УДК 635.655:632.4
EDN LMZYJS

Блинова А. А., Тарасова О. Н., Разанцвей Д. Р., Иваченко Л. Е.

ОКСИДОРЕДУКТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ СЕМЯН СОИ В УСЛОВИЯХ ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИИ *SEPTORIA GLYCINES* HEMMI

ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои»

Реферат. *Одним из распространенных заболеваний сои является некротрофический патоген – гриб Septoria glycines Hemmi. Грибковая инфекция вызывает окислительный стресс в растениях, сопровождается усилением образования активных форм кислорода и перекисного окисления липидов. В формировании защитно-приспособительной реакции растения на действия стресса немаловажная роль отводится антиоксидантым ферментам класса оксидоредуктазы (супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), пероксидаза (ПОД), полифенолоксидаза (ПФО)). Цель исследования заключалась в изучении изменения активности супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы в семенах сои в условиях грибковой инфекции S. glycines. Исследования проводили на семенах селекции ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои» в 2020 г. Активность супероксиддисмутазы и каталазы определяли спектрофотометрическим методом, активность пероксидазы и полифенолоксидазы – колориметрическим методом, электрофоретические спектры ферментов – методом электрофореза в полиакриламидном геле. Содержание белка определяли методом Лоури; малоновый диальдегид – по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Влияние патогена приводит к повышению содержания малонового диальдегида, что свидетельствует о возникновении окислительного стресса, сопровождающегося изменением удельной активности антиоксидантных ферментов класса оксидоредуктаз, а также изменением их множественных форм. Среди исследованных сортов сои для сорта Сентябринка выявлено низкое содержание МДА (0,09 мкмоль/г сырой массы), а значит незначительный окислительный стресс, на фоне которого была установлена невысокая удельная активность СОД (44,69 ед./мг белка) и максимальное снижение активности ПОД (0,97 ед./мг белка) и ПФО (0,30 ед./мг белка). Методом энзим электрофореза выявили высокую гетерогенность СОД (от 6 до 12 форм) и ПОД (от одной до пяти), низкую − КАТ и ПФО (варьирует от одной до трех форм). Для исследуемых сортов сои установлены стабильные и устойчивые формы ферментов СОД11, СОД12, СОД14, КАТ5, ПОД12, ПОД17, ПФО14. В заражённых семенах сои с высокой встречаемостью обнаружены формы СОД13, СОД15, КАТ8, ПОД14 и ПФО15, которые вероятно, принимают активное участие в адаптивных реакциях сои к воздействию исследуемого биотического стресса. Высокая гетерогенность СОД и ПОД, а также чувствительность к воздействию внешних факторов позволяет их использовать в качестве маркеров адаптации к патогену S. glycines Hemmi.*

Ключевые слова: *соя (Glycine max (L.) Merr.), септориоз, окислительный стресс, малоновый диальдегид, антиоксиданты, оксидоредуктазы, множественные формы.*

Для цитирования: *Блинова А. А., Тарасова О. Н., Разанцвей Д. Р., Иваченко Л. Е. Оксидоредуктазная активность семян сои в условиях грибковой инфекции Septoria glycines Hemmi // Таврический вестник аграрной науки. 2022. № 4(32). С. 20–33. EDN: LMZYJS.*

For citation: *Blinova A. A., Tarasova O. N., Razantsvei D. R., Ivachenko L. E. Oxidoreductase activity of soybean seeds under conditions of fungal infection Septoria glycines Hemmi // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2022. No. 4(32). P. 20–33. EDN: LMZYJS.*

Введение

Соя (*Glycine max* (L.) Merrill) является важнейшей мировой сельскохозяйственной культурой для получения полноценного белка, масла с невысоким содержанием насыщенных высших жирных кислот. Расширение площадей по производству сои в отсутствии мер сохранения почвенного плодородия повлияло на агроэкосистемы и изменило распространение, частоту и интенсивность болезней сои. В последнее десятилетие заболевания позднего сезона, вызываемые преимущественно некротрофными грибами, стали наиболее важной патологией, снижающей урожайность сои, что вызывает катастрофические последствия для экономики крупного сельскохозяйственного производства [1].

Одним из распространенных заболеваний сои является некротрофический патоген – грибковая инфекция (гриб) *Septoria glycines* Hemmi, которая вызывает септориоз (ржавая пятнистость) сои [1–4]. Споры *S. glycines* и других грибковых патогенов распространяются главным образом ветром и/или дождевыми каплями и имеют решающее значение для развития эпидемий на сельскохозяйственных культурах, в том числе на сое [3, 5–7]. Маленькие коричневые пятна развиваются на листьях в нижнем ярусе и продвигаются по растению по мере продвижения к среднему, а затем к верхнему ярусу. Отдельные поражения могут объединяться, вызывая стрессовое состояние растений сои, провоцируя их хлороз, после чего происходит преждевременная дефолиация [3, 4, 6–8].

Инфекция *S. glycines* вызывает окислительный стресс в растениях, который сопровождается усилением образования активных форм кислорода (АФК), в результате чего происходит повышение перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушение клеточного метаболизма, синтеза нуклеиновых кислот, белков и целостности мембран [9]. В процессе ПОЛ снижается количество полиненасыщенных жирных кислот, что приводит к повышению вязкости клеточных мембран, нарушению работы связанных с мембранами ферментных систем и гибели клетки [10]. В организме растений АФК не только инициируют в клетках окислительный стресс, но и выполняют роль сигнальных молекул, запускающих активацию адаптивных механизмов, которые повышают устойчивость растений к стрессовым факторам [11]. В формировании защитно-приспособительной реакции растения на действия стресса вовлечены многие физиологические и биохимические процессы [12], в первую очередь активизируются компоненты антиоксидантной защиты [13]. Среди антиоксидантов выделяют ферментативные и неферментативные, включающие флавоноиды, каротиноиды, витамины и др. К антиоксидантным ферментам в первую очередь относятся оксидоредуктазы, которые являются универсальным индикатором состояния растения. Они инактивируют АФК, защищая биополимеры, расположенные в различных тканевых структурах и клеточных компартментах [14]. В группу оксидоредуктаз включают супероксиддисмутазу (СОД, ЕС 1.15.1.1), каталазу (КАТ, ЕС 1.11.1.6), пероксидазу (ПОД, ЕС 1.11.1.7), полифенолоксидазу (ПФО, ЕС 1.10.3.1) [15].

Чесноков Ю. В. отметил различия белков по электрофоретической подвижности, обусловленные аллельными замещениями в структурной части гена, которые можно использовать при анализе изменений генотипического состава популяций так же, как морфологические различия, связанные с маркерными локусами [16]. Ранее проведённые нами исследования по изучению влияния *S. glycines* на биохимические процессы сои выявили изменения удельной активности

ферментов и их множественных форм, что способствует формированию адаптации сои к биотическому стрессу [2, 17].

Цель исследований – изучение изменения активности супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы в семенах сои в условиях грибковой инфекции *S. glycines*.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования являлись семена сортов сои селекции ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои» (ФНЦ «ВНИИ сои»), подверженные воздействию грибковой инфекции *S. glycines*. Материал выращен в 2019 г., отобран и проанализирован в 2020 г. Выбранные нами для исследований сорта сои различались по устойчивости к септориозу (таблица 1) [18].

Семенной материал, зараженный грибковой инфекцией *S. glycines*, отбирали визуально по следующим морфологическим признакам: наличие на семядолях округлых красно-коричневых пятен диаметром 6–10 мм с многочисленными пикнидами [19–22]. Контролем выступали здоровые семена.

Таблица 1 – Сорта сои селекции ФГБНУ ФНЦ «ВНИИ сои», различающиеся по устойчивости к септориозу

Сорт	Устойчивость к септориозу
Топаз	высокоустойчив
Веретейка	среднеустойчив
Кружевница	устойчив
Сентябринка	устойчив
Умка	среднеустойчив
Даурия	устойчив
Золушка	устойчив
Лазурная	среднеустойчив

Анализ содержания малонового диальдегида (МДА) и активности оксидоредуктаз в семенах сои проводили в лаборатории биотехнологии ФНЦ «ВНИИ сои».

Для получения экстрактов растворимых белков соевых семян, содержащих ферменты класса оксидоредуктаз, навеску материала массой 0,5 г гомогенизировали и экстрагировали в фарфоровых ступках 15 мл раствора 0,15 М хлорида натрия в течение 15 минут при температуре 0–5 °С, затем центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об./мин [23]. После центрифугирования осадок отбрасывали, в надосадочной жидкости определяли содержание белка, МДА и активность оксидоредуктаз. Содержание белка определяли по методу Лоури на спектрофотометре CARY 50, при длине волны 750 нм напротив контроля в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см [23], МДА – по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), которая при высокой температуре и кислом значении pH протекает с образованием окрашенного триметинового комплекса. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре CARY 50 при длине волны 532 нм напротив контроля, содержащего реакционную смесь и экстракт белка, но без ТБК, в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см [24]. Активность СОД измеряли на спектрофотометре CARY 50, метод основан на ингибировании ферментом фотохимического восстановления тетразолиевого нитросинего, при 560 нм напротив темнового контроля в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см [25]. Активность КАТ определяли спектрофотометрическим методом при 240 нм по скорости разложения пероксида водорода с образованием воды и кислорода, напротив контроля в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см [26]. Активность ПОД измеряли колориметрическим методом

по А.Н. Бояркину в модификации А.Т. Мокроносова на КФК-2 при длине волны 670 нм в кювете с поглощающим слоем 2 см, по скорости реакции окисления бензидина до образования бензидинового синего в присутствии пероксида водорода [27]. Активность ПФО регистрировали на фотоэлектроколориметре КФК-2 по А.И. Ермакову, метод которого основан на измерении оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся при окислении пирокатехина за определенный промежуток времени (20 секунд), при длине волны 590 нм в течение 2 мин в кювете с поглощающим слоем 2 см [27]. Удельную активность оксидоредуктаз (ед./мг белка) и содержание МДА (мкмоль/г сырой массы) измеряли в двух биологических и трех аналитических повторностях.

Электрофоретические спектры исследуемых ферментов выявляли методом электрофореза на пластинках 8 % (КАТ, ПОД и ПФО) и 10 % (СОД) полиакриламидного геля в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad) [23, 28]. Окрашивание на геле форм ферментов проводили соответствующими гистохимическими методами [26, 28]. Для выявленных множественных форм (МФ) ферментов определяли значения их относительной электрофоретической подвижности (Rf) и строили схемы энзимограмм. Нумерация форм ферментов приведена от более высокоподвижных к низкоподвижным формам. Для каждой формы ранее присвоено сокращенное обозначение в соответствии со значениями их Rf (для каталазы КАТ1-КАТ 8, пероксидазы ПОД 1-ПОД 18, супероксиддисмутазы СОД 1-СОД 21, полифенолоксидазы ПФО 1-ПФО 19) [29].

Обработка результатов исследования выполнена с использованием статистической программы STATISTICA 10, графическое представление данных – с помощью программного обеспечения Excel (2010). Для оценки связи между активностями оксидоредуктаз и уровнем МДА использован коэффициент корреляции ($r_{кор}$). Достоверность изменений исследуемых параметров определяли по различиям средних значений (n = 6), используя критерий Стьюдента. В расчетах принят 5 % уровень значимости.

Результаты и их обсуждение

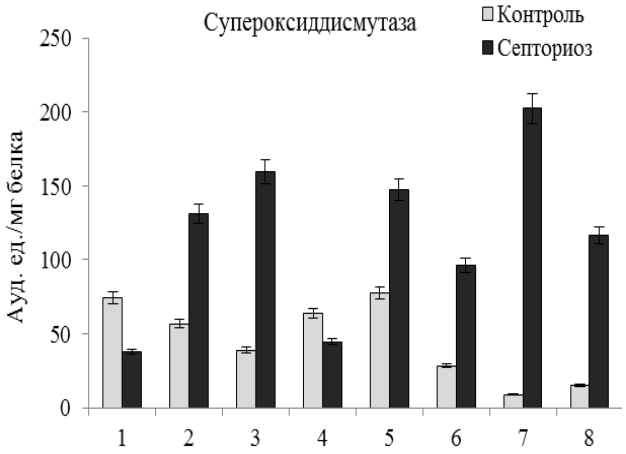
Изобилие осадков во второй половине лета приводит к интенсивному переувлажнению почвы и развитию патогенов на растениях сои. Заражение семян сои септориозом приводит к возникновению окислительного стресса и увеличению интенсивности ПОЛ. Конечным продуктом процесса окисления липидов в клетке является МДА, который служит показателем устойчивости сои к воздействию стресса [30]. В результате исследований установлено повышение в два и более раза относительно контроля (здоровые семена) содержания МДА в семенах, пораженных септориозом, устойчивых и среднеустойчивых к грибковым заболеваниям сортов сои Кружевница, Сентябринка, Умка и Лазурная, что свидетельствовало об усилении в них окислительного стресса (таблица 2). Одновременно с этим анализом результатов содержания МДА установлено отсутствие окислительного стресса в семенах высокоустойчивого и устойчивого сортов сои Топаз (0,25 мкмоль/г сырой массы) и Даурия (0,42 мкмоль/г сырой массы) соответственно, что свидетельствовало об устойчивости этих сортов к воздействию патогена. Наибольшее увеличение концентрации МДА (в четыре раза) выявлено в семенах среднеустойчивого сорта сои Веретейка (0,85 мкмоль/г сырой массы), наименьшее в 1,5 раза – устойчивого к патогену сорта Золушка (0,46 мкмоль/г сырой массы).

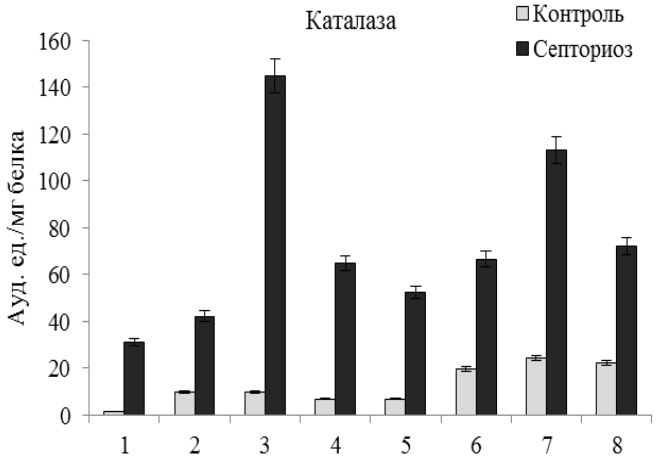
В результате проведенного анализа удельной активности исследуемых оксидоредуктаз установили, что эти показатели значительно варьировали в зависимости от исследуемого сорта сои и заражения грибковой инфекцией *S. glycines* (рисунок 1).

Таблица 2 – Содержание малонового диальдегида в исследуемых семенах сои

Сорт	Содержание МДА в семенах сои, мкмоль/г сырой массы	
	Контрольные семена	Семена, больные септориозом
Топаз	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Веретейка	0,21 ± 0,01	0,85 ± 0,03
Кружевница	0,31 ± 0,02	0,64±0,06
Сентябринка	0,09 ± 0,01	0,20±0,01
Умка	0,54 ± 0,01	1,23 ± 0,05
Даурия	0,42 ± 0,02	0,42 ± 0,01
Золушка	0,30 ± 0,01	0,46 ± 0,01
Лазурная	0,34 ± 0,01	0,70 ± 0,02

Так, удельная активность СОД и КАТ в заражённых семенах сои патогеном, за исключением Топаз и Сентябринка (для СОД), значительно повышалась для всех исследуемых сортов сои амурской селекции. Отмечено, что в здоровых семенах активность СОД и КАТ является обратнозависимой ($r_{кор}$ = –0,95), а в зараженных семенах зависимость этих ферментов становится пропорциональной ($r_{кор}$ = 0,64), что указывает на одинаковое включение этих ферментов в защитный механизм при биотическом стрессе. Анализ удельной активности ПФО показал ее снижение под влиянием патогена во всех сортах сои. Для ПОД определенных закономерностей не отмечено, так как для некоторых сортов установлено повышение активности, а для некоторых – снижение.





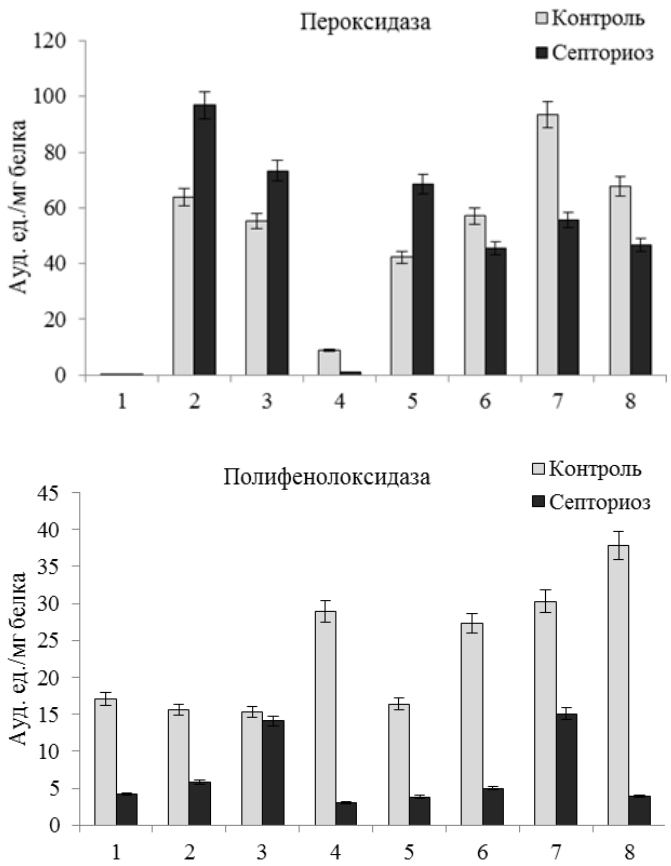


Рисунок 1 – Удельная активность оксидоредуктаз в контрольных и зараженных грибковой инфекцией *S. glycines* Hemmi семенах сортов сои

Примечание: *1 – Топаз, 2 – Веретейка, 3 – Кружевница, 4 – Сентябринка, 5 – Умка, 6 – Даурия, 7 – Золушка, 8 – Лазурная; На графиках указаны планки погрешностей – ошибка опыта.*

Анализ полученных результатов выявил некоторые закономерности общего характера. Так, в семенах сои сорта Топаз, в котором не выявлено изменение МДА и, следовательно, отсутствовало перекисное окисление липидов, отмечали незначительное снижение активности СОД (37, 91 ед./мг белка) и низкую активность ПОД (0,41 ед./мг белка), но при этом зафиксировали самое высокое увеличение активность КАТ (в 20 раз) среди исследуемых сортов. Также отмечено, что в семенах сои сорта Кружевница самую высокую удельную активность КАТ (144,78 ед./мг белка), и её увеличение по сравнению с контролем (9,97 ед./мг белка) составило в 14,4 раза. Среди исследованных сортов сои для сорта Сентябринка выявлено низкое содержание МДА (0,09 мкмоль/г сырой массы), а значит незначительный окислительный стресс, на фоне которого была установлена невысокая удельная активность СОД (44,69 ед./мг белка) и максимальное снижение активности ПОД (0,97 ед./мг белка) и ПФО (0,30 ед./мг белка). При этом отмечено значительное увеличение КАТ в 9,5 раз, что возможно связано с устойчивостью нового сорта к септориозу. Также наблюдали в семенах сои сорта Золушка значительное повышение СОД – в 23,4 раза.

Анализ множественных форм оксидоредуктаз не заражённых (контроль) и заражённых семян исследуемых сортов сои выявил высокую гетерогенность СОД (в образцах обнаружено от шести до 12 форм) и низкую – ферментов КАТ и ПФО (варьирует от одной до трех форм), у ПОД количество форм меняется от 1 до 5 (рисунок 2 и 3).

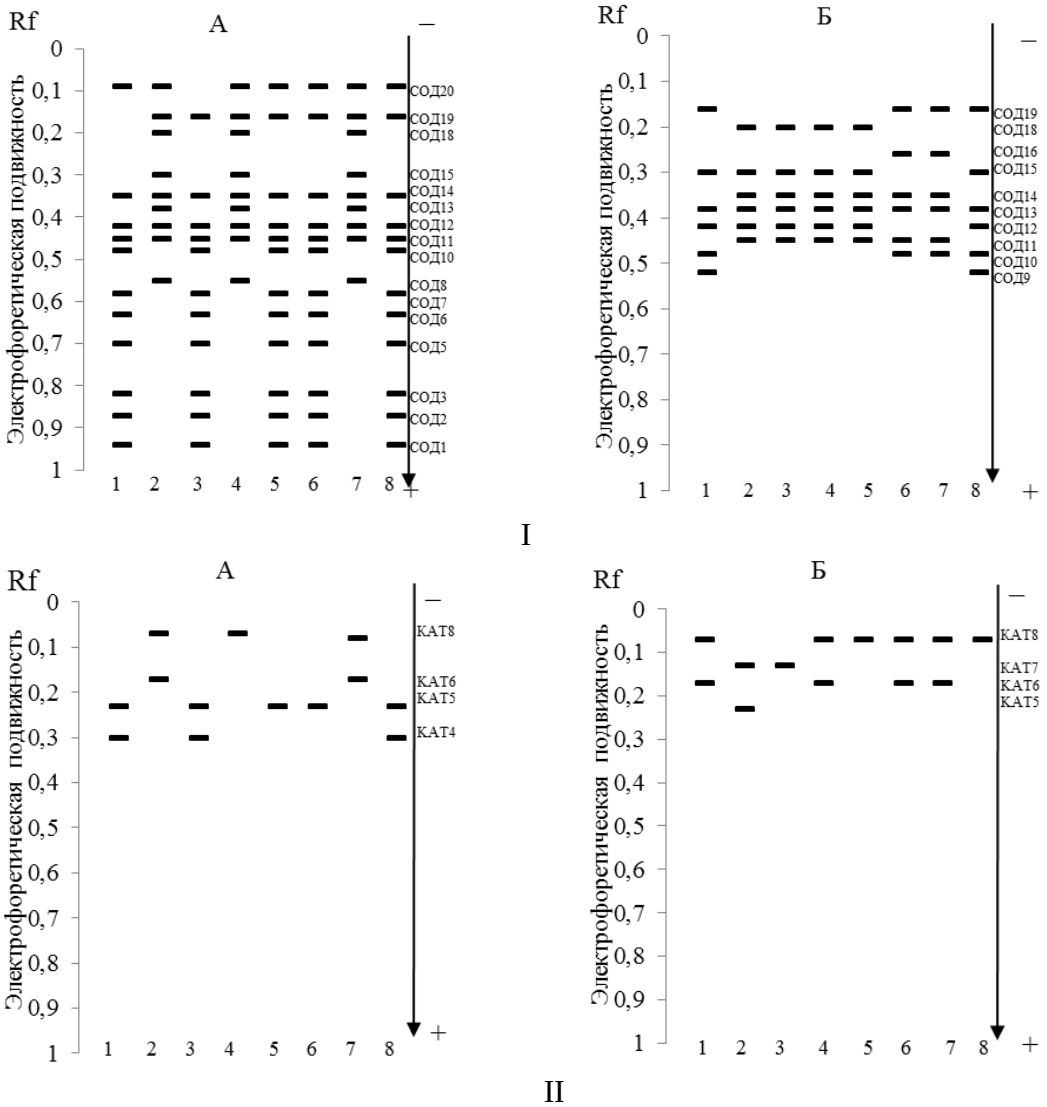


Рисунок 2 – Схема энзимограмм СОД (I) и каталазы (II) семян сои
А – контроль, Б – семена, зараженные *S. glycines* Hemmi

Примечание. *1 – Топаз, 2 – Веретейка, 3 – Кружевница, 4 – Сентябринка, 5 – Умка, 6 – Даурия, 7 – Золушка, 8 – Лазурная.*

Следует отметить в здоровых семенах очень высокую гетерогенность СОД (от девяти до 12 форм) и небольшое количество форм энзима в зараженных семенах (шесть форм, различающихся электрофоретической подвижностью), что указывает на высокую чувствительность этого антиоксидантного фермента к действию окислительного стресса, вызванного исследуемой грибковой инфекцией (см. рисунок 2).

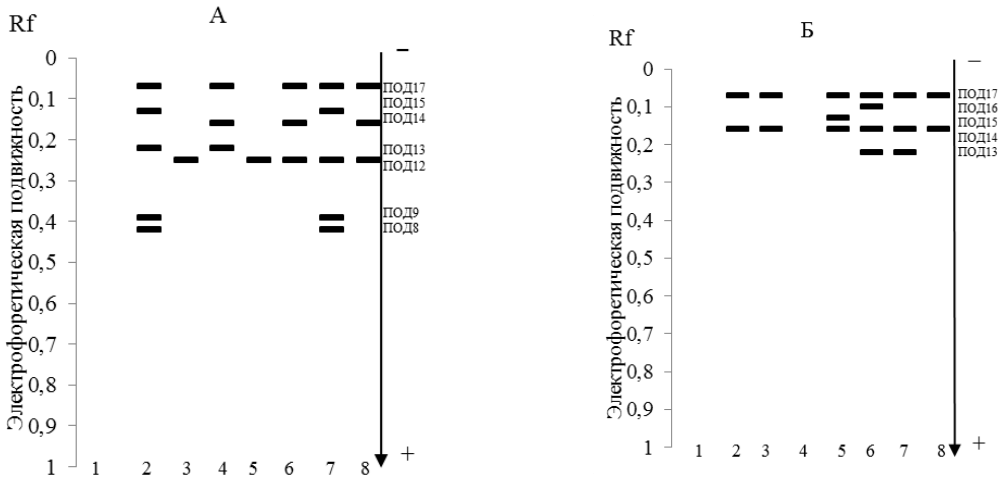
Установлено, что в зараженных семенах всех изучаемых сортов угнетаются все высокоподвижные формы с СОД 1 по СОД 8, имеющие низкую молекулярную массу, а также форма СОД 20, имеющая самую низкую электрофоретическую подвижность, что может быть связано с отсутствием их устойчивости к действию изучаемой болезни. Кроме того, выявлены множественные формы в диапазоне от СОД 9 до СОД 19 со средней электрофоретической подвижностью, что сопровождается повышением удельной активности фермента, для большинства изученных сортов сои (за исключением сортов Сентябринка и Топаз). Стабильными и устойчивыми, независимо от сорта являются формы СОД 11, СОД 12 и СОД 14,

обнаруженные во всех исследуемых образцах. Также в заражённых семенах сои выявлены с высокой встречаемостью формы СОД 13 и СОД 15, поэтому можно предположить, что данные пять форм фермента супероксиддисмутазы принимают участие в адаптивных реакциях сои к воздействию внешних факторов.

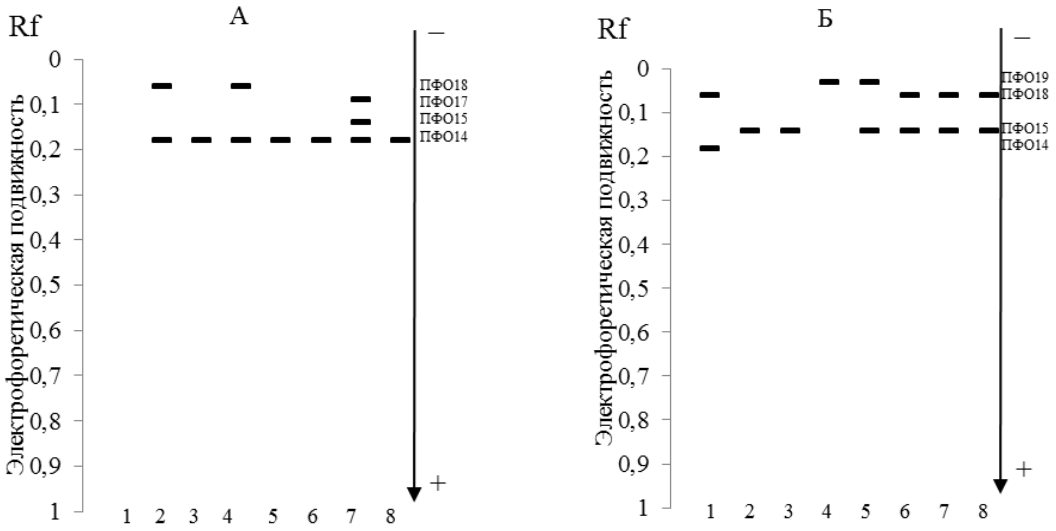
В ходе изучения электрофоретических спектров каталазы выявлено четыре формы фермента с невысокой подвижностью. В контрольных семенах обнаружена устойчивая форма КАТ 5, характерная для большинства исследуемых сортов сои, в зараженных семенах – КАТ 8 (кроме сортов Веретейка и Кружевница) (см. рисунок 2). В зараженных семенах сои сорта Кружевница установлена одна форма КАТ 7, обладающая самой высокой удельной активностью (144,8 ед./мг белка). Для зараженных семян сортов сои Умка и Лазурная обнаружена одна форма КАТ 8 с повышенной удельной активностью (в диапазоне 52,4–72,1 ед./мг белка). В здоровых семенах сои сорта Сентябринка обнаружена также одна форма КАТ 8, но с невысокой удельной активностью (6,9 ед./мг белка). В зараженных семенах сои с высокой встречаемостью выявлена форма КАТ 8, которая, вероятно, является адаптивной. Небольшое количество форм каталазы не позволяет самостоятельно использовать этот фермент для маркирования процесса адаптации, что решается только при сопоставлении данных с другими ферментами класса оксидоредуктаз.

Пероксидаза имеет изменчивый спектр множественных форм. Ранее нами выявлено 18 форм этого фермента. Анализ спектра множественных форм пероксидаз исследуемых образцов позволил установить восемь форм фермента, из которых в контрольных образцах с высокой встречаемостью выявлены устойчивые формы ПОД 12, а в больных семенах ПОД 14 и ПОД 17 (см. рисунок 3). Причем, ПОД 17 является самой стабильной формой, что подтверждается также ранее проведенными исследованиями при воздействии различных стрессовых факторов [25]. Следует отметить отсутствие множественных форм ПОД и низкую удельную активность фермента сортов Сентябринка и Топаз в зараженных септориозом семенах сои. Вероятно, в условиях незначительного окислительного стресса для этих сортов сои достаточным является повышенная удельная активность каталазы – важнейшего антиоксидантного фермента.

Для ПФО стабильной формой в здоровых семенах явилась ПФО 14, а в зараженных ПФО15, имеющие сходную электрофоретическую подвижность и близкие молекулярные массы (см. рисунок 3). Высокомолекулярные формы ПФО 17, ПФО 18, ПФО 19 показали достаточно высокую лабильность этих форм и их тонкую надстройку в условиях биотического стресса.



I



II

Рисунок 3 – Схема энзимограмм пероксидазы (I) и полифенолоксидазы (II) семян сои (А – контроль, Б – семена заражены *S. glycines* Hemmi)

Примечание. *1 – Топаз, 2 – Веретейка, 3 – Кружевница, 4 – Сентябринка, 5 – Умка, 6 – Даурия, 7 – Золушка, 8 – Лазурная.*

Выводы

Исследование сортов селекции ФНЦ ВНИИ сои больных септориозом показало, что в среднем уровень содержания МДА повысился примерно в два раза по сравнению с контролем, это свидетельствовало о повышении окислительного стресса в семенах сои в условиях грибковой инфекции. Установлена активная перестройка структур белковых молекул в ответ на воздействие биотического фактора (*S. glycines* Hemmi), а также значительные изменения удельной активности исследуемых ферментов класса оксидоредуктаз при возникновении окислительного стресса. Анализ множественных форм ферментов выявил высокую гетерогенность СОД и ПОД, низкую − КАТ и ПФО. Обнаружены независимо от сорта сои стабильные и устойчивые к влиянию стресса формы супероксиддисмутаз – СОД 11, СОД 12, СОД 13, СОД 14 и СОД 15; пероксидаз – ПОД 12, ПОД 14 и ПОД 17; каталаз – КАТ 5 и КАТ 8; полифенолоксидаз – ПФО 14 и ПФО 15. Высокая гетерогенность СОД и ПОД, а также их чувствительность к воздействию *S. glycines* Hemmi позволяет их использовать в качестве маркера адаптации к патогену.

Также следует отметить, что среди исследуемых сортов семян сои, удельная активность СОД (44,69 ед./мг белка), ПОД (0,97 ед./мг белка) и ПФО (0,3 ед./мг белка) заражённых семян сои сорта Сентябринка была ниже контрольных значений (64,05 ед./мг белка; 8,90 ед./мг белка; 2,89 ед./мг белка, соответственно). Вероятно, сорт устойчив к септориозу и может быть использован как стандарт для данного биотического стресса для дальнейших исследований сои.

Литература

1. Chalfoun N. R., Durman S. B., Gonzalez-Montaner J., Reznikov S., De Lisi V., Gonzalez V., Moretti E. R., Devani M. R., Ploper L. D., Castagnaro A. P., Welin B. Elicitor-based biostimulant PSP1 protects soybean against late season diseases in field trials // Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. No. 763. DOI: 10.3389/fpls.2018.00763.

2. Martinenko N. V., Lavrentyeva S. I., Tarasova O. N., Ivachenko L. E. Effect of Septoria on the specific activity of *Glycines max* (L.) Merr hydrolases // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IV International Scientific Conference: AGRITECH-IV-2020: Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies. 2021. Vol. 677. Art. No. 052089. DOI: 10.1088/1755-1315/677/5/052089.

3. Almeida A. M., Sibaldelli R. N., Lopes I. O., Oliveira M. C., Farias J. R. Horizontal and vertical droplet dispersion mimicking soybean – *Septoria glycines* pathosystem // European Journal of Plant Pathology. 2019. No. 154. P. 437–443. DOI: 10.1007/s10658-019-01667-5.

4. Cruz C., Mills D., Paul P., Dorrance A. Impact of brown spot caused by *Septoria glycines* on soybean in Ohio // Plant Disease. 2010. Vol. 94. No. 7. P. 820–826. DOI: 10.1094/PDIS-94-7-0820.

5. Martynenko N., Lavrentieva S., Tarasova O. Influence of *Septoria glycines* Hemmi on the enzymes' activity of hydrolytic *Glycines max* (L.) Merr seed complex // E3S Web of Conferences. International Scientific and Practical Conference "Fundamental and Applied Research in Biology and Agriculture: Current Issues, Achievements and Innovations" (FARBA 2021). 2021. Vol. 254. Art. No. 02020. DOI: 10.1051/e3sconf/202125402020.

6. Gu X., Ding J., Liu W., Yang X., Yao L., Gao X., Zhang M., Yang S., Wen J. Comparative genomics and association analysis identifies virulence genes of *Cercospora sojina* in soybean // BMC Genomics. 2020. Vol. 21. No. 17. DOI: 10.1186/s12864-020-6581-5.

7. Nascimento K., Debona D., Rezende D., DaMatta F., Rodrigues F. Changes in leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence on soybean plants supplied with silicon and infected by *Cercospora sojina* // Journal of Phytopathology. 2018. No. 166. P. 747–76. DOI: 10.1111/jph.12757.

8. Sautua F. J., Scandiani M. M., Gordo M., Carmona M.A., Tartabini M.L., Luque A.G. Detection and chemical control of *Cercospora sojina* infecting soybean seed in Argentina // Tropical Plant Pathology. 2018. Vol. 43. P. 552–558. DOI: 10.1007/s40858-018-0245-x.

9. Норкулов Н. Х., Норкулова З. Х., Солиева Б. А., Каспарова И. С., Ойзода Н. Х., Диловарова Н. С., Хакимова Р. Ш., Алиев К. А., Абдуллаев Х. А. Содержание малонового диальдегида и активность супероксиддисмутазы у хлопчатника при стрессе // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. 2019. Т. 62. № 3–4. С. 242–246.

10. Попов В. Н., Нарайкина Н. В. Изменение активности антиоксидантных ферментов при низкотемпературном закаливании *Nicotiana tabacum* L. и *Secale cereale* L. // Физиология растений. 2020. Т. 67. № 5. С. 538–546. DOI: 10.31857/S0015330320050115.

11. Абилова Г. А. Влияние салицилата натрия на физиолого-биохимические показатели проростков пшеницы при действии тяжелых металлов // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2020. Т. 10. № 2(33). С. 274–283. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-2-274-283.

12. Аленькина С. А., Никитина В. Е. Влияние лектинов азоспирилл на содержание активных форм кислорода в корнях проростков пшеницы при тепловом и солевом стрессах // Агрохимия. 2018. № 11. С. 78–86. DOI: 10.1134/S0002188118110030.

13. Колмогорова Е. Ю., Цандекова О. Л Влияние насаждений *Pinus sylvestris* L. на активность компонентов антиоксидантной системы у бобовых растений // Самарский научный вестник. 2020. Т. 9. № 2(31). С. 73–77. DOI: 10.17816/snv202112.

14. Чупахина Г. Н., Масленников П. В., Скрыпник Л. Н., Чупахина Н. Ю., Федураев П. В. Антиоксидантные свойства культурных растений Калининградской области. Калининград: Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, 2016. 145 с.

15. Кузнецова В. А., Иваченко Л. Е., Блинова А. А., Семёнова Е. А. Влияние ЭкстраКора и ЭкоЛарикса на активность пероксидаз, полифенолоксидаз и супероксиддисмутаз проростков сои, пораженных комплексом болезней // Естественные и технические науки. 2019. № 11(137). С. 60–63. DOI: 10.25633/ETN.2019.11.04.

16. Чесноков Ю. В. Биохимические маркеры в генетических исследованиях культурных растений: применимость и ограничения // Сельскохозяйственная биология. 2019. Т. 54. № 5. С. 863–874. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.5.863rus.

17. Кузнецова В. А., Блинова А. А., Тарасова О. Н., Иваченко Л. Е. Активность оксидоредуктаз семян и проростков сои в условиях грибковой инфекции *Septoria glycines* Hemmi // Аграрный вестник Урала. 2020. № 7(198). С. 47–55. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-198-7-47-55.

18. Фокина Е. М., Беляева Г. Н., Синеговский М. О., Синеговская В. Т., Клеткина О. О. Каталог сортов сои // Под общей редакцией академика РАН Синеговской В. Т. Благовещенск: ООО «ИПК «ОДЕОН», 2021. 69 с.

19. Физиология растений: учебник для студентов вузов // Под ред. Ермакова И. П. М.: Академия, 2007. 304 с.

20. Хохряков М. К., Доброзракова Т. Л., Степанов К. М., Летова М. Ф. Определитель болезней растений // Под ред. Хохрякова М. К. СПб.: Лань, 2003. 592 с.

21. Пересыпкин В. Ф. Сельскохозяйственная фитопатология: учеб. для вузов. М.: Агропромиздат, 1989. 480 с.

22. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. М.: Колос, 1979. 420 с.

23. Молекулярная биология. Практикум: учебное пособие для вузов // Под редакцией Коничева А. С. М.: Издательство Юрайт, 2020. 169 с.

24. Рогожин В. В., Рогожина Т. В. Практикум по биохимии сельскохозяйственной продукции: учеб. пособие для вузов. СПб.: ГИОРД, 2016. 480 с.

25. Никерова К. М., Галибина Н. А., Мощенская Ю. Л., Новицкая Л. Л., Подгорная М. Н., Софронова И. Н. Ферменты антиоксидантной системы – индикаторы разных сценариев ксилогенеза: в раннем онтогенезе и во взрослом состоянии (на примере *Betula pendula* Roth) // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. 2018. № 6. С. 68–80. DOI: 10.17076/eb787.

26. Сибгатуллина Г. В., Хаертдинова Л. Р., Гумерова Е. А., Акулов А. Н., Костюкова Ю. А., Никонорова Н. А., Румянцева Н. И. Методы определения редокс-статуса культивируемых клеток растений: учебно-методическое пособие. Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, 2011. 61 с.

27. Коробко В. В., Касаткин М. Ю. Физиология растений. Большой практикум: Учебное пособие для студентов биологического факультета. Саратов: Издательство «Саратовский источник», 2017. 120 с.

28. Стручкова И. В., Кальясова Е. А. Теоретические и практические основы проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле: Электронное учебно-методическое пособие. Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. 60 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Struchkova_Kalyasova.pdf (дата обращения 27.01.2022).

29. Кузнецова В. А. Роль молекулярных маркеров в формировании устойчивости сои к окислительному стрессу // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: Сборник тезисов докладов 19-ой Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, М.: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», 2019. С. 93–94.

30. Рахматуллина Н. Ш., Акиншина Н. Г., Азизов А. А., Раджабова Г. Г. Показатели антиоксидантной системы *Artemisia annua* L., *Matricaria chamomilla* L. и *Tanacetum vulgare* L. в естественных условиях произрастания и в городской среде // Научное обозрение. Биологические науки. 2020. № 4. С. 28–32. DOI: 10.17513/srbs.1210.

References

1. Chalfoun N. R., Durman S. B., Gonzalez-Montaner J., Reznikov S., De Lisi V., Gonzalez V., Moretti E. R., Devani M. R., Ploper L. D., Castagnaro A. P., Welin B. Elicitor-based biostimulant PSP1 protects soybean against late season diseases in field trials // Frontiers in Plant Science. 2018. Vol. 9. No. 763. DOI: 10.3389/fpls.2018.00763.

2. Martinenko N. V., Lavrentyeva S. I., Tarasova O. N., Ivachenko L. E. Effect of Septoria on the specific activity of *Glycines max* (L.) Merr hydrolases // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IV International Scientific Conference: AGRITECH-IV-2020: Agribusiness, Environmental Engineering and Biotechnologies. 2021. Vol. 677. Art. No. 052089. DOI: 10.1088/1755-1315/677/5/052089.

3. Almeida A. M., Sibaldelli R. N., Lopes I. O., Oliveira M. C., Farias J. R. Horizontal and vertical droplet dispersion mimicking soybean – *Septoria glycines* pathosystem // European Journal of Plant Pathology. 2019. No. 154. P. 437–443. DOI: 10.1007/s10658-019-01667-5.

4. Cruz C., Mills D., Paul P., Dorrance A. Impact of brown spot caused by *Septoria glycines* on soybean in Ohio // Plant Disease. 2010. Vol. 94. No. 7. P. 820–826. DOI: 10.1094/PDIS-94-7-0820.

5. Martynenko N., Lavrentieva S., Tarasova O. Influence of *Septoria glycines* Hemmi on the enzymes' activity of hydrolytic *Glycines max* (L.) Merr seed complex // E3S Web of Conferences. International Scientific and Practical Conference "Fundamental and Applied Research in Biology and Agriculture: Current Issues, Achievements and Innovations" (FARBA 2021). 2021. Vol. 254. Art. No. 02020. DOI: 10.1051/e3sconf/202125402020.

6. Gu X., Ding J., Liu W., Yang X., Yao L., Gao X., Zhang M., Yang S., Wen J. Comparative genomics and association analysis identifies virulence genes of *Cercospora sojina* in soybean // BMC Genomics. 2020. Vol. 21. No. 17. DOI: 10.1186/s12864-020-6581-5.

7. Nascimento K., Debona D., Rezende D., DaMatta F., Rodrigues F. Changes in leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence on soybean plants supplied with silicon and infected by *Cercospora sojina* // Journal of Phytopathology. 2018. No. 166. P. 747–76. DOI: 10.1111/jph.12757.

8. Sautua F. J., Scandiani M. M., Gordo M., Carmona M.A., Tartabini M.L., Luque A.G. Detection and chemical control of *Cercospora sojina* infecting soybean seed in Argentina // Tropical Plant Pathology. 2018. Vol. 43. P. 552–558. DOI: 10.1007/s40858-018-0245-x.

9. Norkulov N. Kh., Norkulova Z. Kh., Solieva B. A., Kasparova I. S., Oyzoda N. Kh., Dilovarova N. S., Khakimova R. Sh., Aliev K. A., Abdullaev Kh. A. Contents of malon dialdehyde and activity of a superoxide dismutase in a cotton under stress // Reports of the National Academy of Sciences of Tajikistan. 2019. Vol. 62. No. 3–4. P. 242–246.

10. Popov V. N., Naraykina N. V. Changes in the activity of antioxidant enzymes during low-temperature hardening of *Nicotiana tabacum* L. and *Secale cereale* L. // Fiziologiya rastenij. 2020. Vol. 67. No. 5. P. 538–546. DOI: 10.31857/S0015330320050115.

11. Abilova G. A. Effect of sodium salicylate treatment on physiological and biochemical parameters of wheat seedlings under the influence of heavy metals // Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology. 2020. Vol. 10. No. 2(33). P. 274–283. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-2-274-283.

12. Alen'kina S. A., Nikitina V. E. Effect of azospirillum lectins on the content of reactive oxygen species in wheat seedling roots under heat and salt stresses // Agrohimia. 2018. No. 11. P. 78–86. DOI: 10.1134/S0002188118110030.

13. Kolmogorova E. Yu., Tsandekova O. L. The effect of *Pinus sylvestris* L. plantings on the components activity of legumes antioxidant system // Samara Journal of Science. 2020. Vol. 9. No. 2(31). P. 73–77. DOI: 10.17816/snv202112.

14. Chupakhina G. N., Maslennikov P. V., Skrypnik L. N., Chupakhina N. Yu., Feduraev P. V. Antioxidant properties of cultivated plants of the Kaliningrad region. Kaliningrad: Immanuel Kant Baltic Federal University, 2016. 145 p.

15. Kuznetsova V. A., Ivachenko L. E., Blinova A. A., Semenova E. A. Influence of extracor and ecolarix on the activity of peroxidases, polyphenoloxidases and superoxiddismutases of soybean sprines influenced by the complex of diseases // Natural and technical sciences. 2019. No. 11(137). P. 60–63. DOI: 10.25633/ETN.2019.11.04.

16. Chesnokov Yu. V. Biochemical markers in genetic investigations of cultivated crops: the pros and cons (review) // Sel'skokhozyaistvennaya Biologia [Agricultural Biology]. 2019. Vol. 54. No. 5. p. 863–874. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.5.863rus.

17. Kuznetsova V. A., Blinova A. A., Tarasova O. N., Ivachenko L. E. Activity of oxidoreductase of seeds and soybean seedlings under conditions of fungal infection *Septoria glycines* Hemmi // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. No. 7(198). P. 47–55. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-198-7-47-55.

18. Fokina E. M., Belyaeva G. N., Sinegovsky M. O., Sinegovskaya V. T., Kletkina O. O. Catalog of soybean varieties // Under the general editorship of Sinegovskaya V. T. – Academician of the Russian Academy of Sciences. Blagoveshchensk: LLC «IPK «ODEON», 2021. 69 p.

19. Plant Physiology: a textbook for university students // Ed. by Ermakova I. P. Moscow: Akademiya, 2007. 304 p.

20. Khokhryakov M. K., Dobrozrakova T. L., Stepanov K. M., Letova M. F. Handbook of plant disease identification // Ed. by Khokhryakova M. K. Saint-Petersburg: Lan, 2003. 592 p.

21. Peresypkin V. F. Agricultural phytopathology: textbook. for universities. Moscow: Agropromizdat, 1989. 480 p.

22. Dospekhov B. A. Methods of field research. Moscow: Kolos, 1979. 420 p.

23. Molecular biology. Practicum: textbook for universities // Ed. by Konichev A. S. Moscow: Yurayt Publishing House, 2020. 169 p.

24. Rogozhin V. V., Rogozhina T. V. Workshop on the biochemistry of agricultural products: textbook for universities. Saint-Petersburg: GIORD, 2016. 480 p.

25. Nikerova K. M., Galibina N. A., Moshchenskaya Yu. L., Novitskaya L. L., Podgornaya M. N., Sofronova I. N. The antioxidant enzymes – indicators of different xylogenesis scenarios: in early ontogeny and in adult plants (example of *Betula pendula* Roth) // Transactions of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences" (Transactions of KarRC RAS). 2018. No. 6. P. 68–80. DOI: 10.17076/eb787.

26. Sibgatullina G. V., Khaertdinova L. R., Gumerova E. A., Akulov A. N., Kostyukova Yu. A., Nikonorova N. A., Rumyantseva N. I. Methods for determining the redox status of cultivated plant cells: teaching aid. Kazan: Kazan (Privolzhsky) Federal University, 2011. 61 p.

27. Korobko V. V., Kasatkin M. Yu. Plant Physiology. Large workshop: Textbook for students of the Faculty of Biology. Saratov: "Saratovskiy istochnik", 2017. 120 p.

28. Struchkova I. V., Kalyasova E. A. Theoretical and practical foundations of protein electrophoresis in polyacrylamide gel: Electronic teaching aid. Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod State University, 2012. 60 p. [Electronic resource]. Access point: http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Struchkova_Kalyasova.pdf (reference's date 27.01.2022).

29. Kuznetsova V. A. The role of molecular markers in cell resistance to oxidative stress // Biotechnology in crop production, animal husbandry and agricultural microbiology: Collection of abstracts of the 19th All-Russian Conference of Young Scientists dedicated to the memory of Academician of the Russian Academy of Agricultural Sciences Georgy Sergeevich Muromtsev. Moscow: Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology", 2019. P. 93–94.

30. Rakhmatullina N. Sh., Akinshina N. G., Azizov A. A., Radzhabova G. G. Indicators of antioxidant system of *Artemisia annua* L., *Matricaria chamomilla* L., and *Tanacetum vulgare* L. under natural growing conditions and in the urban environment // Scientific Review. Biological Sciences. 2020. No. 4. P. 28–32. DOI: 10.17513/srbs.1210.

UDC 635.655:632.4

Blinova A. A., Tarasova O. N., Razantsvei D. R., Ivachenko L. E.

OXIDOREDUCTASE ACTIVITY OF SOYBEAN SEEDS UNDER CONDITIONS OF FUNGAL INFECTION *SEPTORIA GLYCINES* HEMMI

Summary. *One of the common soybean diseases is a necrotrophic pathogen – Septoria glycines Hemmi fungus. Fungal infection causes oxidative stress in plants and is accompanied by increased formation of reactive oxygen species and peroxidation of lipids. Antioxidant enzymes of the oxidoreductase class (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD), polyphenol oxidase (PPO)) play an important role in the formation of the plant's protective and adaptive reaction to stress. Therefore, the aim of our research was to study the change in the activity of superoxide dismutase, catalase, peroxidase and polyphenol oxidase in soybean seeds under conditions of fungal infection S. glycines. The studies were carried out in 2020. G. max seeds used in our research were of FSC "All-Russian Research Institute of Soybeans" breeding. The activity of superoxide dismutase and catalase was determined by spectrophotometric method; peroxidase and polyphenol oxidase activity – by colorimetric method; electrophoretic spectra of enzymes – by electrophoresis in a polyacrylamide gel. The protein content was determined by the Lowry method; malonic dialdehyde – by reaction with thiobarbituric acid. It was detected that the influence of the pathogen leads to an increase in the content of malonic dialdehyde, which indicates the occurrence of oxidative stress accompanied by a change in the specific activity of antioxidant enzymes of the oxidoreductase class, as well as a change in their multiple forms. Among the studied soybean varieties, only 'Sentyabrinka' had a low content of MDA (0.09 μmol/g of raw mass), which means that oxidative stress was insignificant. Moreover, we additionally noted a low specific activity of SOD (44.69 units/mg of protein), as well as a maximum decrease in the activity of POD (0.97 units/mg of protein) and PPO (0.30 units/mg of protein). The method of enzyme electrophoresis revealed high heterogeneity of SOD (from 6 to 12 forms) and POD (from 1 to 5); low heterogeneity of CAT and PPO (varies from 1 to 3 forms). The enzyme electrophoresis method revealed high heterogeneity of SOD (from 6 to 12 forms) and POD (from 1 to 5), low heterogeneity of CAT and PPO (from 1 to 3 forms). For the studied varieties of soybean, stable and steady forms of SOD11, SOD12, SOD14, CAT5, POD12, POD17, PPO14 enzymes were established. In infected soybean seeds, forms of SOD13, SOD15, CAT8, POD14 and PPO15 were found. They likely take an active part in the adaptive reactions of soybean to the effects of the studied biotic stress. High heterogeneity of SOD and POD, as well as sensitivity to external factors, allow using them as markers of adaptation to the pathogen S. glycines Hemmi.*

Keywords: *soybean (Glycine max (L.) Merr.), Septoria, oxidative stress, malonic dialdehyde, antioxidant, oxidoreductase, multiple forms.*

Блинова Анастасия Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои»; 675027, Россия, Амурская обл., г. Благовещенск, ул. Игнатьевское шоссе, 19; e-mail: baa@vniisoi.ru.

Тарасова Ольга Николаевна, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои»; 675027, Россия, Амурская обл., г. Благовещенск, ул. Игнатьевское шоссе, 19; e-mail: ton@vniisoi.ru.

Разанцвей Дина Раисовна, научный сотрудник лаборатории селекции и генетики сои ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои»; 675027, Россия, Амурская обл., г. Благовещенск, ул. Игнатьевское шоссе, 19; e-mail: rdr@vniisoi.ru

Иваченко Любовь Егоровна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБНУ ФНГЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт

сои»; 675027, Россия, Амурская область, г. Благовещенск, ул. Игнатьевское шоссе, 19; e-mail: ivachenko-rog@yandex.ru.

Blinova Anastasia Andreevna, junior researcher of the Laboratory of biotechnology, FSBSI FSC “All-Russian Research Institute of Soybeans”; 19, Ignatievskoe shosse, Blagoveshchensk, Amur Region, 675027, Russia; e-mail: baa@vniisoi.ru.

Tarasova Olga Nikolaevna, junior researcher of the Laboratory of biotechnology, FSBSI FSC “All-Russian Research Institute of Soybeans”; 19, Ignatievskoe shosse, Blagoveshchensk, Amur Region, 675027, Russia; e-mail: ton@vniisoi.ru.

Razantsvei Dina Raisovna, researcher of the Laboratory of biotechnology, FSBSI FSC “All-Russian Research Institute of Soybeans”; 19, Ignatievskoe shosse, Blagoveshchensk, Amur Region, 675027, Russia; e-mail: rdr@vniisoi.ru.

Ivachenko Lyubov Egorovna, Dr. Sc. (Biol.), leading researcher of the Laboratory of biotechnology, FSBI FSC “All-Russian Research Institute of Soybeans”; 19, Ignatievskoe shosse, Blagoveshchensk, Amur Region, 675027, Russia; e-mail: ivachenko-rog@yandex.ru.

Дата поступления в редакцию – 11.05.2022.
Дата принятия к печати – 21.10.2022.