

**ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ СОЗРЕВАНИИ  
СОЧНЫХ ПЛОДОВ И ИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ЗАРАЖЕНИЮ****М.А. ПРОЦЕНКО, Е.А. БУЛАНЦЕВА, А.О. РУЖИЦКИЙ, В.П. ХОТЧЕНКОВ**

В процессе созревания и хранения сочные плоды с разной интенсивностью поражаются заболеваниями. Размягчение тканей при созревании связывают с активностью полигалактуроназы. Исследование биосинтеза этилена одновременно с определением активности белкового ингибитора полигалактуроназы (БИПГ) под влиянием обработок физиологически активными соединениями позволяет получить данные о молекулярных механизмах созревания и иммунитета растений, а также предложить биотехнологические приемы оптимизации этих функций. Мы изучили изменение интенсивности биосинтеза этилена и накопления БИПГ в плодах яблони (*Malus domestica* Borkh.) ранних и поздних сортов (Антоновка обыкновенная, Московское позднее, Московское зеленое, Студенческое, Мантуанское) и банана (*Musa acuminata* Colla) при созревании и под действием регуляторов роста и ингибиторов биосинтеза этилена, а также оценили скорость созревания и степень устойчивости плодов к 11 видам микроорганизмов, патогенных и непатогенных для изучаемых культур. Обработка плодов этилидом, разлагающимся в плодах с образованием этилена, вызывает усиленное накопление 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и выделение  $C_2H_4$ , что приводит к ускорению созревания плодов. Обработка антиоксидантом асаксантинном задерживает процесс созревания. Аминоэтоксивинилглицин, аминоксиуксусная кислота и  $CoCl_2$  ингибируют биосинтез этилена в плодах, замедляя их созревание. Задержка в созревании плодов сопровождается повышением содержания БИПГ, а также накоплением олигоуронидов, участвующих в стимуляции реакций, препятствующих развитию заболеваний.

**Ключевые слова:** сочные плоды, созревание, этилен, белковый ингибитор полигалактуроназы, заражение, физиологически активные соединения.

**Keywords:** fleshy fruits, ripening, ethylene, polygalacturonase inhibiting protein, infection, physiologically active compounds.

Сочные плоды в период созревания и хранения с разной интенсивностью поражаются заболеваниями. Размягчение тканей при созревании связывают с полигалактуроназой (ПГ) — поли-(1,4- $\alpha$ -D-галактуронид)гликаногидролазы (КФ 3.2.1.15), повышение активности которой отмечено в зрелых сочных плодах у многих растений (1). ПГ, секретируемая патогенными организмами, служит одним из основных факторов, способствующих разрушению клеточных стенок и внедрению микроорганизмов в ткани растения (2). Белковый ингибитор полигалактуроназы (БИПГ) локализуется в апопласте, связываясь с клеточной стенкой (3), и может играть важную роль как при формировании качества плодов, так и в процессах, связанных с их устойчивостью к поражению микроорганизмами (4). Под влиянием БИПГ изменяется размер олигоуронидов, образующихся при действии ПГ на пектин клеточных стенок, причем источником фермента служат не только ткани растения, но и внедряющиеся в них микроорганизмы. Олигоурониды имеют большое значение для регуляции ряда процессов в растительной клетке: так, они участвуют в стимуляции выделения этилена и служат элиситорами изменений в метаболизме, препятствующих внедрению патогенных микроорганизмов (5).

В высших растениях функционирует гормональная система, координирующая их рост и развитие. Фитогормон этилен вовлекается во многие физиологические процессы в сочных запасающих органах, включая их созревание, старение и устойчивость к заболеваниям (6). Предшественником этилена в метиониновом цикле его биосинтеза служит 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (АЦК). При созревании происходит накопление АЦК в плодах (7). Регуляция биосинтеза этилена в сочных пло-

дах может влиять на процесс их созревания и длительность послеуборочного хранения. Обработка плодов галоэтанпроизводными — физиологически активными соединениями (ФАС), разлагающимися в плодах с образованием этилена, вызывает выделение последнего, приводящее к ускорению созревания плодов, и усиленное накопление АЦК. К числу подобных соединений относится препарат этацид. Обработка плодов антиоксидантами задерживает процесс созревания. Препарат астаксантин проявляет все свойства, характерные для таких антиоксидантов и обладает иммуностимулирующим и антибактериальным действием. Аминоэтоксивинилглицин (АВГ) и аминоксиуксусная кислота (АОК) — специфические ингибиторы синтазы АЦК,  $\text{CoCl}_2$  ингибирует биосинтез этилена в плодах на этапе превращения АЦК в этилен (7).

Исследование биосинтеза этилена одновременно с определением активности БИПГ под влиянием обработок ФАС позволяет получить новые данные о молекулярных механизмах созревания и иммунитета растений, а также предложить биотехнологические приемы оптимизации этих функций.

Целью нашего исследования была оценка влияния обработки плодов яблони и банана физиологически активными соединениями и ингибиторами биосинтеза этилена на выделение  $\text{C}_2\text{H}_4$ , активность белкового ингибитора полигалактуроназы, созревание и степень устойчивости плодов к поражению фитопатогенными микроорганизмами.

**Методика.** В качестве экспериментальных объектов использовали плоды яблони (*Malus domestica* Borkh.) ранних и поздних сортов (Антоновка обыкновенная, Московское позднее, Московское зеленое, Студенческое, Мантуанское) и плоды банана (*Musa acuminata* Colla), дозревавшие при послеуборочном хранении в стандартных условиях (+10 °С) или при комнатной температуре. В начале хранения плоды опрыскивали растворами этацида (500 мг/л) или ингибиторов биосинтеза этилена ( $\text{CoCl}_2$  —  $10^{-3}$  М, АВГ —  $5 \times 10^{-4}$  М, АОК —  $10^{-3}$  М). Астаксантин применяли в виде комплекса, содержащего циклодекстрин и 8 % астаксантина, что позволяло растворить препарат в воде при 40 °С. В контроле для обработки использовали воду. После опрыскивания плоды обсушивали на воздухе. Образцы для анализа отбирали в процессе хранения. У яблок степень зрелости обозначали как фазы созревания (I, II, III), которые характеризовали по интенсивности выделения этилена, у бананов — определяли в зависимости от окраски (I — светло-зеленые, II — светло-желтые и III — ярко-желтые).

Степень поражения тканей у плодов яблони оценивали, измеряя радиус пятна при искусственном заражении специфическими и неспецифическими для культур патогенами — *Alternaria* sp. (томат), *Botrytis cinerea* (лук), *B. cinerea* (малина), *Fusarium graminearum*, *Fusarium* sp. (картофель), *Fusarium* sp. (томат), *Monilia* sp., *Penicillium* sp., *Septoria nodorum*, *Verticillium dahliae* Kleb., *Verticillium* sp. (картофель).

Количество этилена измеряли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) (8). Для этого плоды на 1 сут помещали в эксикаторы с газоотводной трубкой для отбора пробы газа. Для более детального исследования механизма действия ФАС использовали экспериментальную модель — срез ткани плода толщиной 0,2-0,3 см и диаметром 1 см (общая масса около 1 г) (9). Диск (20 шт.) инкубировали в 0,1 М фосфатном буфере (рН 4,5) в сосудиках объемом 20 мл с газоотводной трубкой. Модель реагировала на внесение препаратов изменением содержания этилена. Пробы газа (1 мл) вводили в газовый хроматограф GC 2010 с масс-спектрометрическим детектором GCMS QP 2010 («Shimadzu», Япония).

Препараты ПГ получали осаждением сульфатом аммония (90 % на-

сыщения) из культурального фильтрата после выращивания грибов в течение 7 сут при 28 °С на качалке в жидкой среде с пектином (10). Активность ПГ определяли по радиусу (R) прозрачной зоны вокруг лунки в слое агарозы с добавлением деметоксилированного яблочного пектина после обработки геля 1 % раствором цетавлона (бромистый цетилтриметиламмоний). Препараты БИПГ получали экстрагированием из гомогената растительной ткани ацетатным буфером (20 мМ, рН 5,2), содержащим меркаптоэтанол (2 мМ; «Sigma», США) и Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (0,2 %) с добавлением NaCl (1 М). Из экстракта материал осаждали сульфатом аммония (90 % насыщения). Синтез олигоуронидов в модельной системе регистрировали на спектрофотометре СФ-26 («ЛОМО», СССР) при λ = 520 нм по количеству редуцирующих групп, образующихся из полигалактуроновой кислоты за единицу времени (мкмоль/ч) (11). Ингибирующий эффект БИПГ выявляли по снижению активности ПГ тест-объекта *Verticillium dahliae* Kleb., выраженному в условных единицах (усл. ед.) как процент уменьшения радиуса обесцвеченной под действием БИПГ зоны, отнесенный к массе сырой ткани, из которой получен его препарат. Данные, характеризующие действие БИПГ, отражают его накопление в исследуемых тканях.

Все определения выполняли в 3 повторностях. Статистическую обработку проводили по Н.А. Плохинскому (12).

**Результаты.** Плоды яблони оказались более устойчивы к поражению возбудителем бурой гнили (*Monilia fructigena*) на ранних стадиях созревания, чем в период послеуборочного хранения. Эта закономерность сохранялась у разных сортов (табл. 1).

**1. Интенсивность поражения (П, мм) плодов возбудителем бурой гнили *Monilia fructigena* Pers. и активность белкового ингибитора полигалактуроназы (И, усл. ед.) в них у разных сортов яблони *Malus domestica* Borkh. в процессе созревания и хранения (среднее из 3 измерений)**

Дата	Антоновка обыкновенная		Московское позднее		Московское зеленое		Студенческое	
	П	И	П	И	П	И	П	И
22.07	50	1,2	40	0,0	50	1,8	35	1,0
05.08	31	1,1	40	0,6	15	1,9	32	3,0
22.08	25	0,0	35	1,0	25	1,2	23	0,3
03.09	19	1,2	15	3,0	22	1,8	20	0,1
13.09	8	1,1	10	2,0	11	0,9	10	0,2
27.09	8	1,9	2	1,0	5	2,4	5	0,7
11.10	11	1,5	4	2,0	3	2,2	7	0,7
25.10	7	5,9	3	3,3	6	2,8	5	2,8
11.11	5	1,4	6	5,0	7	2,5	8	4,6
22.11	6	2,8	8	2,2	5	2,7	6	1,7

Препарат БИПГ, выделенный из плодов яблони, более интенсивно действовал на ПГ микроорганизмов, способных поражать эти плоды, чем на ПГ грибов, которые считаются непатогенными для яблони (рис. 1). В процессе роста на дереве и затем после съема у разных сортов яблони содержание БИПГ в плодах изменялось неодинаково, однако отмечались некоторые общие закономерности (см. табл. 1). Так, имелось два основных пика увеличения этого показателя. Один, меньший, проявлялся ко времени окончания роста плодов, но до наступления технической зрелости. Второй, значительно больший, был обнаружен в период дозревания после съема плодов. Эти пики выявлялись как у поздних сортов, так и у ранних, варьировали только сроки их появления.

Было обнаружено ингибирующее действие БИПГ, выделенного из плодов яблони, на ПГ патогенов яблони (*Monilia fructigena* Pers.) и других культур. БИПГ из яблок двух сортов по-разному подавлял ПГ фитопатогенных грибов (см. рис. 1). При этом сильный ингибирующий эффект, как правило, коррелировал со слабым поражением тканей плодов, что подтвер-

ждает участие БИПГ в повышении устойчивости растений к заболеваниям.

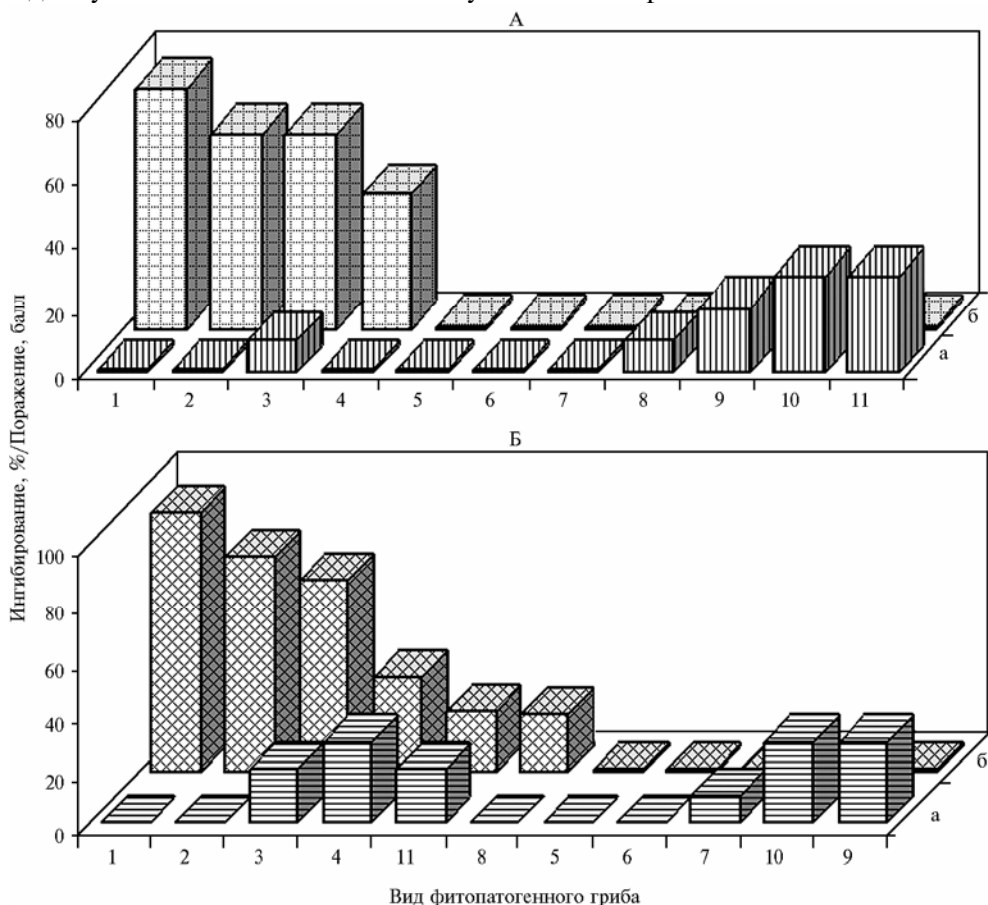


Рис. 1. Действие белкового ингибитора полигалактуроназы (а) из яблок на полигалактуроназу фитопатогенных грибов, специфичных в отношении яблони *Malus domestica* Borkh. и других культур, и интенсивность поражения плодов этими грибами (б) у сортов Мантуанское (А) и Антоновка обыкновенная (Б): 1 — *Verticillium dahliae* Kleb., 2 — *Fusarium graminearum*, 3 — *Fusarium* sp. (томат), 4 — *Septoria nodorum*, 5 — *Verticillium* sp. (картофель), 6 — *Botrytis cinerea* (малина), 7 — *B. cinerea* (лук), 8 — *Fusarium* sp. (картофель), 9 — *Alternaria* sp. (томат), 10 — *Penicillium* sp., 11 — *Monilia* sp.

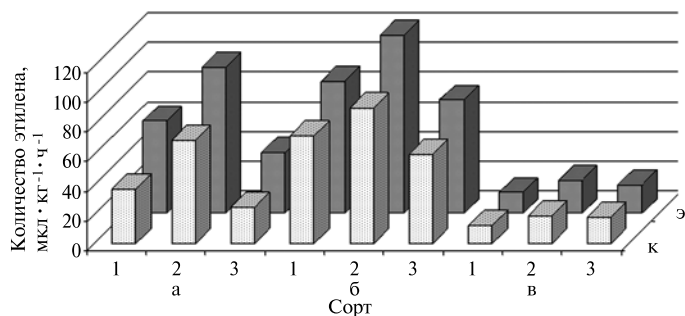


Рис. 2. Выделение этилена плодами у разных сортов яблони *Malus domestica* Borkh. и банана *Musa acuminata* Colla в период созревания и старения, а также при обработке этицидом: 1 и 2 — соответственно I и II фаза созревания, 3 — старение; а — сорт Антоновка обыкновенная, б — сорт Мантуанское, в — банан; к — контроль, э — этицид.

При хранении плодов яблони эффект БИПГ в отношении образования олигоуронидов изменялся и различался в зависимости от сорта (рис. 2).

При дозревании плодов яблони и банана в процессе хранения было выявлено увеличение выделения этилена до максимума при достижении физиологической зрелости и далее постепенное

снижение анализируемого показателя при старении плодов (рис. 3). Отмечалось также увеличение содержания АЦК в плодах яблони по мере

созревания при хранении.

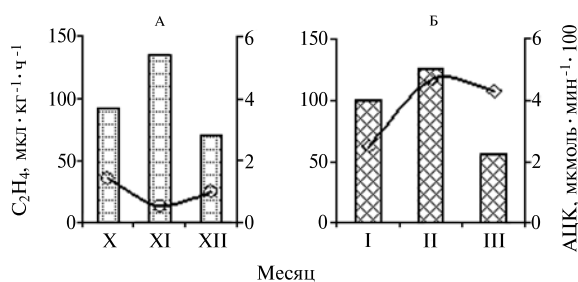


Рис. 3. Выделение этилена (диаграмма) и 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) (график) в плодах яблони сортов Антоновка обыкновенная (А) и Мантуанское (Б) в процессе хранения.

При обработке плодов яблони этицидом количество выделяемого этилена увеличивалось в среднем на 20-25 % в зависимости от

сорта и физиологического состояния плодов и происходило ослабление ингибирующего эффекта БИПГ, который в контроле значительно усиливался по достижении II фазы созревания (см. рис. 2, а, б). В плодах банана разной степени зрелости этицид вызывал увеличение выделения этилена: в I и II фазу — в среднем на 25-30 %, в III — на 10 % (см. рис. 2, в). При этом созревание и выравнивание окраски плодов стимулировались одновременно, что важно для их товарного вида. Следует отметить, что у бананов I и II степени зрелости, обработанных этицидом, в течение последующих 10 сут хранения при комнатной температуре микробиологическое поражение не превышало 5 %, тогда как в контрольных образцах составляло 10 %. По-видимому, такое действие связано с антисептическими свойствами препарата.

Инкубация ткани яблок двух сортов с АВГ в течение 1 ч уменьшала содержание АЦК в среднем на 30 % (рис. 4). Эффективность обработ-

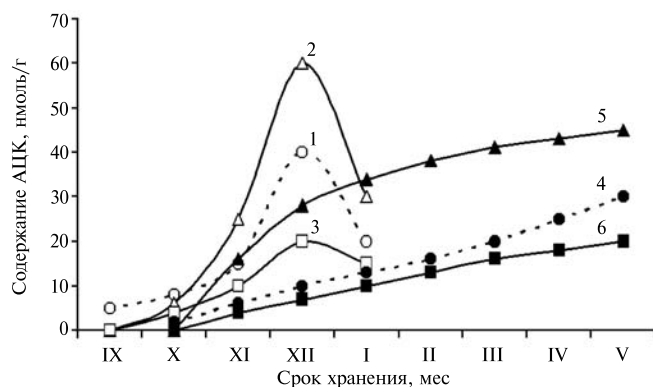


Рис. 4. Содержание 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) в плодах у разных сортов яблони *Malus domestica* Borkh. в процессе хранения с сентября по май и при действии регуляторов биосинтеза этилена: 1, 2, 3 — сорт Антоновка обыкновенная, 4, 5, 6 — сорт Мантуанское; 1, 4 — контроль, 2, 5 — обработка этицидом, 3, 6 — обработка аминоэтоксвинилглицином (АВГ).

Действие  $Co^{2+}$  зависело от продолжительности инкубации и степени зрелости плодов: на I и II стадиях созревания они были более чувствительны к действию  $Co^{2+}$ , нежели находящиеся в стадии старения. Содержание БИПГ в плодах яблони сорта на I, II и III стадиях созревания составило соответственно 16,0; 5,4 и 16,9 условных единиц активности (усл. ед.). При применении АВГ этот показатель равнялся соответственно 8,0; 8,0 и 23,5 усл. ед., под воздействием  $CoCl_2$  — 20,0; 14,0 и 8,9 усл. ед. Иными словами, на I и II стадиях в плодах, обработанных  $Co^{2+}$ , количество БИПГ оказалось несколько выше, чем в контроле. Однако изменение активности

ки различалась в зависимости от сорта, определялась предшествующим накоплением АЦК и зависела от сроков созревания сорта (стадия старения плодов у более раннего сорта Антоновка обыкновенная наступает в ноябре—декабре, тогда как у зимнего сорта Мантуанское — в феврале—марте).

$Co^{2+}$  ингибировал превращение АЦК в этилен, что приводило к снижению выделения последнего.

БИПГ, по-видимому, не связано непосредственно с процессами, обуславливающими интенсификацию выделения этилена. Следовательно, АВГ и  $Co^{2+}$  ингибируют выделение этилена на разных этапах биосинтеза, что и приводит к замедлению созревания плодов.

Обработка плодов яблони сорта Антоновка обыкновенная 0,02 % раствором астаксантина через 2 нед после сбора снижала выделение этилена и отодвигала его пик (табл. 2). При этом поражаемость плодов яблони микроорганизмами уменьшилась за 1 мес хранения на 10-15 %. В плодах банана астаксантин задерживал выделение этилена по сравнению с контролем. Обработанные плоды бананов, которые 14 сут находились при комнатной температуре, сохраняли тургор, хранившиеся при 10 °С — нуждались еще в 2-3-суточном дозревании перед реализацией. После применения астаксантина поражение фитопатогенными грибами у плодов банана в условиях хранения при комнатной температуре не превышало 5 %, при 10 °С — снизилось до 1 % (доля таких плодов в контроле — около 10 %).

**2. Динамика выделения этилена (мкл · кг<sup>-1</sup> · ч<sup>-1</sup>) при хранении плодов после обработки астаксантином у яблони *Malus domestica* Borkh. (сорт Антоновка обыкновенная) и банана *Musa acuminata* Colla (среднее из 3 измерений)**

Срок хранения, сут	Яблоня		Банан	
	контроль	астаксантин	контроль	астаксантин
5-е	55,1	50,4	25,1	22,0
10-е	60,5	51,6	28,9	22,8
15-е	64,5	53,0	23,4	22,0
20-е	62,0	55,1	23,0	22,0
25-е	61,0	54,1	н.о.	н.о.

Примечание. н.о. — не определяли, поскольку продолжительность хранения бананов менее 25 сут.

Выявленные закономерности характерны для сочных плодов растений разных видов. Хотя интенсивность биосинтеза этилена в тканях плодов у банана ниже, чем у яблока, отмечалось ее увеличение во II фазу созревания. Созревание плодов сопровождалось изменением содержания в тканях БИПГ, при действии которого снижается активность ПГ фитопатогенных микроорганизмов, что приводит к увеличению размера образующихся олигоурунидов. Обработка плодов яблони и банана этацидом индуцировала выделение этилена, вызывая ускорение созревания, а также накопление АЦК в плодах яблони. Ингибиторы аминоксиуксусная кислота, АВГ и  $CoCl_2$  проявляли действие на разных этапах биосинтеза этилена, задерживая физиологический процесс старения, вследствие чего возрастала продолжительность хранения. Обработка астаксантином увеличивала время до появления пика выделения этилена плодами. Содержание БИПГ коррелировало с интенсивностью выделения этилена. Поражаемость плодов фитопатогенными микроорганизмами снижалась в результате ингибирования активности ПГ патогенов. Динамика активности БИПГ в плодах свидетельствует о его важной роли в комплексе процессов созревания.

Таким образом, в регуляции созревания плодов принимает участие белковый ингибитор полигалактуроназы (БИПГ), активность которого выявлена в плодах яблони и банана. Содержание БИПГ изменяется в зависимости от стадии зрелости плодов и коррелирует с количеством выделяемого этилена. БИПГ действует на полигалактуроназу (ПГ) фитопатогенных микроорганизмов, что способствует снижению поражаемости плодов при хранении. Механизм действия препарата этацид связан с активизацией выделения этилена. Этилен, образующийся в результате разложения препарата и усиления биосинтеза этилена, участвует в регуляции процессов созревания плодов и их устойчивости к заражению фитопатогенными микроорганизмами. Результаты проведенных исследований могут быть использованы при разработке биотехнологий повышения лежкоспособности

ЛИТЕРАТУРА

1. Проценко М.А., Буланцева Е.А., Кораблева Н.П. Белковые ингибиторы полигалактуроназы в сочных плодах растений при их созревании и инфекциях. Физиология растений, 2010, 57(3): 1-8.
2. Hadfield K.A., Bennett A.B. Polygalacturonases: many genes in search of a function. Plant Physiol., 1998, 117(2): 337-343.
3. Проценко М.А., Буза Н.Л., Криницына А.А., Буланцева Е.А., Кораблева Н.П. Белковый ингибитор полигалактуроназы — структурный белок клеточной стенки растения. Биохимия, 2008, 73(10): 1317-1328.
4. De Lorenzo G., D'Ovidio R., Cervone F. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (pgips) in defense against pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol., 2001, 39: 313-335.
5. Ryan C.L., Farmer E.E. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1991, 42: 651-674.
6. Tonutti P., Bonghi S., Ramina A. Modulating effects of ethylene and ethylene inhibitors in the control of fruit ripening. Advances in Plant Ethylene Research, 2007, XXV: 407-415.
7. Салькова Е.Г., Буланцева Е.А., Картвелишвили В.Г. Биохимия созревания сочных плодов. Прикладная биохимия и микробиология, 1995, 31(1): 115-122.
8. Буланцева Е.А., Нгуен Тьен Тханг, Ружицкий А.О., Проценко М.А., Кораблева Н.П. Влияние регуляторов биосинтеза этилена на метаболические процессы в плодах банана разной степени зрелости. Прикладная биохимия и микробиология, 2009, 45(1): 104-108.
9. Черных А.С., Буланцева Е.А., Шапошников Г.Л., Серебряный А.М., Проценко М.А., Салькова Е.Г. Влияние обработки комплексным препаратом (2-хлорэтилфосфоновая кислота + метацид) и бутилоксианизолом на выделение этилена плодами яблони сорта Антоновка и Симиренко. Прикладная биохимия и микробиология, 2004, 40(3): 366-369.
10. Глинка Е.М., Гладких Т.А., Проценко М.А. Выделение из клубня картофеля белкового ингибитора активности полигалактуроназы. Прикладная биохимия и микробиология, 1997, 33(5): 503-507.
11. Milner Y., Avigad G. A cooper reagent for the determination of hexuronic acids and certain ketohexoses. Carbohydr. Res., 1967, 4(4): 359-361.
12. Плохинский Н.А. Биометрия. 2-е изд. М., 1970.

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН,  
119071 г. Москва, Ленинский просп., 33,  
e-mail: protsenko@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию  
17 января 2012 года

AN INFLUENCE OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS  
ON BIOCHEMICAL CHANGES DURING RIPENING OF FLESHY  
FRUITS AND THEIR RESISTANCE TO INFECTION

M.A. Protsenko, E.A. Bulantseva, A.O. Ruzhitskii, V.P. Khotchenkov

S u m m a r y

During ripening and keeping, the fruits are injured with different intensity. A softening of tissues during ripening is effect of polygalacturonase activity. The investigation of ethylene biosynthesis simultaneously with detection of activity of protein inhibitor of polygalacturonase (PIPG) under the influence of treatments by physiologically active compounds permit to obtain the data about molecular mechanisms of ripening and plant immunity, and also to propose the biotechnological methods of optimization of these function. The authors studied the change of the intensity of ethylene biosynthesis and accumulation of PIPG in apple fruits (*Malus domestica* Borkh.) of early and late varieties (Antonovka common, Moskovskoe late, Moskovskoe green, Studencheskoe, Mantuanskoe) and banana (*Musa acuminata* Colla) during the ripening and under the action of growth regulator and inhibitor of ethylene biosynthesis. The authors estimated also the speed of ripening and the degree of fruits resistance to 11 species of microorganisms, which were pathogenic and nonpathogenic for studied cultures. The treatment of the fruits by ethacide, degradating in fruits with ethylene production, results in intensified accumulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and release of ethylene, which causes acceleration in fruits ripening. The treatment by astaxanthin retards a process of ripening. The treatment by aminoethoxyvinylglycine, aminoxyacetic acid and  $\text{CoCl}_2$  inhibits ethylene biosynthesis in fruits and slows down their ripening. The delay in fruits ripening is accompanied by increasing in PIPG content and also by accumulation of oligouronids, which stimulate the reactions, prevented the development of diseases.