

положительной температуры ($t = 45^{\circ}\text{C}$ в течение 2 и 12 часов);

3. Воздействие на растения сои (по фазам развития) низкой положительной температуры ($t = 5^{\circ}\text{C}$ в течение 2 и 48 часов).

Для изучения влияния высокой температуры растения в вегетационных сосудах помещали в термостат (45°C), низкой температуры – в холодильную камеру (5°C). Определение антиоксидантов проводили в течение всего периода вегетации (по фазам развития) сразу после воздействия температуры и через 7 суток. Контрольными служили растения, не подвергавшиеся температурному воздействию.

Влияние избыточного и недостаточного увлажнения почвы на продуктивность и антиоксидантную систему *G. max* и *G. soja*

Схема вегетационного опыта № 2:

1. Контроль – 70% полной влагоемкости (ПВ) весь период вегетации;
2. 135% ПВ – весь период вегетации;
3. 35% ПВ – весь период вегетации;
4. 35% ПВ – всходы - цветение; затем перевод на 70% ПВ;
5. 135% ПВ – всходы - цветение; затем перевод на 70% ПВ;
6. 70% ПВ – всходы - цветение; затем перевод на 35% ПВ;
7. 70% ПВ – всходы - цветение; затем перевод на 135% ПВ.

Полив проводили по весу до установленной для опыта оптимальной влажности. Предварительно определяли полную влагоемкость и влажность почвы, которую использовали для набивки сосудов. Вес сосудов находили, суммируя вес тарированного сосуда, песка, добавленного снизу и сверху сосуда при набивке и посеве, каркаса, сухой почвы и найденного путем расчета необходимого количества воды.

Влияние продолжительности светового дня на продуктивность и антиоксидантную систему *G. max* и *G. soja*

Схема полевого опыта:

1. Контроль (естественные условия, 16 часов период «всходы – цветение»);

2. Короткий день (12 часов период «всходы – цветение»).

Двенадцатичасовой день создавали искусственно путем затемнения растений с 20 часов вечера до 8 часов утра. Площадь питания одного растения 5×45 см. Для каждой повторности одного сорта высевали по четыре рядка длиной – 1,25 м с междурядьями – 45 см. Площадь делянки составляла 6,75 м², повторность опыта – 4-кратная. Уход за растениями и уборку осуществляли вручную.

Для изучения устойчивости сои к воздействию биотических факторов был заложен полевой опыт (2008-2011 гг.). Сою высевали вручную на глубину 4-5 см, с площадью питания одного растения 3×45 см. Такой способ посева способствует созданию естественного инфекционного фона. Площадь делянки – 29,25 м², ширина междурядий – 45 см, длина рядка – 5 м. Повторность 4-кратная, расположение делянок рендомизированное.

Для изучения влияния агроклиматических условий выращивания сои на урожайность и биохимические показатели полевые опыты (2010-2013 гг.) были заложены на опытном поле ФГБОУ ВО Дальневосточный ГАУ, на селекционном поле ФГБНУ ДВ НИИСХ, на учебно-опытном поле ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ, на опытном поле ФГБНУ Ершовская ОСОЗ НИИСХ Юго-Востока по следующей схеме: семена каждого сорта сои высевали в 4-х повторностях по 25 штук с междурядьями – 45 см, с площадью питания одного растения 5×45 см. Площадь учетной делянки – 2,8 м².

В полевых опытах сою размещали после черного пара. В процессе роста сои отмечали следующие фазы развития: всходы, первый и третий тройчатый лист, ветвление, цветение, бобообразование, созревание. Наступление фаз развития растений сои отмечали по методике, прописанной в пособии «Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур» (1985). Уборку и учет урожая проводили в фазе полной спелости по делянкам в соответствии с традиционными методиками вручную (Доспехов Б.А., 1985).

2.3.2 Оценка устойчивости растений сои к болезням

Для оценки устойчивости сои к болезням, растения обследовали непосредственно в поле по 10 штук на делянке в следующие фазы: всходы, первый и третий тройчатый лист, цветение, бобообразование. Все учёты проводили по методике ВИР (Корсаков Н.И. и др., 1979).

Распространенность болезни (Р) при равномерно рассеянном ее проявлении определяли по количеству больных растений или отдельных его органов в процентах от общего числа обследованных растений и вычисляли по формуле (1):

$$P = \frac{n \cdot 100}{N}, \quad (1)$$

где Р – процент больных растений; n – число больных растений в пробе; N – общее число растений в пробе.

Подсчитав количество пораженных растений по повторностям, вычисляли средний процент по варианту. Степень поражения растений служит качественным показателем патологического процесса. По степени поражения растений в баллах определяли развитие болезни в процентах (R) по формуле (2):

$$R = \frac{\sum(a \cdot b) \cdot 100}{N \cdot K}, \quad (2)$$

где: R – процент развития болезни; \sum – сумма произведений; a – число пораженных растений; b – балл поражения растений; N – общее количество учтенных растений; K – высший балл шкалы учета.

Степень поражения или процент развития болезни характеризуется количеством пятен. Для диагностики устойчивости сои к листо-стеблевым болезням (септориозу и пероноспорозу) пользовались шкалой (табл. 3) (Голубев А.А., 1976; Корсаков Н.И. и др., 1979).

Таблица 3 – Шкала для оценки пораженности растений сои болезнями (Голубев А.А., 1976; Корсаков Н.И. и др., 1979)

Степень поражения	Оценка			Иммунологическая характеристика
	по 5-балльной шкале	по классификатору ВИР	%	
Оч. слабое	1	1	1-10	УУ – высокоустойчивый
Слабое	2	3	11-25	У – устойчивый
Среднее	3	5	26-50	С – среднеустойчивый
Сильное	4	7	51-75	В – восприимчивый
Оч. сильное	5	9	75-100	ВВ – сильновосприимчивый

Поражение корневой системы оценивали по методике ВИЗР (Котова В.В., Степанова М.Ю., 1979).

Поражаемость корней наружной гнилью и увядание определяется по побуревшей площади корней, а внутренней гнилью по побуревшей части поперечного среза корневой шейки, согласно шкале (Корсаков Н.И. и др., 1979):

0 – здоровое растение,

1 – слабое поражение, побурением охвачено до 10% поверхности или среза,

2 – заметное поражение, побурение наблюдается на 11-25% поверхности,

3 – среднее поражение, побуревшая часть составляет 26-50%,

4 – сильное поражение, заболеванием охвачено 51-75% ткани, пораженная ткань темно-бурая, сильно выражена дуплистость,

5 – очень сильное поражение, поражено свыше 75% поверхности, растение увядает и гибнет.

При диагностике заболеваний сои использовались макроскопический визуальный и культуральный методы. Вначале проводили внешний осмотр пораженного растения (органа), определяли типичные симптомы, на

основании чего делали предварительное заключение о типе болезни. Для уточнения возбудителя, его выделяли на питательные среды и выращивали в соответствующих условиях. Идентификацию патогенов проводили методом микроскопирования (Дудка И.А. и др., 1982; Новосадов И.Н., Дубовицкая Л.К., Положиева Ю.В., 2017).

Определение заражённости семян болезнями проводили по ГОСТ 12044-93. Для проращивания семян использовали два слоя фильтровальной бумаги, которую сворачивали в рулон. Рулоны ставили вертикально в сосуды и помещали в термостат при температуре 22-25°C. Обследование семян проводили в сроки определения всхожести семян по ГОСТ 12038-84.

В каждой из четырёх проб подсчитывали количество семян, заражённых каждой болезнью, и общее количество заражённых семян. Заражённость семян (X) в процентах вычисляли по формуле (3):

$$X = \frac{N}{n} \cdot 100, \quad (3)$$

где: N – суммарное количество заражённых семян в четырёх пробах, шт.;
n – общее количество семян, взятых для анализа, шт.

2.3.3 Биохимические методы исследования

Биохимические исследования по определению энзиматической активности и низкомолекулярных антиоксидантов проводили в научно-исследовательской лаборатории «Соя» ФГБОУ ВО Дальневосточный ГАУ и биохимической лаборатории ФГБОУ ВО «Благовещенский государственный педагогический университет».

Для выделения растворимых белков из биологического материала (проростков, листьев, семян) навеску биологического материала (1 г) гомогенизировали в фарфоровой ступке при температуре 4°C 0,15М раствором NaCl (для определения активности каталазы) или 0,2М ацетатным буфером pH 5,4 (для определения активности пероксидазы) в течение 15

минут. Полученный экстракт центрифугировали в течение 15 минут при 3 тыс. об/мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость фильтровали через слой капроновой ткани для удаления липидной пленки и использовали для дальнейшего анализа (Иваченко Л.Е., Ефимова Г.П., 1995; Иваченко Л.Е., Шаройко В.И., Ефимова Г.П., 1997).

Активность пероксидазы (КФ 1.11.1.7) определяли по методу А.Н. Бояркина (Бояркин А.Н., 1951; Малый..., 1994) модификации Л.Е. Иваченко, Г.П. Ефимовой (1995). Метод основан на образовании окрашенных продуктов при окислении бензидина под действием фермента, содержащегося в растениях, до образования продукта окисления синего цвета (n,n'-диаминдифенилхинона). Об активности пероксидазы судили по времени развития окраски до определенного значения оптической плотности (значение D выбирают в зависимости от скорости развития окраски в пределах от 0,25 до 0,5).

Расчет активности пероксидазы вели по формуле (4):

$$A = \frac{D(\alpha\beta\gamma)}{td}, \quad (4)$$

где: А – активность фермента, выраженная в относительных единицах на 1 г навески за 1 с; D – зарегистрированная в опыте оптическая плотность; t – время, с; d – толщина слоя жидкости, см; α , β , γ – степень разведения: α – отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, мл, к массе навески, г; β – степень дополнительного разведения вытяжки после центрифугирования (если это требовалось); γ – степень постоянного разведения вытяжки в кювете.

Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли газометрическим методом (Методы ..., 1987; Иваченко Л.Е., Шаройко В.И., Ефимова Г.П., 1997). Метод основан на определении объема кислорода, выделившегося после прибавления H_2O_2 к экстракту из растений, содержащего каталазу. Активность каталазы выражается в миллилитрах кислорода, который

выделяется под действием фермента из 1 г растительного материала за 3 минуты (учитывали содержание белка в пробе и разбавление).

Удельную активность ферментов рассчитывали в единицах на 1 мг белка. Определение общего белка в экстрактах проводили методом О.Н. Lowry (Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А., 1982; Lowry O.H. et al., 1951) или биуретовым методом (Методы ..., 1987).

Аскорбиновую кислоту определяли методом титрования краской Тильманса (Плешков Б.П., 1985). Метод определения аскорбиновой кислоты основан на ее редуцирующих свойствах. Аскорбиновую кислоту извлекали из растений 1% HCl и раствор титруют 2,6–дихлорфенолиндофенолом (реактив Тильманса).

Содержание аскорбиновой кислоты в растениях выражали в миллиграммах на 100 г исследуемого материала (мг%) и вычисляли по формуле (5):

$$X = \frac{a \cdot b \cdot T \cdot 100}{d \cdot n}, \quad (5)$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты, мг%; a – число миллилитров краски (с вычетом на титрование смеси кислот, используемой для экстракции), пошедшей на титрование (среднее из двух титрований); T – титр краски (мг аскорбиновой кислоты на 1 мл); 100 – общий объем экстракта, мл; b – количество экстракта, взятого для титрования, мл; n – навеска исследуемого материала, г.

Каротин экстрагировали бензином и определяли фотоколориметрическим методом (Плешков Б.П., 1985). Количество каротина вычисляли по формуле (6):

$$X = \frac{(a \cdot D_1 \cdot V \cdot 100)}{D_2 \cdot n}, \quad (6)$$

где X – содержание каротина, мг на 100 г; a – количество миллиграммов каротина в 1 мл, которому соответствует стандартный раствор (обычно 0,00235 мг, если был взят азобензол и 0,00416 мг, если был взят бихромат калия); D₁ – оптическая плотность исследуемого раствора; D₂ – оптическая

плотность стандарта; V – объем раствора каротина, мл; n – навеска материала, г.

Токоферол – методом, основанным на образовании хинонов при окислении молекул токоферола хлорным железом (Методы ..., 1987; Кисилевич Р.Ш., Скварко С.И., 1972). К аликвоте липидного экстракта приливали 1 мл этанола; 0,2 мл хлороформа; 0,2 мл – 0,2% дипиридила; 0,2 мл – 0,2% $FeCl_3$. Измерение проводили при длине волны 490 нм против контроля, в котором вместо липидного экстракта добавляют идентичный объем этанола. В качестве стандарта при построении калибровочного графика использовали α -токоферол.

Содержание витаминов рассчитывали в мг%. Все анализы проводили в двух биологических и трех аналитических повторностях.

Для выявления множественных молекулярных форм ферментов использовали диск-электрофорез в 7,5% полиакриламидном геле при температуре 4°C по методике В.Л. Дэйвис (1964) в модификации В.И. Сафонова, М.П. Сафоновой (1971). Электрофоретическое разделение проводили на приборе для электрофореза SE 250 (фирмы Amersham Biosciences). В качестве метчика использовали бромфеноловый синий. По окончании электрофореза проводили специфическое окрашивание зон активности ферментов (Сафонов В.И., Сафонова М.П., 1971; Грушин А.А., Ивакин А.П., 1986). Выявление пероксидазы после электрофореза проводили бензидиновым реагентом в ацетатном буфере с рН 4,7. Гель помещали на 20 минут в бензидиновый реагент, а затем переносили в 0,1% раствор H_2O_2 , через несколько секунд в зонах с пероксидазной активностью появлялась синяя окраска. Для прекращения реакции гели тщательно промывали холодной водой и выдерживали в 7% уксусной кислоте в течение 1-2 часов.

Для выявления локализации каталазы в гель предварительно вводили крахмал. После электрофореза гель помещали на 5 минут в 1% раствор H_2O_2 , затем промывали дистиллированной водой и заливали 2% К₂С₂О₈. Перекись водорода разрушается в зонах с каталазной активностью. Остальная

поверхность геля окрашивалась в синий цвет, так как присутствие H_2O_2 вызывает окисление КJ и происходит образование синего йодокрахмального комплекса.

Основным критерием для характеристики множественных молекулярных форм ферментов была их относительная электрофоретическая подвижность (R_f). Значения R_f рассчитывали исходя из длин пробега данной белковой фракции и краски метчика по формуле (7):

$$R_f = a/A, \quad (7)$$

где a – длина пробега данной белковой фракции от границы между концентрирующим и разделяющим гелями до зоны её локализации на колонке; A – длина пробега краски метчика. Тожественными считали те формы ферментов, различия в величинах R_f которых не превышали 0,01 в пределах от 0,1 до 0,3; 0,02 в пределах от 0,3 до 0,6; 0,03 – более 0,6.

Содержание в семенах сои белка, жира, аминокислотный и жирнокислотный состав определяли на ИК-анализаторе «Nir Sistem 5000» в аналитической лаборатории ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сои». Все анализы выполнялись в трех аналитических повторностях.

2.3.4 Статистическая обработка полученных результатов

Математическая обработка экспериментальных данных проведена методами дисперсионного, регрессионного и корреляционного анализов (Плохинский Н.А., 1970; Доспехов Б.А., 1985; Короневский В.И., 1985; Лакин Г.Ф., 1990).

Расчет экологической пластичности (коэффициента регрессии – b_i) и стабильности (вариансу стабильности – S^2d_i) проведен по методике S.A. Eberhart и W.A. Russell (1966), изложенной В.З. Пакудиным (1976, 1980).

Для расчета коэффициента регрессии использовали формулу (8):

$$b_i = \frac{\sum_j (X_{ij} \times I_j)}{\sum_j I_j^2}, \quad (8)$$

где X_{ij} - урожайность i -го сорта в j -условиях; I_j – индекс условий среды для j -го места и года испытания.

Индексы среды рассчитывали по формуле (9):

$$I_j = (\sum_i x_{ij} / V) - (\sum_i \sum_j x_{ij} / V \times n), \quad (9)$$

где $\sum_i x_{ij}$ – сумма урожайности всех сортов в j -й год испытания; V – число испытываемых сортов; n – число испытаний (пункты и годы); $\sum_i \sum_j x_{ij}$ – сумма урожаев всех сортов по всем годам и пунктам.

Для определения стабильности реакции сортов сои на изменение условий выращивания рассчитывали дисперсию стабильности ($S^2 d_i$) как степень отклонения от регрессии урожайности. Чем ниже дисперсия, тем выше стабильность. Рассчитывали дисперсию стабильности по формуле (10):

$$S^2 d_i = \frac{\sum_j d_{ij}^2}{n-2}, \quad (10)$$

где d_{ij} – отклонение фактического значения признака от теоретического i -го сорта в j -й год испытания; n – число степеней свободы.

Стрессоустойчивость сортов определяли по А.А. Rossielle, J. Hamblin (1981) в изложении А.А. Гончаренко (2005), по уравнению (11):

$$(Y_{\min} - Y_{\max}) \quad (11)$$

Этот параметр имеет отрицательный знак, и чем его величина меньше, тем выше стрессоустойчивость сорта.

Коэффициент вариации признаков ($V\%$) рассчитывали согласно рекомендациям Б.А. Доспехова (1985) по формуле (12):

$$V = \frac{\sigma \cdot 100\%}{\bar{x}}, \quad (12)$$

где V – коэффициент вариации признака; \bar{x} – средняя арифметическая признака; σ – среднее квадратичное отклонение. Определение уровня варьирования признаков осуществляли по следующей классификации: $V < 10\%$ – низкий уровень, $V = 11 - 25\%$ – средний, $V > 25\%$ – высокий.

Показатель гомеостатичности оценивали по следующей формуле (13) (Хангильдин В.В., 1979):

$$H_{om} = \frac{\bar{x}^2}{\sigma \cdot (\bar{x}_{opt} - \bar{x}_{lim})}, \quad (13)$$

где H_{om} – показатель гомеостатичности генотипа; \bar{x} – обобщенное среднее значение урожайности, ц/га; \bar{x}_{opt} – оптимальное среднее значение урожайности, ц/га; \bar{x}_{lim} – лимитированное среднее значение урожайности, ц/га; σ – среднее квадратичное отклонение.

Для определения характера корреляционных связей использовали градацию Б.А. Доспехова (1985): связь слабая – $r < 0,30$; $r = 0,3-0,7$ – средняя; $r > 0,7$ – сильная.

Для всех средних величин рассчитывалась стандартная ошибка, статистически значимые различия оценивали, используя критерий Стьюдента (Доспехов Б.А., 1985). Обработка экспериментальных данных выполнена с использованием стандартных компьютерных программ Microsoft Office Excel.

Выводы по второй главе

1. Агроклиматические и погодные условия в регионах проведения исследований характеризовались разнообразными условиями в отношении количества осадков и среднесуточных температур, типа почв, что позволило установить соответствие условий выращивания сои биологическим требованиям культуры, выявить лимитирующие факторы.

2. Методологической основой исследований является системный подход в познании механизмов адаптации сои к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам внешней среды и её взаимосвязи с урожайностью растений. Оценка адаптивности генотипов сои должна проводиться комплексно с использованием визуальных, морфобиометрических, биохимических и статистических методов.

ГЛАВА 3 ОНТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ *G. MAH* И *G. SOJA* К УСЛОВИЯМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Процесс онтогенетической адаптации растений представляет собой сложный комплекс приспособительных реакций (специфических и неспецифических) и затрагивает структурную и функциональную оптимизацию всех уровней и структур: молекулярный, субклеточный, клеточный, тканевый, органнй, организменный, популяционный, видовой, биоценотический. Диапазон и характер адаптивных реакций в онтогенезе оказываются специфичными для вида, экотипа, сорта. Причем к одним и тем же условиям окружающей среды разные виды могут приспосабливаться за счет различных механизмов и способов и, наоборот, за счет одного механизма может обеспечиваться одновременно приспособление к разным факторам среды (Удовенко Г.В., 1979; Жученко А.А., 2001).

В основе онтогенетической адаптации растений лежит модификационная изменчивость физиологических, биохимических и морфологических приспособительных реакций, находящихся под генетическим контролем (Жученко А.А., 2001). Важная роль в онтогенетической адаптации растений принадлежит ферментам, которые поддерживают постоянство метаболизма при влиянии различных факторов среды (Хочачка П., Сомеро Дж., 1977). Кроме этого, ключевые регуляторные ферменты представлены в виде изоферментных систем (Уилкинсон Дж., 1968; Райдер К., Тейлор К., 1983; Корочкин Л.И., 1987; Глазко В.И., Созинов И.А., 1993; Markert C.L., 1975). Присутствие в клетке изоферментов, различающихся по структурным, физико-химическим и кинетическим свойствам, клеточной компартментализации, а также ткане- и видоспецифичности наряду с другими механизмами, обеспечивает быструю и тонкую регуляцию клеточного метаболизма в условиях приспособления организма к постоянным изменениям внешней среды (Ньюсхолм К., Старт Э., 1977; Райдер К., Тейлор К., 1983).

Особый интерес представляет изучение динамики активности и электрофоретического спектра в процессе развития растений некоторых оксидоредуктаз, позволяющих противостоять различным неблагоприятным воздействиям и являющихся важнейшими инструментами сохранения гомеостаза обмена веществ – пероксидазы и каталазы.

Пероксидазы растений (КФ 1.11.1.7), так называемые классические (неспецифические), относятся к мультифункциональным ферментам (Tognolli M. et al., 2002). Пероксидаза представляет собой двухкомпонентный фермент – железопротеин, трехвалентное железо которого не меняет своей валентности в процессе катализа. Фермент локализован в клеточной стенке, митохондриях, хлоропластах, ядре, цитоплазме и других органеллах. Специфичность распределения пероксидаз связана с выполнением ферментом различных физиологических функций (Саундерс Б.К. 1972; Андреева В.А., 1988; Газарян И.Г., 1992; Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И., 2006; Максимов И.В. и др., 2011; Колупаев Ю.Е., 2016; Gaspar Th. et al., 1991; Christensen J.H. et al., 2001; Duroux L., Welinder K.G., 2003; Passardi F. et al., 2004). Основной функцией пероксидазной системы является защита растительного организма от активных форм кислорода (АФК) (Ivanov S. et al., 2001; Wyrwicka A., Sklodowska M., 2006; Yannarelli G.G., Gallego S.M., Tomaro M.L., 2006; Galvez-Valdivieso G., Mullineaux P.M., 2010), а также участие в обеспечении протекания многих других реакций, в которых пероксид водорода используется как окислитель (Садвакасова Г.Г., Кунаева Р.М., 1987; Рогожин В.В., 2004; Passardi F. et al., 2004). Установлено, что фермент обладает не только пероксидазными, но и оксидазными свойствами (Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х., 2003; Максимов И.В., Черепанова Е.А., 2006; Максимов И.В. и др., 2011; Колупаев Ю.Е., 2016; Zhao L., Sakai K., 2003). Пероксидазы отличаются не только полифункциональностью, но и полиморфностью (Bingchang Z. et al., 1992). Полиморфизм фермента увеличивает адаптационные возможности растений (Созинов А.А., 1985; Иваченко Л.Е., 2012).

Каталаза (КФ 1.11.1.6) представляет собой гемсодержащий фермент, катализирующий разложение перекиси водорода на воду и молекулярный кислород. Каталаза обнаружена почти во всех клетках растительного и животного происхождения (Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N., 1997). Однако в литературе мало сведений об активности этого фермента в растительных тканях. Лишь в отдельных работах изучалось состояние каталазы некоторых растений (Акулова Е.А., 1974; Droillard M.J., Paulin A., Massot J.C., 1987; Filipe M.R., Lucas M.M., Porlono J.M., 1988). В растениях присутствуют различные молекулярные формы фермента (Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N., 1997; Yang Y., Poovaiah B.W., 2002).

В отечественной и зарубежной литературе имеются сведения относительно состава и активности ферментов в онтогенезе растений (Ережепов А., 1984; Сарсенбаев К.Н., 1986; Алексеев В.Г., 1994, Шуляковская Т.А., 1994; Иванова З.А., Вафина Г.Х., 1997; Ишеева О.Д., 2010; Нимаева О.Д., Прадедова Е.В., Саляев Р.К., 2014; Cots J., Widmer F., 1999; Biles C.L. et al., 2000). Активность пероксидазы и её изозимный состав могут отражать изменения метаболизма растений в онтогенезе, начиная с очень ранних его стадий. Е.В. Будилова и др. (1971) наблюдали резкое повышение пероксидазной активности и изменение числа изоферментов в процессе прорастания семян черных русских бобов, причем активность фермента всегда была выше в зародыше, чем в семядолях.

Тканевая и внутриклеточная специфичность, зависимость от возраста и условий окружающей среды свойственны изоферментам эстеразы, пероксидазы, полифенолоксидазы и алкогольдегидрогеназы (Яаска В., 1977, 1985; Schmidt P.P.S., Feucht W., 1980; Sasaki T. et al., 2002; Zolfaghari R., Hosseini S.M., Korori S.A.A., 2010).

Известно, что различные оксидазы неодинаково реагируют на изменения в окружающей среде, в связи с этим в разных органах растений в онтогенезе могут преобладать те или иные ферменты (Дэвис Д., Джованели Дж., 1966; Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А., 1975; Рубин Б.А.,

Ладыгина М.Е., 1977; Плешков Б.П., 1980; Gaspar Th. et al., 1991; Almagro L. et al., 2009; Zolfaghari R., Hosseini S.M., Korori S.A.A., 2010).

Органоспецифичность спектра пероксидазы в онтогенезе показана для риса (Яковлев Б.В., Алешин Е.П., Молоков Л.Г., 1975; Pai C., Endo T., Oka H.I., 1973; Endo T., 1981), петунии (Berg V.M. van den, Wijsman H.J.W., 1981; Berg V.M. van den, Bianchi F., Wijsman H.J.W., 1983), ячменя (Felder M.R., 1976), кукурузы (Хавкин Э.Е., Забродина М.В., 1995; Brewbaker J.L., Nagai C.H., Liu E.H., 1985), льна (Лапина Г.П., 1999). Лисицына Р.А. с соавторами (1974) изучали изоферментный состав пероксидазы, полифенолоксидазы и оксидазы индолилуксусной кислоты в листьях, стеблях, луковицах и корнях растений тюльпана в начале вегетации. Обнаружено, что наряду с общими для исследованных органов изоферментами пероксидазы, имеются и специфические.

При изучении пероксидазной активности корней и листьев сои в онтогенезе (на 63-й, 83-й и 109-й дни после посева) активность у всех сортов увеличивалась по мере роста и развития растения соответственно в 1; 8 и 5,4 раза (Шерепитко В.В. и др., 1990; Dunleavy J.M., 1978).

M. Conklin, H. Smith (1971) изучали состав пероксидазы листьев у 10 видов дурмана. Исследование изозимного состава фермента, как в онтогенезе листа, так и в листьях разных ярусов, показало, что количество зон в спектре проростков и взрослых растений в процессе роста и развития увеличивается. R. Grison (1973) показал различия в активности и изозимном составе пероксидазы в тканях стебля, апекса, междоузлий и корневой системы в процессе роста гвоздики. Спектры эстеразы, кислой фосфатазы и пероксидазы в первичных листьях, стеблях и корнях у 13 разновидностей фасоли были различными и зависели от вида растений (Bassiri A., Adams M.W., 1978). М.П. Сафонова и соавторы (1970) обнаружили, что спектр белков и ферментов (эстеразы и пероксидазы) в различных органах взрослых растений гороха неодинаков.

Растение в онтогенезе подвергается воздействию различных факторов абиотической и биотической природы. В каждом экологическом регионе существует свой градиент факторов, в отношении вариации которых у организмов имеются свои пределы устойчивости. Результатом действия экологического фактора на организмы является установление адаптивной коррелятивной связи между организмом и средой (Алексеев В.Г., 1994; Долгова Л.Г., 2004).

Предполагается, что активность каталазы в семенах сои является показателем приспособленности сорта к экологическим условиям. А.В. Благовещенский (1960) связывает холодостойкость растений с активностью каталазы. Ю.Г. Перепадя (1977) считает, что фермент каталаза проявляет максимальную активность при низких температурах. О.А. Селиховой (2003) установлено, что существует положительная зависимость между количеством выпавших осадков и активностью каталазы, и комплексом эстераз в семенах сои, отрицательная – с активностью пероксидазы.

Так как процессы роста и развития растений, сопровождающиеся значительными изменениями в активности и составе ферментов, идут путем адаптации к колебаниям температуры, влажности, освещенности и т.д., онтогенетическую изменчивость можно рассматривать как приспособительную, адаптационную.

Изменение молекулярной гетерогенности ферментов является ответной реакцией растений на воздействие абиотических и биотических стрессоров, потому что полиморфизм представляет собой один из наиболее мощных адаптационных механизмов растений (Максимов И.В. и др., 2011; Bednar J., Provaznikova E., 1994; Ivachenko L.E. et al., 2016). Благодаря полиморфизму ферментные системы можно использовать в качестве молекулярно-генетических маркеров онтогенетического развития растений, устойчивости к абиотическим факторам окружающей среды и патогенным воздействиям (Корочкин Л.И., 1977; Яаска В., Яаска В., 1977; Конорев В.Г., 1983; Яаска В., 1985; Левитес Е.В., 1986; Хавкин Э.Е., 1997; Романова Е.В., Мартынов О.Л.,

Туманян А.Ф., 2003; Scandalios, J.G., 1969, 1974; Kudryakova N.V., Dunaeva S.E., 2001).

Для более глубокого и всестороннего понимания биохимических механизмов адаптации к условиям внешней среды была определена динамика изменения активности и электрофоретических спектров пероксидазы и каталазы в период прорастания, в течение вегетационного периода и созревания семян у *G. max* (сортов Соната, Гармония) и *G. soja* (формы КА 1344).

Данные исследования имеют большое теоретическое и практическое значение, так как необходимы для разработки селекционных программ на повышение адаптивного потенциала сои и систем адаптивного земледелия, направленных на увеличение урожайности культуры.

3.1 Адаптация *G. max* и *G. soja* к условиям внешней среды в период прорастания

3.1.1 Влияние условий внешней среды на прорастание семян *G. max* и *G. soja*

Прорастание определяется как «появление и формирование из зародыша семени таких существенно важных структур, которые могут свидетельствовать о возможности развития в соответствующих условиях нормального растения» (Соя, 1970).

Период прорастания семян делится на три этапа: 1) активация основного метаболизма (фаза набухания семян); 2) подготовка к растяжению клеток (наклевание семян за счет перехода к растяжению клеток осевых органов зародыша); 3) формирование органов проростка (Обручева Н.В., Антипова О.В., 1997).

Для прорастания семян нужны определенные экологические условия – достаточная влажность, доступ кислорода и благоприятная температура

(Майер А.М., 1982). Семена сои не требуют для своего прорастания какого-либо особого светового режима, однако прорастание зависит от наличия подходящих условий влажности и аэрации. Причиной положительного влияния кислорода на прорастание семян может быть активизация и поддержание на достаточном уровне процессов дыхания, а также окисление веществ, тормозящих процесс прорастания (Якушкина Н.И., 1993). Поступающий в митохондрии кислород инициирует протекание окислительного фосфорилирования, обеспечивающего синтез АТФ, наличие которого будет определять интенсивность синтетических процессов (Рогожин В.В., 2000).

Период от прорастания семени до превращения проростка в самостоятельный организм является самым критическим в онтогенезе растений, семена могут испытывать стресс в период прорастания со стороны наиболее сильно или наиболее слабо действующих экологических факторов окружающей среды. Обычно, как только усиливается стресс, вызванный окружающей средой, скорость прорастания понижается.

Избыток воды ухудшает снабжение семян кислородом, поэтому избыточная влажность неблагоприятна для прорастания (Лавриненко Г.Т. и др., 1978). Мы определили, что для набухания семян *G. max* необходимо 140-150% воды к воздушно-сухой массе семян, для *G. soja* – 120%.

Известно, что низкая температура понижает скорость прорастания семян. При температурах 3-5°C активность ферментов снижается, а при 0°C прекращается. Отклонение температуры от оптимума нарушает использование проростком питательных веществ, что с самого начала отрицательно влияет на рост и развитие будущего растения. В зависимости от температуры и влажности почвы, глубины заделки семян и сортовых особенностей прорастание сои длится от 5-6 до 15-20 суток (Лещенко А.К., 1978). Продолжительность этого периода варьируется по годам в зависимости от гидротермических условий (табл. 4).

Таблица 4 – Влияние температуры и влажности почвы на продолжительность периода «посев – всходы» *G. max* и *G. soja*

Год	Температура почвы на глубине заделки семян, °С	Сумма осадков за период, мм	Влажность почвы на глубине заделки семян (5 см), %	Продолжительность периода, суток	
				<i>G. max</i>	<i>G. soja</i>
2003	13,0	18	25,4	12	12
2004	18,0	6	15,2	24	15
2005	11,5	15	22,7	17	14

В 2003 г. температура почвы на глубине заделки семян составила 13°С, в 2005 г. – 11,5°С. Влажность почвы на глубине заделки семян составила 25,4% в 2003 г. и 22,7% в 2005 г. Условия влаго- и теплообеспеченности 2003 и 2005 гг. удовлетворяли биологическим требованиям сои, длительность периода прорастания составила соответственно 12-17 суток у *G. max* и 12-14 суток у *G. soja*.

Весенний период 2004 года характеризовался крайне сложными агрометеорологическими условиями. Большое количество осадков в первой декаде мая и связанное с этим переувлажнение почвы вызвали задержку проведения полевых работ. Поэтому посев был проведен позже положенного срока (не в третьей декаде мая, а в первой декаде июня). В июне установилась сухая ветреная погода, что способствовало иссушению почвы. Влагообеспеченность растений была недостаточной. Влажность почвы снижалась до 14-15%, посеvy сои оказались сильно изреженными, дружные всходы появились только в конце июня, когда выпавшие осадки пополнили запасы влаги в почве. Период «посев – всходы» у *G. soja* составил 15 суток, у *G. max* – 24 суток. *G. soja* оказалась более адаптирована к недостатку влаги, что объясняется меньшим количеством воды, необходимым для набухания её семян.

Наши наблюдения подтверждают заключение о первостепенном значении влаги и тепла в период «посев – всходы». Но наиболее важным лимитирующим условием для прорастания семян является влага. Она не

только служит средой, создающей благоприятные условия для превращения запасных питательных веществ, но и принимает непосредственное участие во многих биохимических процессах.

3.1.2 Влияние условий внешней среды на энзиматическую активность *G. max* и *G. soja* в период прорастания

Для нормального прорастания семян нужны не только внешние, но и определенные внутренние условия, а именно: наличие доступных питательных веществ и необходимых для их использования метаболических систем, соответствующий баланс регуляторов роста, а также наличие структур, облегчающих перенос элементов питания, требующихся для роста (Соля, 1970; Майер А.М., 1982).

Прорастание семян – сложный процесс, сопровождающийся взаимосвязанными и взаимообусловленными реакциями распада и синтеза, окисления и восстановления в тканях растения (Благовещенский А.В., 1951). Э.Е. Хавкиным (1969; 1972) установлено, что метаболическая активность семян начинается при набухании и увеличивается при последующем прорастании. По мере поступления воды в семена в них активизируются метаболические процессы, наблюдается активное потребление кислорода, который может вызывать окислительное повреждение тканей (Барабой В.А., 1991).

Для осуществления метаболических процессов необходимо наличие соответствующих ферментов общего и специализированного обмена веществ. Таких ферментов, как пероксидаза, которая катализирует окисление целого ряда соединений за счет неактивированного молекулярного кислорода; каталаза, благодаря которой осуществляется разложение перекиси водорода, образованной в процессе окисления ряда веществ в растениях.

Набухание семян сопровождается повышением интенсивности дыхания, при этом происходит активирование деятельности окислительно-восстановительных ферментов, в том числе и пероксидазы.

В литературе имеется довольно много данных об изменении активности пероксидазы и набора её изоферментов при прорастании семян пшеницы (Верхотуров В.В., 1999; Рогожин В.В., Верхотуров В.В., Курилюк Т.Т., 2001; Kruger J., La Berge D., 1974; Hagima I., Alexandrescu V., Cseresnyes Z., 1978), ячменя (Stroinski A. et al., 1978), томатов (Stein et al., 1978), сосны (Kieliszewska-Rokicka B., 1979; 1980; Ramaiah P. K., Durzan D.J., Mia A.J., 1971; Schulz H., 1985), яблони (Rychter A., Lewak St., 1971), черных русских бобов (Будилова Е.В. и др., 1971) и многих других объектов.

Максимальная активность пероксидазы в период прорастания сои наблюдалась при набухании семян, она была выше в среднем по годам в 26-45 раз у культурной сои и в 12 раз – у формы КА 1344, чем в сухих семенах (табл. 5).

Таблица 5 – Удельная активность пероксидазы в период прорастания семян *G. max* и *G. soja*, ед/мг белка, среднее за 2003-2005 гг.

Сорт (форма*) (фактор В)	Фазы прорастания, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$) (фактор А)				
	сухие семена	набухание семян	выход зароды- шевого корешка	растяги- вание зароды- шевого корешка	всходы
Соната	5 ± 2	130 ± 32	20 ± 4	5 ± 1	18 ± 4
Гармония	7 ± 2	313 ± 71	42 ± 11	6 ± 1	26 ± 5
КА 1344*	46 ± 8	564 ± 98	31 ± 6	6 ± 1	15 ± 3
НСР ₀₅ = 9; НСР _А = 5; НСР _В = 3					

Примечание: $\bar{X} \pm S\bar{x}$ – среднее арифметическое ± ошибка среднего

Резкое увеличение активности ферментов в прорастающих семенах в большинстве случаев вызвано новообразованием белков. Наряду с синтезом белков de novo важную роль играет также высвобождение латентных форм ферментов, удаление низкомолекулярных ингибиторов или увеличение

уровня доступных субстратов (Хавкин Э.Е., 1969). Пероксидаза активно участвует в формировании пусковых механизмов прорастания, так как в реакциях пероксидазного окисления различных субстратов могут образовываться свободные радикалы, способные ускорять процессы свободнорадикального окисления, инициирующие перекисное окисление липидов на начальных этапах прорастания (Рогожин В.В., 2000).

Минимальная активность пероксидазы при прорастании семян была отмечена в фазе растягивания зародышевого корешка. С выходом проростка на поверхность почвы удельная активность пероксидазы у *G. max* и *G. soja* возрастает по сравнению с фазой растягивания зародышевого корешка.

Каталаза входит в систему антиоксидантной защиты живых организмов, поэтому совместно с пероксидазой и другими ферментными и неферментными антиоксидантами участвует в защите организма от экстремальных условий окружающей среды.

Результаты наших исследований подтверждают данные других авторов (Иваченко Л.Е., Шаройко В.И., Ефимова Г.П., 1997) о том, что сухие семена обладают низкой каталазной активностью и значительным увеличением активности этого фермента при прорастании. Однако нами было отмечено незначительное снижение удельной активности каталазы у *G. max* и *G. soja* при набухании семян (табл. 6).

Таблица 6 – Удельная активность каталазы в период прорастания семян *G. max* и *G. soja*, ед/мг белка $\times 10^{-3}$, среднее за 2003-2005 гг.

Сорт (форма*) (фактор В)	Фазы прорастания, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$) (фактор А)				
	сухие семена	набухание семян	выход зародышевого корешка	растягивание зародышевого корешка	всходы
Соната	5 \pm 0,8	3 \pm 0,8	46 \pm 10,0	238 \pm 47,0	44 \pm 8,0
Гармония	5 \pm 1,0	4 \pm 0,8	67 \pm 13,0	252 \pm 49,0	51 \pm 10,0
КА 1344*	9 \pm 2,0	7 \pm 1,0	78 \pm 16,0	137 \pm 25,0	29 \pm 6,0
НСР ₀₅ = 7; НСР _А = 4; НСР _В = 3					

Примечание: $\bar{X} \pm S\bar{x}$ – среднее арифметическое \pm ошибка среднего

Мы придерживаемся предположения А.В. Благовещенского (1951), согласно которому снижение активности каталазы может быть обусловлено блокадой фермента продуктами первичного распада белка.

В отличие от пероксидазы каталазная активность достигает своего пика в период растягивания зародышевого корешка. В среднем по годам у сортов Соната и Гармония удельная активность каталазы в фазе растягивания зародышевого корешка составила 238×10^{-3} и 252×10^{-3} ед/мг белка соответственно, почти в 2 раза выше, чем у формы КА 1344 (137×10^{-3} ед/мг белка), несмотря на то, что удельная активность каталазы в сухих семенах *G. soja* была выше, чем у *G. max*. По данным В.Б. Енкена (1970), рост активности каталазы связан с увеличением количества перекисей в результате превращения жиров и распадом ненасыщенных жирных кислот, семена дикорастущей сои отличаются низким содержанием жиров.

Ритмичность активности ферментов при прорастании имеет эндогенный характер, однако не исключено влияние экологических условий (температуры, влажности, освещенности и т.д.). Засушливые условия 2004 года оказали влияние на активность пероксидазы, она была самой низкой в фазе растягивания зародышевого корешка у сортов Соната и Гармония (прил. Б, табл. Б.1).

Для подтверждения зависимости активности пероксидазы в период прорастания сои от температуры и влажности почвы проведен корреляционный анализ (табл. 7). Установлена отрицательная статистически значимая связь активности пероксидазы с температурой почвы ($r = -0,644$, $p < 0,01$, где p – уровень значимости) в фазе растягивания зародышевого корешка, в то же время с влажностью почвы она была положительной ($r = 0,627$, $p < 0,01$).

Таблица 7 – Коэффициенты корреляции между удельной активностью пероксидазы в период прорастания сои и гидротермическими факторами

Факторы	Коэффициенты корреляции по фазам прорастания			
	набухание семян	выход зародышевого корешка	растягивание зародышевого корешка	всходы
Влажность почвы на глубине заделки семян (5 см)	0,299	0,431*	0,627**	-0,426*
Температура почвы на глубине заделки семян (5 см)	0,376	-0,192	-0,644**	0,272

Примечание: * – статистически значимые изменения при $p < 0,05$ ($n = 27$, $r_{\text{крит}} = 0,381$); ** – статистически значимые изменения при $p < 0,01$ ($r_{\text{крит}} = 0,487$)

Исследования, проведенные в 2003-2005 гг., позволили выявить значительные различия по удельной активности каталазы, особенно в фазе растягивания зародышевого корешка. В 2003 году активность фермента была в 1,7-2,5 раза выше по сравнению с 2004 и 2005 гг. (прил. Б, табл. Б.2).

Среди статистически значимых корреляций активности каталазы с температурным и влажностным режимом почвы следует отметить положительную сопряженность с влажностью почвы в фазы набухания семян и выхода зародышевого корешка ($r = 0,492$, $p < 0,01$; $r = 0,782$, $p < 0,01$ соответственно) и отрицательную с температурой почвы (соответственно $r = -0,611$, $p < 0,01$; $r = -0,669$, $p < 0,01$ соответственно) в данные фазы (табл. 8).

Выход растения на поверхность почвы сопровождается снижением удельной активности каталазы. Корреляция фермента в этой фазе была сильной отрицательной с температурой ($r = -0,754$, $p < 0,01$) и положительной с влажностью воздуха ($r = 0,747$, $p < 0,01$). Самую низкую каталазную активность имели всходы сои в 2004 году в условиях повышенной температуры и недостатка влаги.

Таблица 8 – Коэффициенты корреляции между удельной активностью каталазы в период прорастания сои и гидротермическими факторами

Факторы	Коэффициенты корреляции по фазам прорастания			
	набухание семян	выход зародышевого корешка	растягивание зародышевого корешка	всходы
Влажность почвы на глубине заделки семян (5 см)	0,492**	0,782**	0,444*	0,747**
Температура почвы на глубине заделки семян (5 см)	-0,611**	-0,669**	-0,294	-0,754**

Примечание: * – статистически значимые изменения при $p < 0,05$ ($n = 27$, $r_{\text{крит}} = 0,381$); ** – статистически значимые изменения при $p < 0,01$ ($r_{\text{крит}} = 0,487$)

Прорастание семян сопровождается качественными изменениями в наборе множественных молекулярных форм ферментов, наличие которых свидетельствует о большой лабильности ферментативного аппарата растений (Титов А.Ф., 1975), и дает возможность осуществлять необходимые процессы обмена веществ в клетках при изменении внешних условий произрастания растений (Плешков Б.П., 1980).

Нами были получены электрофоретические спектры пероксидазы для культурной и дикорастущей сои в период прорастания (рис. 14). Семена изучаемых сортов и формы дикорастущей сои имеют индивидуальные спектры пероксидазы. Причем семена *G. soja* обладают большей гетерогенностью, чем семена *G. max*, это связано с их более высоким адаптивным потенциалом. У дикорастущей сои как морфологические, так и хозяйственно-ценные признаки кодируются, как правило, доминантными генами, и поэтому адаптивный потенциал растений оптимален (Ала А.А., 2009).

Набухание семян сопровождается уменьшением числа форм с четырёх (семена) до двух-трёх форм фермента. Установлено, что уменьшение форм

фермента, электрофоретические спектры каталазы *G. max* и *G. soja* в этот период имеют большое сходство, содержат по две-три формы (рис. 15).

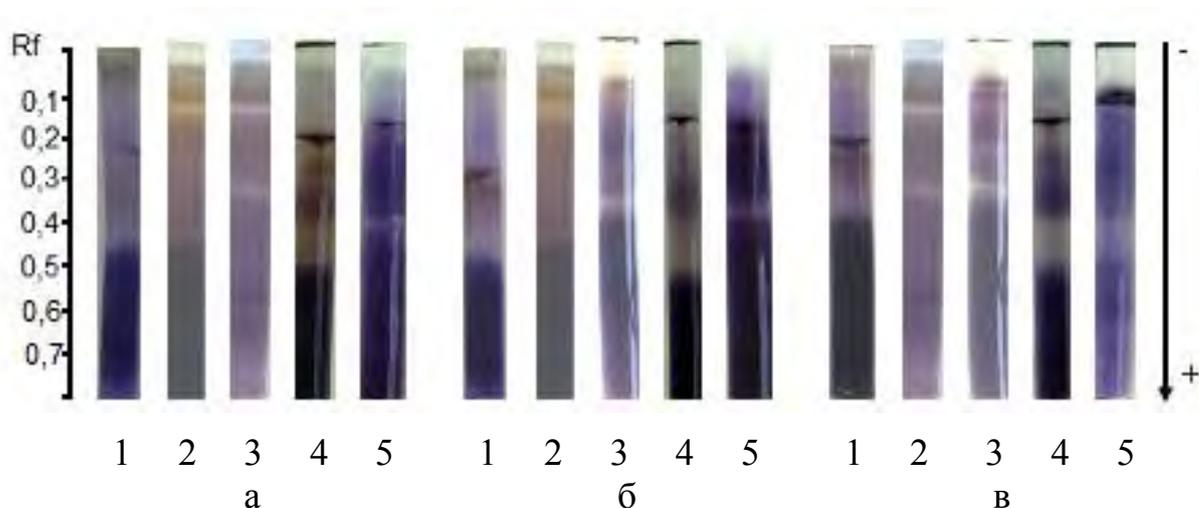


Рисунок 15 – Электрофоретические спектры каталазы в период прорастания сои: 1 – семена; 2 – набухание семян; 3 – выход зародышевого корешка; 4 – растягивание зародышевого корешка; 5 – гипокотиль с семядолями, а – Соната; б – Гармония; в – КА 1344

Несмотря на разные погодные условия периода «посев – всходы» в годы исследования, электрофоретические спектры каталазы у культурной и дикорастущей сои изменяются практически в одинаковых пределах Rf от 0,02 до 0,56 и Rf от 0,02 до 0,58 соответственно. Наименьшее количество форм каталазы у проростков сои в фазе выхода зародышевого корешка отмечено в 2004 году, что, видимо, связано с засушливыми погодными условиями (прил. Б, табл. Б.4).

Таким образом, в период прорастания *G. max* и *G. soja* наблюдается увеличение активности ферментов: максимальная активность пероксидазы отмечена в период набухания семян, каталазы – в период растягивания зародышевого корешка. В период своего максимума активность каталазы формы КА 1344 ниже, пероксидазы – выше, чем у *G. max*. Повышение температуры в фазе растягивания зародышевого корешка приводит к

снижению активности пероксидазы, повышение влажности почвы положительно коррелирует с активностью фермента.

Успешная адаптация сои к погодным условиям Амурской области связана с качественными изменениями в наборе множественных молекулярных форм ферментов. Высокая температура и недостаток влаги в период прорастания увеличивают гетерогенность пероксидазы и, наоборот, уменьшают гетерогенность каталазы у проростков *G. max* и *G. soja*.

3.2 Адаптация *G. max* и *G. soja* к условиям внешней среды в течение вегетационного периода

3.2.1 Влияние условий внешней среды на прохождение фенологических фаз роста и развития *G. max* и *G. soja*

Растения в ходе онтогенеза испытывают на себе влияние целого ряда факторов окружающей среды. Неблагоприятные условия среды: засуха, жара, пониженные температуры и другие стрессовые условия – существенно снижают урожай сельскохозяйственных культур (Шерепитко В.В. и др., 1990).

Онтогенез сои складывается из двух основных периодов: вегетативного и генеративного. Вегетативный период у *G. soja* на 7-8 суток длиннее, чем у *G. max*. Продолжительность генеративного периода у *G. soja* на 9-11 суток короче, чем у сортов Соната и Гармония. Более короткий генеративный период у *G. soja* является одним из адаптивных признаков, позволяющих избежать неблагоприятного воздействия абиотических факторов в «критические» периоды развития сои.

Продолжительность периода «всходы – цветение» зависит от метеорологических условий года, сроков посева и сортовых особенностей. Наши исследования показали, что при повышении среднесуточной

температуры воздуха на 1,5-2,0°C цветение наступает раньше на 2-3 суток (рис. 16).

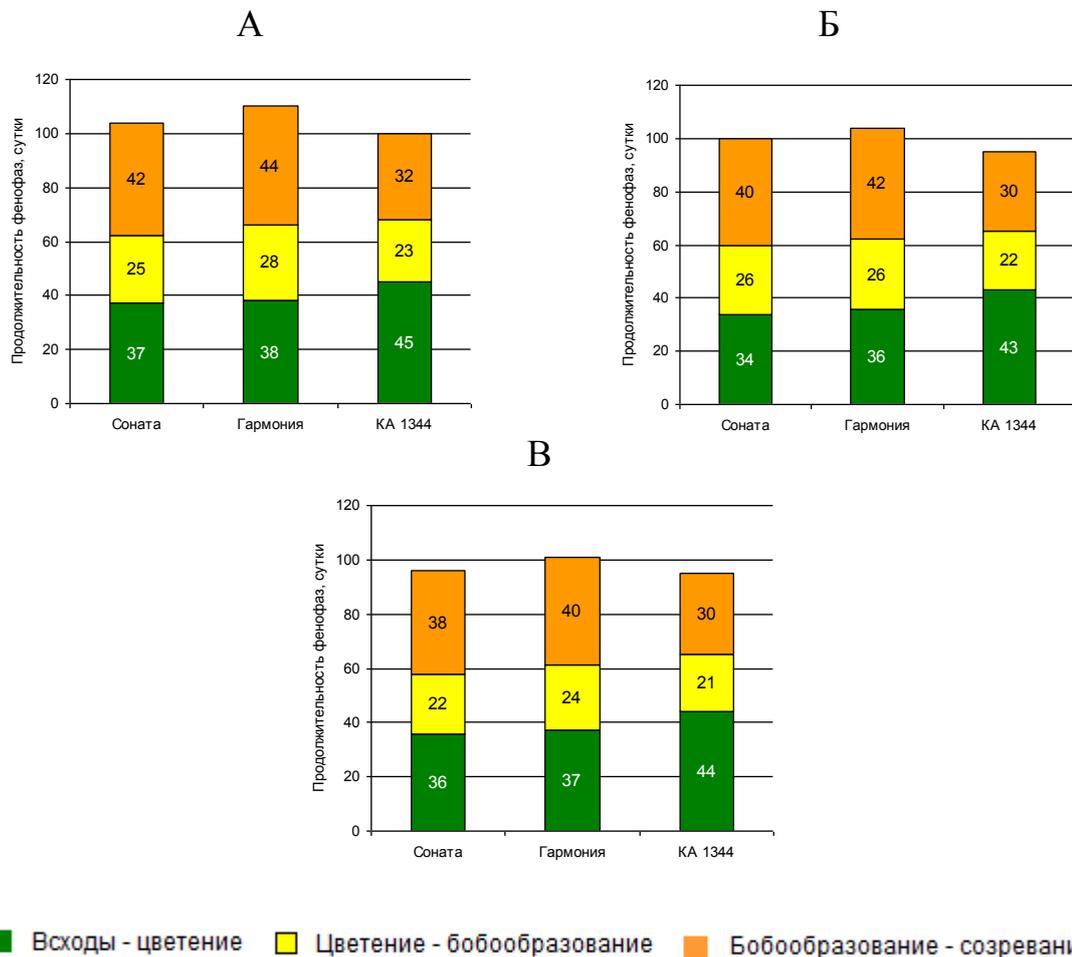


Рисунок 16 – Продолжительность фенологических фаз роста и развития *G. max* и *G. soja*, 2003 г. (А), 2004 г. (Б), 2005 г. (В)

Так, в 2004 году при средней температуре воздуха за период «всходы – цветение» 21,2°C, цветение у культурной сои наступило на 34-36 суток, у дикорастущей сои – на 43 суток. Исследования за 2003-2005 гг. показали, что продолжительность периода «всходы – цветение» у *G. soja* на 7-8 суток длиннее, чем у *G. max*.

Продолжительность периода «цветение – бобообразование» зависит от среднесуточной температуры воздуха: чем она выше, тем быстрее заканчивается период. Низкие среднесуточные температуры (19,6 и 16,6°C) и избыточное увлажнение (250 и 115 мм) в июле – августе 2003 года привели к

удлинению периода «цветение – образование бобов» на 3-4 суток у культурной сои и на 2 суток у дикорастущей. Продолжительность фазы бобообразования в среднем за 2003-2005 годы у *G. soja* составила 24 суток, у *G. max* – 33 суток.

Период созревания семян сои – самая короткая фаза в процессе развития растения. При достаточной температуре она продолжается до 10-12 суток. В наших исследованиях за 2003-2005 гг. продолжительность периода «бобообразование – созревание семян» у *G. soja* на 9-11 суток короче, чем у сортов Соната и Гармония.

Полученные данные подтверждают, что небольшое количество осадков и повышение температуры ускоряют созревание семян сои и, наоборот, понижение температуры и обильные осадки удлиняют вегетационный период. В 2003 году период «бобообразование – созревание семян» у *G. max* и *G. soja* был затянут на 2-4 суток, в связи с тем, что температура в этот период была ниже, а количество осадков выше, чем в 2004 и 2005 годах.

3.2.2 Влияние условий внешней среды на энзиматическую активность *G. max* и *G. soja* в течение вегетационного периода

Ферменты играют важнейшую роль в регуляции метаболических процессов. В зависимости от степени активности ферментов изменяется интенсивность и направленность метаболических процессов в растительном организме. Наличие у растений сложных многокомпонентных ферментных систем позволяет противостоять различным неблагоприятным воздействиям.

Пероксидазе принадлежит важная роль в регуляции уровня ростовых веществ, в дыхании растений и при адаптациях. Присутствие пероксидазы в хлоропластах указывает на её участие в процессах фотосинтеза (Рубин Б.А., Ладыгина М.Е., 1977).

В фазы третьего тройчатого листа и цветения удельная активность пероксидазы культурной и дикорастущей сои характеризуются

относительной стабильностью. Активность фермента начинает возрастать в фазе бобообразования, по мере старения листьев активность пероксидазы сильно увеличивается и достигает своего пика в фазе созревания семян, несмотря на снижение интенсивности дыхания и фотосинтеза (табл. 9).

Таблица 9 – Удельная активность пероксидазы в листьях *G. max* и *G. soja*, ед/мг белка $\times 10^{-2}$, среднее за 2003-2005 гг.

Сорт (форма*) (фактор В)	Фенологические фазы, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$) (фактор А)				
	первый тройчатый лист	третий тройчатый лист	цветение	бобообра- зование	созревание семян
Соната	79 \pm 18	29 \pm 5	100 \pm 30	325 \pm 96	564 \pm 101
Гармония	114 \pm 30	33 \pm 6	123 \pm 37	409 \pm 124	938 \pm 106
КА 1344*	101 \pm 22	41 \pm 7	128 \pm 35	372 \pm 115	1445 \pm 28
НСР ₀₅ = 19; НСР _А = 11; НСР _В = 8					

Примечание: $\bar{X} \pm S\bar{x}$ – среднее арифметическое \pm ошибка среднего

В литературе имеются данные, что в процессе старения имеет место увеличение активности пероксидазы (Novacky A., Hampton R.E., 1968; Birecka H., Chaskes M.J., Goldstein J., 1979; Meyer H.-U., Biehl B., 1980). Полученные результаты свидетельствуют в пользу предположения, что пероксидаза участвует в процессах старения. Однако роль этого фермента в процессах старения не ясна, по некоторым данным, пероксидазная система может участвовать в деградации хлорофилла и ненасыщенных липидов при старении, когда в тканях накапливаются фенолы и пероксид водорода (Мерзляк М.Н., 1989).

Рост активности пероксидазы может быть связан также с патогенным воздействием, а инфекция тканей растения вирусами, бактериями, грибами приводит к индукции пероксидазы у устойчивых растений (Рубин Б.А., Ладыгина М.Е., 1977; Андреева В.А., 1988; Газарян И.Г., 1992; Карташова Е.Р. и др., 2000). Наибольшее увеличение пероксидазы в листьях (фаза созревания семян) характерно для *G. soja* (14,4 ед/мг белка, среднее по годам), что свидетельствует о более высоком защитном потенциале.

Результаты исследования удельной активности каталазы листьев *G. max* и *G. soja* показали, что в фазе третьего тройчатого листа наблюдается её незначительное снижение (~ в 2 раза) (табл. 10).

Таблица 10 – Удельная активность каталазы в листьях *G. max* и *G. soja*, ед/мг белка $\times 10^{-3}$, среднее за 2003-2005 гг.

Сорт (форма*) (фактор В)	Фенологические фазы, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$) (фактор А)				
	первый тройчатый лист	третий тройчатый лист	цветение	бобообра- зование	созревание семян
Соната	451 \pm 84	187 \pm 66	544 \pm 41	1392 \pm 182	259 \pm 65
Гармония	618 \pm 77	377 \pm 66	577 \pm 74	1553 \pm 200	364 \pm 97
КА 1344*	767 \pm 94	269 \pm 49	549 \pm 68	2274 \pm 281	161 \pm 21
НСР ₀₅ = 31; НСР _А = 18; НСР _В = 14					

Примечание: $\bar{X} \pm S\bar{x}$ – среднее арифметическое \pm ошибка среднего

В фазе цветения активность каталазы начинает возрастать и достигает максимальной величины в период окончания цветения и начала бобообразования. Этот период характеризуется повышением интенсивности обмена веществ и усилением дыхания. Наиболее значительное увеличение удельной активности каталазы наблюдается у КА 1344 ~ в 4 раза. Так как активность каталазы является показателем интенсивности дыхания (Мусина, Г.В., 1977; Рубин Б.А., Ладыгина М.Е., 1977), то полученные результаты позволяют предположить, что интенсивность дыхания листьев *G. soja* выше, чем *G. max*. Одним из первых симптомов старения является снижение содержания хлорофилла, что отражает деградацию фотосинтетического аппарата. Известно, что существует прямая корреляция между активностью фермента и содержанием хлорофилла (Акулова Е.А., Смоллов А.П., 1974), это объясняет резкое снижение активности каталазы в листьях сои (в 7-11 раз) в конце вегетационного периода (фаза созревания семян).

Наименьшая удельная активность пероксидазы в листьях *G. max* и *G. soja* наблюдалась в 2003 году, который отличался самой низкой среднесуточной температурой воздуха и наибольшей суммой осадков за

вегетационный период в годы проведения исследований. Самая высокая активность пероксидазы отмечена в засушливых условиях 2005 года, в котором сумма осадков за вегетационный период составила 48% от климатической нормы (прил. Б, табл. Б.5).

Энзиматическая активность зависела от погодных условий вегетационного периода. Выявлены положительные статистически значимые зависимости активности пероксидазы с температурой воздуха в фазы первого, третьего тройчатого листа, бобообразования и созревания семян (от $r = 0,617$ до $r = 0,785$, $p < 0,01$). И наоборот, отрицательные связи установлены между активностью пероксидазы и суммой осадков, наиболее тесные в фазы первого тройчатого листа и созревания семян ($r = -0,663$ и $r = -0,683$, $p < 0,01$ соответственно) (табл. 11).

Таблица 11 – Коэффициенты корреляции между удельной активностью пероксидазы в листьях сои и гидротермическими факторами

Факторы	Коэффициенты корреляции по фенологическим фазам				
	первый тройчатый лист	третий тройчатый лист	цветение	бобообразование	созревание семян
Сумма осадков за соответствующую фазу, мм	-0,663**	-0,494**	-0,405*	-0,527*	-0,683**
Среднесуточная температура воздуха за соответствующую фазу, °С	0,647**	0,785**	0,119	0,617**	0,677**

Примечание: * – статистически значимые изменения при $p < 0,05$ ($n = 27$, $r_{\text{крит}} = 0,381$); ** – статистически значимые изменения при $p < 0,01$ ($r_{\text{крит}} = 0,487$)

Корреляция активности каталазы в листьях сои с температурой воздуха была отрицательной в фазы первого, третьего тройчатого листа, цветения,

созревания семян, наиболее тесные связи установлены в фазах третьего тройчатого листа и созревания семян ($r = -0,746$ и $r = -0,647$, $p < 0,01$ соответственно). С суммой осадков установлена положительная связь во все фенологические фазы развития сои, однако статистически значимая сильная корреляция выявлена только в фазе созревания семян ($r = 0,766$, $p < 0,01$) (табл. 12).

Таблица 12 – Коэффициенты корреляции между удельной активностью каталазы в листьях сои и гидротермическими факторами

Факторы	Коэффициенты корреляции по фенологическим фазам				
	первый тройчатый лист	третий тройчатый лист	цветение	бобообразование	созревание семян
Сумма осадков за соответствующую фазу, мм	0,692**	0,510*	0,580*	0,424	0,766**
Среднесуточная температура воздуха за соответствующую фазу, °С	-0,448	-0,746**	-0,119	0,299	-0,647**

Примечание: * – статистически значимые изменения при $p < 0,05$ ($n = 27$, $r_{\text{крит}} = 0,381$); ** – статистически значимые изменения при $p < 0,01$ ($r_{\text{крит}} = 0,487$)

Анализ электрофоретических спектров пероксидазы одних и тех же листьев в разные фазы развития содержал разный набор множественных молекулярных форм. В процессе онтогенеза растений наблюдалось исчезновение одних и появление других форм, что согласуется с литературными данными (Ережепов А., 1984; Граскова И.А. и др., 2010). Сравнение электрофоретических спектров изучаемых ферментов показало наличие большого сходства между сортами *G. max* и *G. soja*, качественные и количественные изменения наблюдались в процессе роста и развития растений.

В фазах первого, третьего тройчатого листа и цветения электрофоретические спектры листьев культурной и дикорастущей сои обладают большим сходством и представлены тремя формами с низкой и средней электрофоретической подвижностью (рис. 17, прил. Б, табл. Б.7).

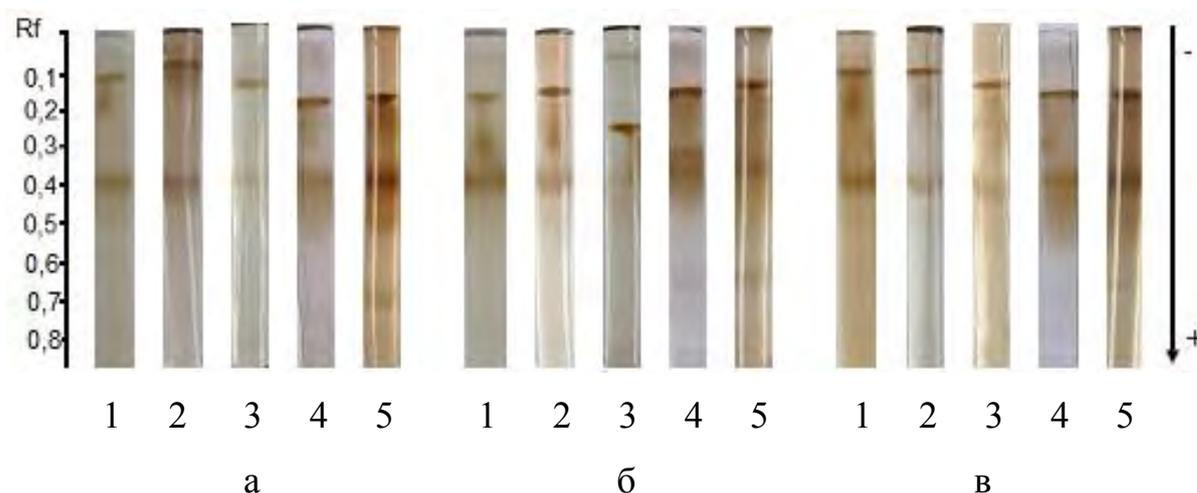


Рисунок 17 – Электрофоретические спектры пероксидазы в онтогенезе сои (листья) в фенологические фазы: 1 – первый тройчатый лист; 2 – третий тройчатый лист; 3 – цветение; 4 – бобообразование; 5 – созревание семян, а – Соната; б – Гармония; в – КА 1344

В фазе бобообразования наблюдается усложнение электрофоретического спектра листьев сои. Высокая гетерогенность пероксидазы характерна для старых листьев (фаза созревания семян) *G. max* и *G. soja*. Как полагает J.M. Vraber (1980), в старых листьях тетрамерная молекула каталазы может распадаться на мономерные единицы с пероксидазной активностью, вследствие чего и увеличивается гетерогенность электрофоретических спектров пероксидазы. К концу вегетации листья сои наряду с малоподвижными и среднеподвижными формами содержат и высокоподвижные формы с Rf от 0,60 до 0,74.

Известна концепция, согласно которой увеличение конформационной подвижности фермента расширяет физиолого-биохимические возможности растений в приспособлении к неблагоприятным условиям, обеспечивает

слаженность и гибкость работы механизмов адаптации окислительно-восстановительной системы растений (Алексеев В.Г., 1994). Широкий спектр функций, множественность молекулярных форм, высокая чувствительность к внешним воздействиям делают пероксидазу адаптогенным ферментом с широкой экологической пластичностью.

Наибольшее количество форм пероксидазы в листьях сои (фазы бобообразования и созревания семян) выявлено в 2005 году. Фазы бобообразования и созревания семян 2005 года характеризуются самой высокой температурой воздуха за годы исследования, вероятно, это способствовало увеличению форм фермента.

В отличие от пероксидазы самая высокая удельная активность каталазы в листьях обоих видов сои наблюдалась в 2003 году (прил. Б, табл. Б.6). Переувлажнение почвы и пониженный температурный фон в 2003 году способствовал повышению удельной активности каталазы в листьях сои. А.Д. Курсанов, П.Н. Крюкова считают, что повышение активности основных дыхательных ферментов в листьях растений, испытывающих периодическое переувлажнение, является приспособительной реакцией растений на действие почвенного анаэробноза (Хван А.В., 1977).

Электрофоретические спектры каталазы листьев *G. max* и *G. soja* в фазах третьего тройчатого листа и цветения у культурной и дикорастущей сои представлены тремя формами фермента (рис. 18, прил. Б, табл. Б.8). Бобообразование сопровождается увеличением форм каталазы с трёх до четырёх. В фазе созревания семян электрофоретический спектр у всех исследованных образцов представлен одной малоподвижной формой с $R_f=0,02-0,10$. Уменьшение форм каталазы происходит на фоне снижения удельной активности каталазы в листьях сои. Наибольшей гетерогенностью отличались электрофоретические спектры каталазы листьев *G. max* и *G. soja* в 2003 году (фазы цветения и бобообразования). Вероятно, на высокую гетерогенность каталазы повлияло переувлажнение почвы и пониженный температурный фон во второй половине вегетации.

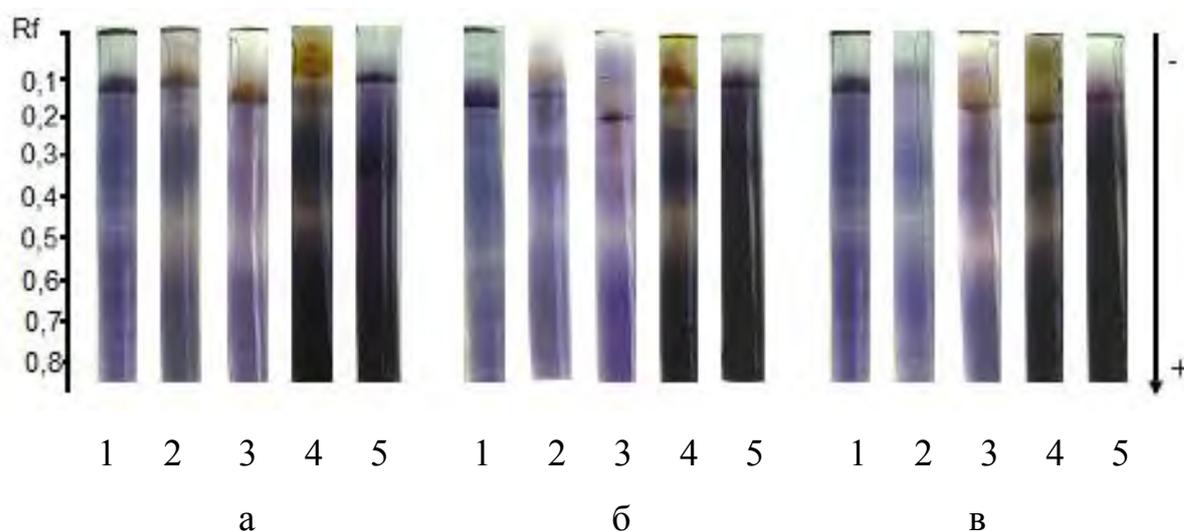


Рисунок 18 – Электрофоретические спектры каталазы в онтогенезе сои (листья) в фенологические фазы: 1 – первый тройчатый лист; 2 – третий тройчатый лист; 3 – цветение; 4 – бобообразование; 5 – созревание семян, а – Соната; б – Гармония; в – КА 1344

В результате проведенных исследований установлено, что различия в энзиматических механизмах приспособления *G. max* и *G. soja* к неблагоприятным условиям окружающей среды проявляются в фазах бобообразования и созревания семян. Удельная активность пероксидазы и каталазы в период своего максимума выше в листьях *G. soja*, что свидетельствует о её высоком адаптивном потенциале.

Выявлены сильные статистически значимые положительные зависимости активности пероксидазы с температурой воздуха (фазы третьего тройчатого листа и созревания семян) и каталазы с суммой осадков (фаза созревания семян). И наоборот, сильная статистически значимая отрицательная корреляционная зависимость установлена между активностью пероксидазы и суммой осадков (фазы первого тройчатого листа и созревания семян), активностью каталазы и температурой воздуха (фазы третьего тройчатого листа и созревания семян).

Система адаптации в ходе онтогенеза включает образование дополнительных множественных молекулярных форм: высокая температура

воздуха и недостаток влаги увеличивают гетерогенность пероксидазы, переувлажнение, наоборот, приводит к увеличению гетерогенности каталазы у *G. max* и *G. soja*.

3.3 Адаптация *G. max* и *G. soja* к условиям внешней среды в период созревания семян

3.3.1 Влияние условий внешней среды на формирование, развитие и созревание семян *G. max* и *G. soja*

Формирование, развитие и созревание семян занимает первостепенное значение в жизненном цикле растений. И.И. Чалый (1973) выделил четыре периода в онтогенезе семян сои: образование семени, формирование и рост, налив, созревание. Эти периоды включают шесть фаз – эмбриональную, мягковосковую, роста, налива, твердовосковую и твердую (табл. 13).

Эмбриональная фаза наступает через 10-17 суток после оплодотворения. У *G. soja* эмбриональная фаза наступает на 5-7 суток позже, чем у *G. max*. Период формирования и роста семян включает мягковосковую фазу и фазу роста, продолжительность 14-15 суток. В этот период размер плодов и семян достигает максимальной величины. Семядоли и зародышевый корешок полностью сформированы. У семян наступает фаза физиологической зрелости.

Фаза налива наступает через 40-46 суток от начала плодообразования. Наши исследования показали, что фаза налива семян у дикорастущей сои короче, чем у культурной сои на 8-10 суток. В этот период завершается процесс прироста сухого вещества семян.

Таблица 13 – Фазы развития семян *G. max* и *G. soja*

Этапы образования семян	Фаза развития семян	Влажность семян, %	Внешний вид семян		Продолжительность фазы, сутки	
			<i>G. max</i>	<i>G. soja</i>	<i>G. max</i>	<i>G. soja</i>
Образование	Эмбриональная	80-82			7-8	7-8
Формирование и рост	Мягковосковая	78-82			14-15	14-15
	Рост	60-66				

Продолжение таблицы 13

Налив	Налив	36-40			20-25	12-15
Созревание	Твердовосковая	25-26			15-20	10-12
	Твердая	13-14 и ниже				

Период созревания включает твердовосковую и твердую фазы. Продолжительность его – от 15 до 20 и более суток, в зависимости от сорта и погодных условий. Твердовосковая фаза самая короткая у дикорастущей сои, и самая продолжительная у сорта Гармония. Семена теряют связь с материнским растением и приобретают твердовосковую и твердую консистенцию, с плотно сросшейся семенной оболочкой. Влажность снижается до 12-13% и ниже.

На продолжительность формирования, роста и созревания семян влияют как сортовые особенности, так и погодные условия. В наибольшей степени семена сои подвержены стрессу со стороны нерегулируемых факторов окружающей среды. Наиболее продолжительный период созревания семян отмечен в 2003 году, который отличался дождливыми и прохладными погодными условиями. Самый короткий период созревания семян сои за годы исследования наблюдался в 2005 году, характеризующемся высокими среднесуточными температурами в летние месяцы, превышающими многолетние на 2-3°C.

3.3.2 Влияние условий внешней среды на энзиматическую активность *G. max* и *G. soja* в период созревания семян

На всех этапах созревания семян в них происходит ряд сложных физиолого-биохимических процессов и превращений из одного состояния в другое, более сложное. Основными процессами в созревающих семенах являются синтез белков из поступающих в семена аминокислот и синтез крахмала из сахаров, а также образование клетчатки и жира (Плешков, Б.П., 1980).

Условия внешней среды оказывают воздействие не только на продолжительность развития и созревания семян, но и на характер процессов, протекающих в них. Эти процессы могут протекать интенсивно или замедляться, что приводит к определенным изменениям качества семян

(Строна И.Г., 1966; Соя, 1984). Согласно литературным данным, по мере созревания семян сорго (Johari R.P., Mehta S.L., Naik M.S., 1977), пшеницы (Sargeant J.G., 1980; Marchylo B.A., Lacroix L.J., Kruger J.E., 1980), ржи (Wili R., Buschbeck R., 1978), риса (Shinke R., Yamaguchii T., Nischira H., 1978) активность и спектр ферментов изменяется.

Эмбриональная фаза созревания семян сои характеризуется низкими значениями пероксидазы, затем удельная активность фермента возрастает и достигает своего пика в фазе налива. В фазе твердовосковой спелости наблюдается стабилизация пероксидазной активности, что объясняется снижением активности окислительно-восстановительных процессов (табл. 14).

Таблица 14 – Удельная активность пероксидазы в семенах *G. max* и *G. soja* в период созревания, ед/мг белка, среднее за 2003-2005 гг.

Сорт (форма*) (фактор В)	Фазы развития семян, ($\bar{X} \pm S\bar{x}$) (фактор А)					
	эмбри- ональ- ная	мягко- восковая	роста	налива	твёрдо- восковая	твёрдая
Соната	8 ± 1	63 ± 10	88 ± 15	204 ± 29	122 ± 17	94 ± 11
Гармония	8 ± 1	72 ± 8	118 ± 14	204 ± 28	133 ± 16	122 ± 16
КА 1344*	5 ± 1	69 ± 12	152 ± 25	663 ± 92	318 ± 39	287 ± 41
НСР ₀₅ = 5; НСР _А = 3; НСР _В = 2						

Примечание: $\bar{X} \pm S\bar{x}$ – среднее арифметическое ± ошибка среднего

Удельная активность пероксидазы в твёрдой фазе в семенах дикорастущей сои (КА 1344 – 287 ед/мг белка, среднее по годам) выше, чем у культурной сои (Соната – 94 ед/мг белка, Гармония – 122 ед/мг белка, среднее по годам). Пероксидаза входит в состав антиоксидантной системы, активность которой определяет уровень устойчивости растений к различным воздействующим факторам в процессе онтогенеза. Высокая удельная активность пероксидазы в семенах *G. soja* свидетельствует о её высоком адаптивном потенциале.

В период созревания установлено, что максимальные значения удельной активности каталазы имеют семена *G. max* и *G. soja* в эмбриональной фазе (табл. 15). По-видимому, это связано с повышением аэробных процессов и накоплением большого количества перекисных соединений.

Таблица 15 – Удельная активность каталазы в семенах *G. max* и *G. soja* в период созревания, ед/мг белка $\times 10^{-3}$, среднее за 2003-2005 гг.

Сорт (форма*) (фактор В)	Фазы развития семян ($\bar{X} \pm S\bar{x}$) (фактор А)					
	эмбриональ- ная	мягко- восковая	роста	налива	твёрдо- восковая	твёрдая
Соната	2194 \pm 316	361 \pm 45	256 \pm 31	117 \pm 15	31 \pm 4	28 \pm 3
Гармония	3480 \pm 302	352 \pm 45	243 \pm 35	163 \pm 28	42 \pm 5	38 \pm 4
КА 1344*	1398 \pm 166	756 \pm 99	517 \pm 65	346 \pm 62	71 \pm 9	65 \pm 8
НСР ₀₅ = 23; НСР _А = 13; НСР _В = 9						

Примечание: $\bar{X} \pm S\bar{x}$ – среднее арифметическое \pm ошибка среднего

По мере налива и созревания семян каталазная активность падает, достигает минимального значения к концу созревания. Самую низкую удельную активность каталазы имели семена культурной и дикорастущей сои в фазе твердой спелости. На основании литературных данных (Чалый И.И., 1973) и наших исследований, полностью сформировавшиеся семена характеризуются низкой активностью каталазы, поэтому активность этого фермента может служить сравнительным показателем спелости семян. Удельная активность ферментов стабилизируется в фазе твердовосковой спелости.

Известно, что любые отклонения от оптимальных условий на начальном этапе формирования и роста семян влияют на биохимические показатели сформировавшихся семян, так как нарушают ход метаболических процессов в растении (Жученко А.А., 2001).

Установлены значительные колебания удельной активности пероксидазы в зависимости от погодных условий. Самая высокая удельная

активность пероксидазы в семенах сои была зафиксирована в 2005 году, а самая низкая – в 2003 году. В 2005 году было отмечено превышение среднесуточной температуры многолетние значения на 2-3°C в июне, июле и августе. Дождливые и прохладные погодные условия вегетационного периода 2003 года способствовали снижению удельной активности пероксидазы (прил. Б, табл. Б.9).

Корреляционный анализ позволил выявить фазы созревания семян, которые отличались наиболее тесной сопряженностью пероксидазной активности с температурой воздуха, это мягковосковая фаза ($r = 0,746$, $p < 0,01$) и фаза роста ($r = 0,765$, $p < 0,01$). С суммой осадков активность пероксидазы слабо коррелировала (табл. 16).

Таблица 16 – Коэффициенты корреляции между удельной активностью пероксидазы в семенах сои и гидротермическими факторами

Факторы	Коэффициенты корреляции по фазам развития семян					
	эмбриональ- ная	мягко- восковая	роста	налива	твёрдо- восковая	твёрдая
Сумма осадков за соответствующую фазу, мм	-0,189	0,147	-0,397	-0,214	0,203	-0,290
Среднесуточная температура воздуха за соответствующую фазу, °С	0,478*	0,746**	0,765**	0,488**	0,637**	0,667**

Примечание: * – статистически значимые изменения при $p < 0,05$ ($n = 27$, $r_{\text{крит}} = 0,381$); ** – статистически значимые изменения при $p < 0,01$ ($r_{\text{крит}} = 0,487$)

Активность каталазы в семенах сои слабо зависела от погодных условий в годы проведения исследований (прил. Б, табл. Б.10). Взаимосвязи удельной активности каталазы с гидротермическими факторами были слабыми или средней силы (табл. 17).

Таблица 17 – Коэффициенты корреляции между удельной активностью каталазы в семенах сои и гидротермическими факторами

Факторы	Коэффициенты корреляции по фазам развития семян					
	эмбриональ- ная	мягко- восковая	роста	налива	твёрдо- восковая	твёрдая
Сумма осадков за соответствующую фазу, мм	0,468*	0,024	0,290	0,284	-0,469*	0,178
Средне-суточная температура воздуха за соответствующую фазу, °С	-0,498**	-0,498**	0,448*	-0,011	0,029	0,308

Примечание: * – статистически значимые изменения при $p < 0,05$ ($n = 27$, $r_{\text{крит}} = 0,381$); ** – статистически значимые изменения при $p < 0,01$ ($r_{\text{крит}} = 0,487$)

Г.С. Выскваркой с соавторами (2014) было установлено, что активность пероксидазы и каталазы в семенах сои положительно коррелируют с посевными качествами, следовательно, неблагоприятные погодные условия в период созревания, особенно на ранних этапах формирования семян, могут существенно ухудшить их качество.

Анализ множественных молекулярных форм ферментов показал, что в процессе формирования семян гетерогенность пероксидазы увеличивается за счет появления дополнительных форм со средней и низкой электрофоретической подвижностью (рис. 19, прил. Б, табл. Б.11). В эмбриональной фазе электрофоретический спектр пероксидазы у сортов Соната, Гармония и формы КА 1344 представлен одной среднеподвижной формой, это объясняет большую чувствительность семян в этот период к неблагоприятным воздействиям внешней среды. В последующие фазы созревания семян сои гетерогенность пероксидазы увеличивается у культурной и, особенно, дикорастущей сои. Известно, что семена приспособленных растений по числу множественных молекулярных форм

пероксидазы превосходят семена менее приспособленных растений (Алексеев В.Г., 1994). Электрофоретические спектры пероксидазы сортов Соната и Гармония в фазе твердой спелости содержат по четыре формы. В семенах формы КА 1344 электрофоретические спектры, в разные годы исследования, представлены пятью-семью формами, что свидетельствует о её большой устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды.

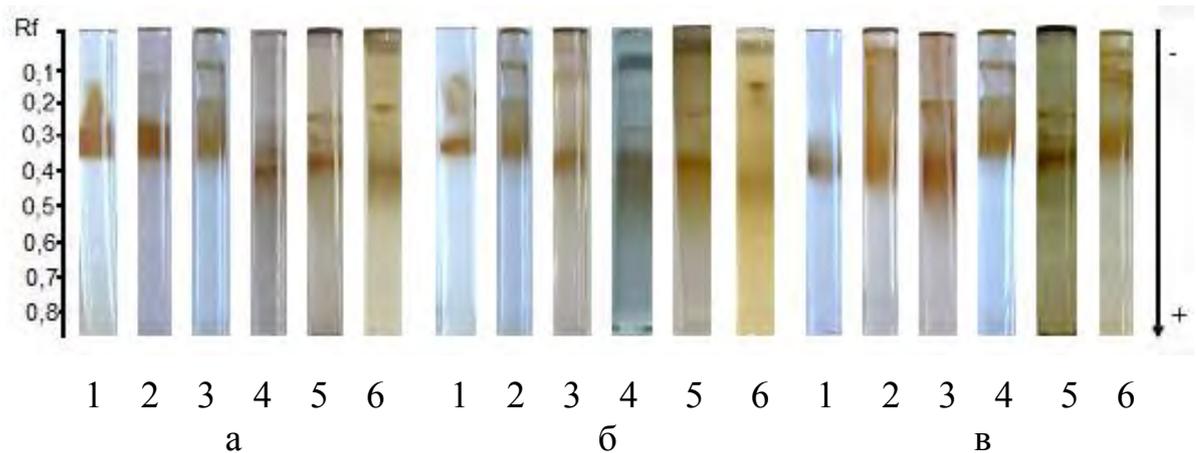


Рисунок 19 – Электрофоретические спектры пероксидазы в онтогенезе семян сои в фазы: 1 – эмбриональная; 2 – мягковосковая; 3 – роста; 4 – налива; 5 – твердовосковая; 6 – твердая, а – Соната; б – Гармония; в – КА 1344

Наиболее высокая гетерогенность пероксидазы семян *G. max* и *G. soja* установлена в 2005 году, высокие температуры в период формирования семян способствовали увеличению числа высокомолекулярных форм фермента. Наименьшее количество форм пероксидазы отмечено в 2003 году, который характеризовался низкими температурами и переувлажнением в период формирования семян.

Электрофоретические спектры каталазы в начале формирования и развития семян у изучаемых растений слабо отличались друг от друга (рис. 20, прил. Б, табл. Б.12). Межсортовые различия по числу форм фермента начинают проявляться в фазе твердовосковой спелости. В фазе твердой спелости у сортов Соната и Гармония выявлены по три, у формы КА 1344 – четыре формы с низкой и средней подвижностью.

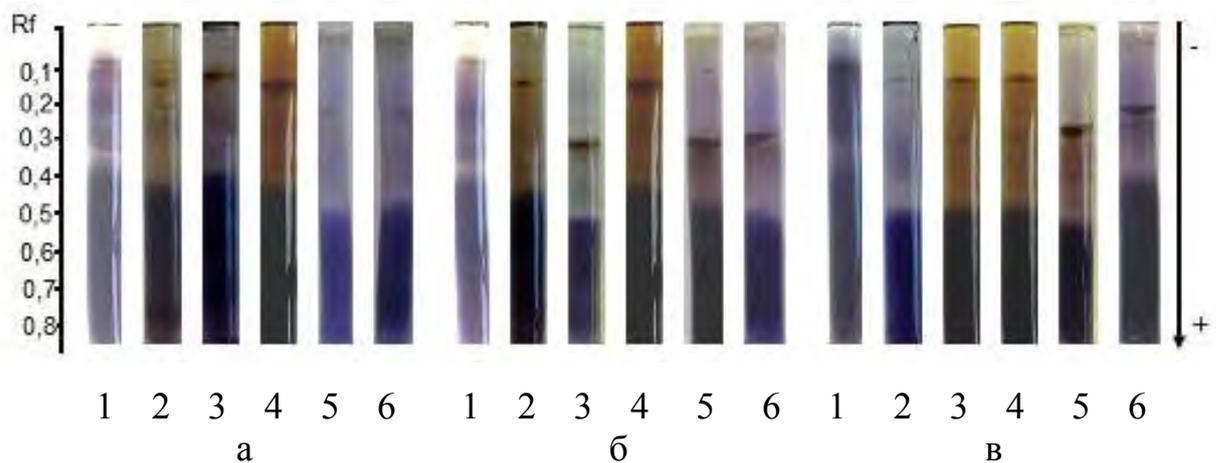


Рисунок 20 – Электрофоретические спектры каталазы в онтогенезе семян сои в следующие фазы: 1 – эмбриональная; 2 – мягковосковая; 3 – роста; 4 – налива; 5 – твердовосковая; 6 – твердая, а – Соната; б – Гармония; в – КА 1344

Таким образом, в созревающих семенах сои максимальная удельная активность пероксидазы приходится на фазу налива семян, удельная активность каталазы – на эмбриональную фазу. Семена формы КА 1344 в фазе полной спелости характеризуются более высокой удельной активностью и гетерогенностью пероксидазы и каталазы по сравнению с *G. max*. Установлено, что высокий температурный фон в период формирования семян способствовал увеличению гетерогенности пероксидазы, переувлажнение почвы – гетерогенности каталазы.

По результатам многолетних исследований была разработана шкала для сравнительной оценки ферментативной активности (пероксидазы и каталазы) (табл. 18).

Таблица 18 – Шкала сравнительной оценки удельной активности ферментов

Удельная активность	Пероксидаза, ед/мг белка	Каталаза, ед/мг белка
Очень слабая	< 1	< 0,001
Слабая	1 – 10	0,001 – 0,010
Средняя	10 – 50	0,010 – 0,100
Высокая	50 – 100	0,100 – 1,0
Очень высокая	> 100	> 1,0

Выводы по третьей главе

1. Периоды наибольшей активности пероксидазы и каталазы совпадают с ответственными периодами роста и развития сои (прорастание семян, цветение, образование бобов, налив семян). Удельная активность ферментов в период своего максимума выше у *G. soja*: пероксидаза в 1,5-3 раза, каталаза в 1,5-2 раза, что свидетельствует о её высоком адаптивном потенциале.

2. В онтогенезе листа гетерогенность каталазы уменьшается, пероксидазы – увеличивается. При сравнении электрофоретических спектров каталазы и пероксидазы листьев выявлено большое сходство между сортами *G. max* и *G. soja*, качественные и количественные изменения наблюдаются в процессе роста и развития растений.

3. Удельная активность ферментов семян сои стабилизируется в фазе твердоспелости, электрофоретические спектры ферментов приобретают специфичность в фазе твердой спелости и могут быть использованы в качестве маркеров для тестирования исходного и полученного селекционного материала.

4. Установлены положительные взаимосвязи активности и гетерогенности пероксидазы в листьях и семенах сои со среднесуточной температурой воздуха, активности и гетерогенности каталазы – с количеством осадков.

ГЛАВА 4 АДАПТАЦИЯ И УСТОЙЧИВОСТЬ *G. MAX* И *G. SOJA* К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Большое разнообразие погодно-климатических и почвенных условий разных регионов России, включающие зачастую неблагоприятные (высокие и низкие температуры, засухи, затопление, засоление и т.д.) условия для вегетации растений, способствует значительным потерям урожая многих сельскохозяйственных культур (Смирнова В.С., 2007).

Влияние экстремальных абиотических факторов на растение сопровождается появлением в клетках активных форм кислорода (АФК). Среди АФК выделяют свободнорадикальные частицы – супероксидный радикал-анион ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), пероксидный радикал (RO_2^{\cdot} и др.) и нейтральные молекулы, такие как пероксид водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2), озон (O_3) (Мерзляк М.Н., 1989; Чеснокова Н.П. и др., 2006; Максимов И.В., Черепанова Е.А., 2006; Полесская О.Г., 2007; Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В., 2009; Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Саляев Р.К., 2011; Колупаев Ю.Е., 2016; Noctor G., Foyer C.H., 1998; Scandalios J.G., 2002; 2005; Miller G., Mittler R., 2006).

В целом, большинство АФК является продуктами нормального метаболизма растений, но в неблагоприятных условиях (засуха, засоление, низкие и высокие температуры, избыток тяжелых металлов в почве, действие гербицидов и пр.) их количество значительно возрастает (Чеснокова Н.П. и др., 2006; Ли Т.К., 2008; Ахмад П., Джалил К.А., Шарм С., 2010; Гарифзянов А.Р. и др., 2012; Meneguzzo S., Navarri-Izzo F., Izzo R., 1999; Mittler R., 2002; Mittler R. et al., 2004; Cheeseman J.M., 2007). Время жизни радикалов кислорода чрезвычайно мало в силу их высокой реактивности, а их внутриклеточное содержание находится под жестким контролем антиоксидантной системы, однако под действием некоторых стрессоров происходит чрезмерное накопление АФК, что приводит к патологическим

последствиям (Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х., 2003; Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н., 2011; Imlay J.A., 2003).

В нейтрализации образующихся АФК участвуют разнообразные антиоксидантные системы – ферментативные и неферментативные, которые способны обеспечить защиту от кислородных радикалов и синглетного кислорода (Меньщикова Е.Б., Зенков И.К., 1993; Чиркова Т.В., 2002; Полесская О.Г., 2007; Чупахина Г.Н., Масленников П.В., Скрыпник Л.Н., 2011; Arora A., Sairam R.K., Srivastata G.S., 2002; Ahmad P., Sarwat M., Sharma S., 2008; Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C., 2008; Karuppanarandian Th. et al., 2011). Антиоксидантные ферменты: супроксиддисмутаза, каталаза, семейство пероксидаз, аскорбат-глутатионового цикла – аскорбатпероксидаза и глутатионредуктаза, а также трансфераза, обеспечивают комплексную антирадикальную защиту растительных клеток (Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Саляев Р.К., 2011; Polle A., 2001; Mittler R., 2002; Neill S., Desikan R., Hancock J., 2002; Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V., 2003; Apel K., Hirt H., 2004; Harrach B.D., Fodor J., Varna B., 2005).

Однако ферментная защита может оказаться менее эффективной в сравнении с протекторным действием низкомолекулярных антиоксидантов. Причина этого – быстрая инактивация конститутивного пула ферментов свободными радикалами и необходимость времени для их синтеза. При этом повышается значение низкомолекулярных соединений, которые избыточны и обладают относительной свободой миграции в клеточной и тканевой среде (Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П., 1993).

Неферментативная система защиты представлена соединениями-антиоксидантами, такими как каротиноиды, аскорбиновая кислота, восстановленный глутатион, токоферолы, флавоноиды и др. (Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П., 1993; Прадедова Е.В. и др., 2011; Чупахина Г.Н. и др., 2011; Прядехина Е.В., Лапшин П.В., Загоскина Н.В., 2014; Колупаев Ю.Е., 2016; Siess H., Stahl W., 1997; Smirnoff N., 2000; Blokhina O., Virolainen