzimelor din probele de tomate studiate sub influența virusurilor mozaicului tutunului (VMT) și aspermiei tomatelor (VAT). Sub diagramă sunt indicate denumirile zonelor de izoenzyme peroxidazice.

Cea mai mare cantitate de enzime peroxidazice a fost identificată în proba nr.20, în care au fost detectate toate cele 8 izoforme de peroxidaze (A1-A4 și B1-B4). După cum s-a menționat mai sus, sub acțiunea virusului mozaicului tutunului, activitatea peroxidazică în această probă a crescut de 2,5 ori, iar sub acțiunea virusului aspermiei tomatelor – de 5,4 ori. Conform diagramei, în acest eșantion activitatea peroxidazelor a crescut datorită creșterii intensității zonelor A2-A4 și B2-B4; intensitatea zonelor A1 și B1, dimpotrivă, a scăzut.

În una dintre probe, și anume – în proba nr.19, au fost detectate 5 zone inițiale ale peroxidazei (A1-A4 și B2), dar sub influența virusului aspermiei tomatelor, în spectrul PO au apărut 2 zone noi de peroxidaze – B1 și B3; în plus, intensitatea zonelor A2-A4 și B1-B3 a crescut de 2,8 ori. Intensitatea zonelor A1, A2 și A4 sub influența virusului mozaicului tutunului a crescut de 1,75 ori.

În patru probe (nr.14, nr.1, nr.2, nr.3) au fost identificate 7 zone de izoenzime – A1-A3 și B1-B4. Dintre aceste eșantioane, cel mai interesant a fost eșantionul nr.14; sub influența virusului aspermiei tomatelor, activitatea sa totală a crescut cu 160%. Sub influența virusului aspermiei tomatelor, intensitatea tuturor zonelor a crescut semnificativ, în special a crescut intensitatea zonelor A2 (de 4,9 ori) și A1 (de 2 ori). Sub influența virusului mozaicului tutunului, în acest eșantion nu au existat modificări semnificative în activitatea peroxidazelor.

În majoritatea genotipurilor analizate (și anume, 14 genotipuri) s-au detectat 6 izoforme de peroxidaze – A1, A2, A3 și B1, B2, B3. Dintre aceste genotipuri, 7 nu au expus o creștere a activității peroxidazelor totale sub influența virusurilor.

Printre alte genotipuri au manifestat interes genotipurile nr.21, nr.18 și nr.7. În probele nr.21 și nr.18, atât sub influența virusului mozaicului tutunului, cât și sub influența virusului aspermiei tomatelor, se remarcă creșterea intensității zonelor A2-A3 și B1-B3. În genotipul nr.7, sub influența virusului mozaicului tutunului, intensitatea zonei A1 a crescut semnificativ (de 1,4 ori), deși sub influența virusului aspermiei tomatelor intensitatea zonelor A2 s-a modificat (de 1,7 ori) și A3 (de 1,4 ori).

Concluzii

1. Dintre soiurile de tomate studiate, cea mai mare rezistență la ambele virusuri (virusul mozaicului tutunului și virusul aspermiei tomatelor) au speciile spontane: *S. peruvianum*, *S. chilense*, *S. hirsutum*, *S. pimpinellifolium*.

2. Patru soiuri, și anume – Mihaela, Jacota, MGF x Flacara și MGF, au prezentat o reacție defensivă semnificativă doar la virusul aspermiei tomatelor, în timp ce răspunsul lor la virusul mozaicului tutunului a fost fie nesemnificativ, fie negativ.

3. Prezența unui spectru larg de izoenzime peroxidazice în speciile spontane *S. peruvianum* (8 izoforme) și *S. chilense* (7 izoenzime) contribuie, aparent, la rezistența ridicată la virusuri.

Referințe:

- АНДРЕЕВА, В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. Москва: Наука, 1988, с.8-40.
- ПОЛЕСКАЯ, О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода: Учебное пособие. Москва: КДУ, 2007. 140 с.
- РУБИН, Б.А. Физиология и биохимия дыхания растений: Учебное пособие. Москва: Изд-во Московского ун-та, 1974. 512 с.
- ДОЛГИХ, Ю.И. Селекция на осмоустойчивость кукурузы *in vitro* и характеристика растений – регенератов. В: Физиология растений, 1994, Т.41, №1, с.114-117.
- BAYSAL FURTANA, G., TIPIRDAMAZ, R. Physiological and antioxidant response of three cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salinity. In: *Turk. J. Biol.*, 2010, vol.34, p.287-296.
- РОГОЗИН, В.В. Пероксидаза: строение и механизм действия. Иркутск: Изд-во ИГТУ, 2004. 200 с.
- ЗЕМЛЯНУХИН, А.А. Практикум по биохимии: Учебное пособие. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1993. 188 с.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. In: *Annals of the NY Academy of Science*, 1964, no.121, p.404-427.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. In: *Anal. Biochem.*, 1976, no.72, p.248-254.

Notă: Lucrarea a fost realizată în cadrul Proiectului 20.80009.7007.04 „Biotehnologii și procedee genetice de evaluare, conservare și valorificare a agrobiodiversității”, finanțat de Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare.

Date despre autori:

Angela RUDACOVA, doctor în științe biologice; cercetător coordonator în LCS *Biochimia Plantelor*, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: rud-as@mail.ru

ORCID: 0000-0001-9638-2151

Serghei RUDACOV, cercetător științific în LCȘ *Biochimia Plantelor*, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: Rudacov@yahoo.com

ORCID: 0000-0003-2591-6114

Ala CHERDIVARĂ, cercetător științific în LCȘ *Biochimia Plantelor*, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: alacherdivara@mail.ru

ORCID: 0000-0003-1276-4959

Liliana MĂRÎI, șef laborator *Biotehnologii vegetale*, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

E-mail: lilimaryi@gmail.com

ORCID: 0000-0003-3702-3583

Larisa ANDRONIC, director al Institutului de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor.

E-mail: andronic.larisa@yahoo.com

ORCID: 0000-0002-2761-9917

Prezentat la 14.04.2021