

УДК 633:11.+577.151.64

Л. Ф. Дьяченко¹, канд. биол. наук, вед. научн. сотр., **В. Н. Тоцкий**¹, д-р биол. наук, проф., зав. каф., **В. И. Файт**², канд. биол. наук, зав. отделом, **В. А. Топтиков**¹, канд. биол. наук, ст. научн. сотр.,

¹ Одесский национальный университет, кафедра генетики и молекулярной биологии, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

² Селекционно-генетический институт УААН, отдел генетики Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ГЕН-ЭНЗИМНЫХ СИСТЕМ В ПРОРОСТКАХ РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ГЕНАМ *Vrd* ЛИНИЙ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В ПРОЦЕССЕ ЗАКАЛИВАНИЯ

Изучены электрофоретические спектры множественных молекулярных форм пероксидазы (КФ 1.11.1.7), супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), полифенолоксидазы (КФ 1.10.3.1), цитохромоксидазы (КФ 1.9.3.1) и эстераз (КФ 3.1.1-) в проростках почти изогенных по генам *Vrd* линий озимой мягкой пшеницы сортов Мироновская 808 и Эритроспермум 604. Установлено наличие корреляционной зависимости между экспрессивностью отдельных форм исследованных ферментов и продолжительностью закаливания проростков при +2°C. Показано влияние генов *Vrd* и генотипа рекуррентного родителя на величину и направление указанной зависимости.

Ключевые слова: множественные молекулярные формы ферментов, экспрессивность изоформ ферментов, почти изогенные линии.

Среди воздействующих на растения экологических факторов особое место занимает температурный [1, 2]. При действии низких температур у высоко устойчивых к морозу растений в большей степени, по сравнению с чувствительными, возрастает активность ряда ферментов. В частности, отмечено изменение активности каталазы [3], пероксидазы [4], α -амилазы [5], цитохромоксидазы, полифенолоксидазы [6], инвертазы [7] и других ферментов. Можно полагать, что генетически обусловленный уровень морозостойкости растений связан с неодинаковой эффективностью функционирования многих ген-энзимных систем в условиях низкой температуры. Ферменты определяют интенсивность и направленность метаболизма растений при меняющихся условиях внешней среды благодаря наличию механизмов регуляции количественного и качественного состава их множественных молекулярных форм. В силу этого реакции генотипов на уровне ген-энзимных систем лежат в основе онтогенетической адаптации растений к неблагоприятным факторам, в частности к низкой температуре.

Удобным материалом для изучения эффектов генов, контролирующих определенные адаптивные признаки, являются почти изоген-

ные линии растений [8–10]. Большой интерес представляют линии озимой пшеницы, изогенные по генам *Vrd*. Генетическая система *Vrd* (*vernalization requirement duration*) контролирует различия озимых мягких пшениц по продолжительности яровизации [11]. Ген *Vrd1* обладает более выраженным фенотипическим эффектом и обуславливает колошение растений озимой пшеницы после 20–35 суток яровизации в зависимости от различий генотипов по другим генетическим системам скорости развития [12]. Ген *Vrd2* обеспечивает колошение растений после 40–45 суток яровизации, а наличие рецессивных аллелей *vrđ1* и *vrđ2* — после 50–60 суток.

Цель данной работы — исследовать электрофоретические спектры и активность некоторых оксидоредуктаз у почти изогенных по генам *Vrd* линий озимой мягкой пшеницы сортов Мироновская 808 и Эритроспермум 604 и установить степень корреляции между этими показателями и длительностью закаливания растений при низкой положительной температуре.

Материалы и методы исследования

В качестве исходного материала использовали почти изогенные по доминантным генам *Vrd1* или *Vrd2* линии сортов Мироновская 808 (далее Мироновская 808-*Vrd1* и Мироновская 808-*Vrd2*) и Эритроспермум 604 (Эритроспермум 604-*Vrd1* и Эритроспермум 604-*Vrd2*, соответственно) [13]. Оба рекуррентных родителя — сорта Мироновская 808 и Эритроспермум 604 — являются носителями только рецессивных аллелей генов *Vrd* (генотип *vrđ1vrđ1 vrđ2 vrđ2*) [14]. Генотип линий Мироновская 808-*Vrd1* и Эритроспермум 604-*Vrd1* может быть обозначен как *Vrd1Vrd1 vrđ2vrđ2*, а линий Мироновская 808-*Vrd2* и Эритроспермум 604-*Vrd2* — как *vrđ1vrđ1Vrd2Vrd2*.

Семена указанных генотипов пшеницы проращивали в кюветах с песком при комнатной температуре. Пятидневные проростки подвергали первой фазе закаливания при температуре +2°C в камере КНТ-1 при освещении интенсивностью 3000 люкс (день 16 ч — ночь 8 ч) на протяжении 26 суток. Перед постановкой материала в камеру (контроль) а также на 7, 14, 21 и 26 сутки закаливания отбирали по 5–7 проростков для анализа электрофоретических спектров и экспрессивности ферментов.

Экстрагирование ферментов (использовали только листовой материал, без корня), разделение их в полиакриламидном геле и выявление множественных молекулярных форм ферментов после их разделения проводили согласно методике [15]. Для анализа электрофореграмм использовали компьютерную программу АнаИС, с помощью которой для каждой изоформы исследованных ферментов определяли величину относительной электрофоретической подвижности (*Rf*) и экспрессивность (площадь и интенсивность окраски соответствующих полос на электрофореграммах в условных единицах). Статистический и корреляционный анализ данных проводили по Доспехову [16].

Результаты исследования и их анализ

При электрофоретическом разделении множественных молекулярных форм исследованных ферментов не наблюдали видимых качественных различий (наличия дополнительных или отсутствия определенных полос на электрофореграмме) между изогенными по гену *Vrd1* или *Vrd2* линиями и соответствующими рекуррентными родителями — сортами Мироновская 808 и Эритроспермум 604. Вместе с тем отмечались количественные изменения экспрессивности отдельных изоформ ферментов в процессе закаливания растений, о чем свидетельствует изменение интенсивности окрашивания отдельных полос на электрофореграммах при исследовании растений, подвергавшихся закалке (рис. 1). В зависимости от исследуемого

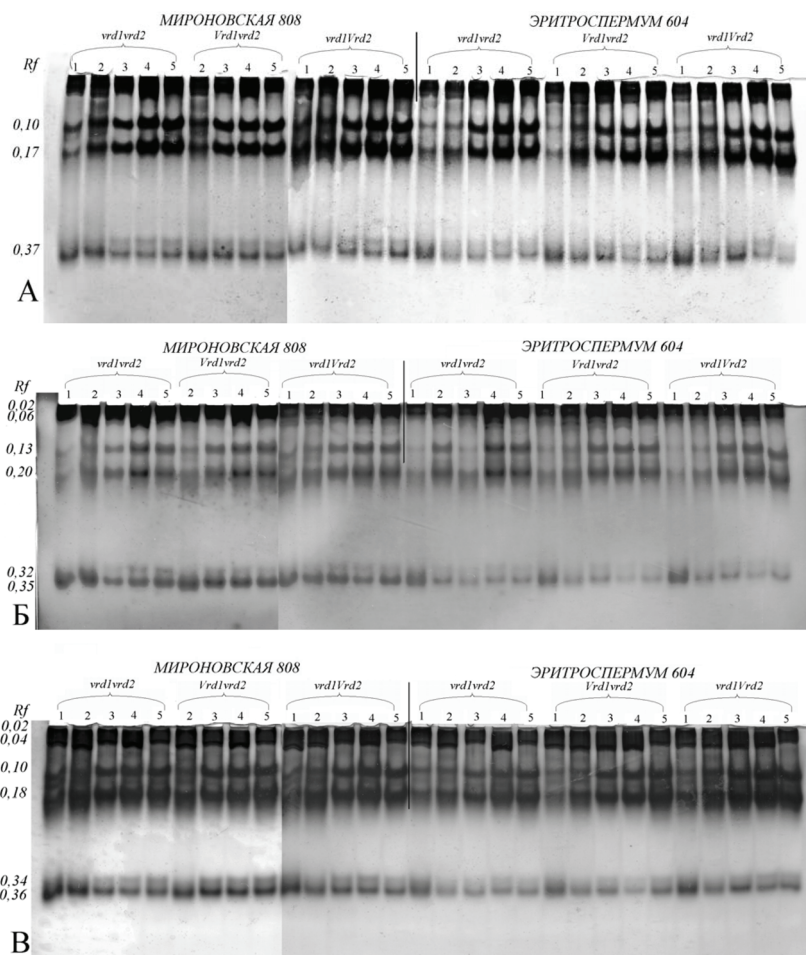


Рис. 1. Электрофореграммы пероксидазы (А), фенолоксидазы (Б) и цитохромоксидазы (В) в процессе закаливания растений. 1 — до закаливания (контроль), 2–7-е; 3–14-е; 4–21-е; 5–26-е сутки закаливания

генотипа существенные изменения экспрессивности ферментов наблюдали на 7–21 день содержания растений пшеницы при +2°C.

Для пероксидазы характерно повышение экспрессивности изоформ с Rf 0,10; 0,17 и снижение данного показателя у формы с Rf 0,37. Суммарная экспрессивность пероксидазы проростков сорта Мироновская 808 в процессе закали растений повышается.

Уровень корреляции экспрессивности отдельных изоформ исследованных ферментов с продолжительностью закали растений Мироновской 808 и ее линий представлены в таблице 1.

Таблица 1

Коэффициенты корреляции экспрессивности множественных форм ферментов с продолжительностью закаливания проростков почти изогенных линий сорта Мироновская 808

Фермент, Rf	Мироновская 808 (рецессив)	Мироновская 808- $Vrd1$	Мироновская 808- $Vrd2$
Пероксидаза, 0,10	0,97**	0,95*	0,83
Пероксидаза, 0,17	0,95*	0,97**	0,96*
Пероксидаза, 0,37	- 0,87	- 0,95*	- 0,90*
Σ	0,97**	0,95*	0,93*
Фенолоксидаза, 0,02-0,06	0,08	- 0,16	0,43
Фенолоксидаза, 0,13	0,14	0,98**	0,87
Фенолоксидаза, 0,20	0,69	0,92*	0,53
Σ	0,17	0,51	0,59
Супероксиддисмутаза, 0,10	0,95*	0,13	0,85
Супероксиддисмутаза, 0,15	0,14	- 0,95*	- 0,79
Супероксиддисмутаза, 0,20	0,97**	0,59	0,82
Σ	0,95*	0,71	0,93*
Цитохромоксидаза, 0,02-0,04	- 0,68	- 0,89*	- 0,53
Цитохромоксидаза, 0,10	0,08	- 0,10	0,70
Цитохромоксидаза, 0,18	- 0,54	0,01	- 0,09
Цитохромоксидаза, 0,34-0,36	- 0,90*	- 0,60	- 0,92*
Σ	- 0,82	- 0,87	- 0,33
Эстераза, 0,02-0,08	- 0,14	0,23	- 0,15
Эстераза, 0,12-0,18	- 0,69	- 0,86	- 0,58
Σ	- 0,42	- 0,64	0,66

* здесь и в таблице 2 значения достоверны: * — при $P \leq 0,05$; * * — при $P \leq 0,01$; Σ — суммарная экспрессивность всех визуализированных на электрофореграмме форм фермента

Из представленных данных видно, что среди исследованных ферментов на продолжительность действия низкой плюсовой температурой наиболее заметно реагирует пероксидаза. В проростках сорта Мироновская 808 повышение экспрессивности формы фермента с Rf 0,10 при закаливании растений наблюдается с достоверностью $P \leq 0,01$, так же достоверно увеличивается при этом суммарная экспрессивность фермента. Экспрессивность изоформы пероксидазы с Rf 0,17 также коррелирует с продолжительностью закаливания растений, но с меньшей степенью достоверности ($P \leq 0,05$).

Кроме пероксидазы, у сорта Мироновская 808 с продолжительностью закаливания коррелирует экспрессивность двух изоформ супероксиддисмутазы с Rf 0,10 ($P \leq 0,05$), Rf 0,20 ($P \leq 0,01$) и суммарная экспрессивность этого фермента ($P \leq 0,05$). У формы цитохромоксидазы с Rf 0,34–0,36 экспрессивность в процессе закаливания снижается с вероятностью $P \leq 0,05$. У остальных изоформ цитохромоксидазы, а также фенолоксидазы и эстераз не наблюдаются достоверных корреляционных зависимостей между их экспрессивностью и длительностью содержания при низкой положительной температуре проростков сорта Мироновская 808.

Замена рецессивного аллеля *vrđ1* сорта Мироновская 808 на ее доминантный аллель *Vrd1* почти изогенной линии Мироновская 808-*Vrd1* приводит к изменению величины корреляции между экспрессивностью отдельных изоформ и продолжительностью воздействия низкой температуры. Так, в отличие от рекуррентного родителя, у линии Мироновская 808-*Vrd1* с продолжительностью закаливания достоверно коррелирует экспрессивность изоформы пероксидазы с Rf 0,37 и двух изоформ фенолоксидазы с Rf 0,13 и 0,20. Кроме того, наблюдаются изменения экспрессивности отдельных изоформ супероксиддисмутазы и цитохромоксидазы. Практически неизменной в процессе закаливания у всех генотипов остается экспрессивность эстераз.

У линии Мироновская 808-*Vrd2* реакция пероксидазы на длительное воздействие температуры +2°C остается фактически такой же, как и в проростках линии Мироновская 808-*Vrd1*. В то же время по сравнению с контролем (Мироновская 808, генотип *vrđ1vrđ1vrđ2vrđ2*) у линии Мироновская 808-*Vrd2* не изменяется экспрессивность фенолоксидазы, цитохромоксидазы, эстераз.

Сорт Эритроспермум 604 характеризуется более низкой морозостойкостью [17]. Длительное закаливание растений этого сорта вызывает менее значительные изменения экспрессивности пероксидазы и супероксиддисмутазы, чем в случае сорта Мироновская 808 (табл. 2). Важно то, что в проростках Эритроспермум 604 с продолжительностью закаливания коррелирует экспрессивность иной, чем в проростках Мироновской 808, изоформы цитохромоксидазы (с Rf 0,10). Кроме того, прослеживается корреляционная связь продолжительности закаливания с экспрессивностью изоформы фенолоксидазы (Rf 0,13), чего не наблюдали у Мироновской 808.

Таблица 2

Коэффициенты корреляции экспрессивности множественных форм ферментов с продолжительностью закаливания проростков почти изогенных линий сорта Эритроспермум 604

Фермент, R_f	Эритроспермум 604 (рецессив)	Эритроспермум 604- <i>Vrd1</i>	Эритроспермум 604- <i>Vrd2</i>
Пероксидаза, 0,10	0,78	0,87	0,99**
Пероксидаза, 0,17	0,90*	0,94*	0,99**
Пероксидаза, 0,37	- 0,82	- 0,82	- 0,80
Σ	0,80	0,83	0,88
Фенолоксидаза, 0,02-0,06	0,81	0,19	0,94*
Фенолоксидаза, 0,13	0,89*	0,94*	0,96*
Фенолоксидаза, 0,20	0,86	0,34	0,98**
Σ	0,80	0,17	0,95*
Супероксиддисмутаза, 0,10	0,76	0,57	0,03
Супероксиддисмутаза, 0,15	0,15	0,19	- 0,60
Супероксиддисмутаза, 0,20	0,92*	0,91*	- 0,61
Σ	0,85	0,71	- 0,62
Цитохромоксидаза, 0,02-0,04	- 0,43	0,02	0,74
Цитохромоксидаза, 0,10	0,97*	0,98**	0,94*
Цитохромоксидаза, 0,18	0,73	0,49	0,60
Цитохромоксидаза, 0,34-0,36	- 0,62	- 0,55	0,32
Σ	0,40	0,81	0,78
Эстераза, 0,02-0,08	0,11	- 0,78	- 0,90*
Эстераза, 0,12-0,18	- 0,17	- 0,77	- 0,90*
Σ	- 0,15	- 0,83	- 0,96*

Наличие в генотипе сорта Эритроспермум 604 доминантных аллелей гена *Vrd1* вместо рецессивных *vrđ1* не приводило к изменениям экспрессивности исследованных ферментов в ответ на закаливание растений. Вместе с тем отчетливая реакция наблюдается у растений, имеющих разные аллели гена *Vrd2*. Проростки линии Эритроспермум 604-*Vrd2* в условиях закаливания обнаруживают различия экспрессивности фенолоксидазы по сравнению с исходным сортом. Соответствующие показатели всех трех изоформ и суммарной экспрессивности фермента с высокой степенью достоверности возрастают при закаливании. Одновременно достоверно снижается экспрессивность эстераз.

Экспрессия генов является быстрым ответом на воздействие стрессовых факторов. Как уже отмечалось, в ответ на низкую тем-

пературу происходит повышение экспрессивности отдельных изоформ исследованных ферментов в проростках почти изогенных линий сортов Мироновская 808 и Эритроспермум 604.

У более морозостойкого сорта Мироновская 808 такое повышение более выражено, особенно относительно пероксидазы. Это вполне согласуется с данными литературы: в условиях гипотермии у холодоустойчивых растений активность пероксидазы повышается, а у менее зимостойких остается неизменной или снижается [4]. Авторы (Кучеренко, Капустян, 2004) показали, что степень зимостойкости сортов и линий пшеницы коррелирует с количеством мРНК, кодирующей пероксидазу — *рох 3* и *рох 4*. Именно за счет повышения экспрессии этих генов у зимостойких сортов возрастает суммарная активность пероксидазы.

Вышеизложенное позволяет сделать следующие выводы:

1. В процессе закаливания растений в условиях холодильной камеры на 7–21 день экспрессивность отдельных форм исследованных ферментов изменяется в сторону повышения, особенно у морозостойчивого сорта Мироновская 808.

2. Среди исследованных ферментов наиболее заметно на низкую плюсовую температуру реагирует пероксидаза, затем в порядке уменьшения — супероксиддисмутаза, цитохромоксидаза, фенолоксидаза и эстеразы.

3. Коэффициенты корреляции между экспрессивностью отдельных изоформ с продолжительностью закаливания растений в искусственных условиях различны у гомозиготных рецессивов и доминантов по генам *Vrd1* или *Vrd2*.

4. Влияние аллеля *Vrd2* на экспрессивность отдельных изоформ ферментов сильнее проявляется в генотипе Эритроспермум 604 по сравнению с генотипом Мироновской 808.

Литература

1. Григорюк И. А., Ткачев В. И., Савинский С. В. и др. Методы исследования и способы оценки устойчивости растений к засухе и высокой температуре. — К.: Знание, 1999. — 90 с.
2. Мусиенко М. М. Фізіологія рослин : Підручник. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 392 с.
3. Schmidt M., Feierabend J. Characterization of cDNA nucleotide sequences encoding two differentially expressed catalase isozyme polypeptides from winter rye (*Secale cereale*) // Plant Physiol. — 2002. — Vol. 122. — P. 1457–1465.
4. Кучеренко В. П., Капустян А. В. Фермент пероксидаза і зимостійкість рослин. Монографія. — К.: Фітосоціоцентр, 2004. — 116 с.
5. Барашкова Э. А. Динамика компонентного состава легкорастворимых белков и изозимов некоторых ферментов озимых пшениц после промораживания // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. — 1979. — Т. 64, № 3. — С. 147–153.
6. Сергеева К. А. Физиологические и биохимические основы зимостойкости растений. — М.: Наука, 1971. — 174 с.
7. Колупав Ю. А., Борисенко Л. Р., Рябчун Н. И. Особенности проявления активности инвертаз в условиях гипотермии в связи с морозостойкостью озимых злаков // Физиология и биохимия культ. раст. — 1993. — Т. 25, № 4. — С. 387–392.

8. Крупнов В. А. Методические указания по созданию и использованию наборов изогенных линий у растений // М.: ВАСХНИЛ. — 1984. — 15 с.
9. Стельмах А. Ф. Генетика типа развития и продолжительности вегетационного периода мягких пшениц // Селекция и семеноводство. — К.: Урожай. — 1981. — С. 8–15.
10. Файт В. И. Проблемы генетического анализа зимо-морозостойкости // Физ. и биохим. культ. раст. — 2004. — Т. 36, № 5. — С. 371–382.
11. Stelmakh A., Zolotova N., Fayt V. Genetic analysis of differences in duration vernalization requirement of winter bread wheat // Cereal Research Communications. — 2005. — Vol. 33, N 4. — P. 713–718.
12. Файт В. И. Генетическая система контроля различий по продолжительности яровизации у озимой пшеницы // Цитология и генетика. — 2003. — Т. 37, № 5. — С. 69–76.
13. Файт В. И. Создание почти изогенных и конгенных линий озимой мягкой пшеницы по генам контроля продолжительности яровизационной потребности — Vrd // Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту. — Одеса. — 2002. — № 2. — С. 37–46.
14. Стельмах А. Ф., Золотова Н. А. Генетические различия по продолжительности яровизационной потребности у озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. — 1993. — Т. 27, № 3. — С. 3–7.
15. Топтиков В. А., Мироть С. Л., Дьяченко Л. Ф. и др. Сопряженность устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe и множественных молекулярных форм некоторых ферментов // Цитология и генетика. — 2002. — Т. 36, № 3. — С. 3–11.
16. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. — М.: Колос, 1979. — 415 с.
17. Pilipenko M. V., Chebotar S. V., Fayt V. I. et. al. Microsatellite markers analysis of winter hardiness varieties // Abstracts the 13th International EWAC Workshop. — Prague, Czech Republic, 2005. — P. 15.

Л. Ф. Дьяченко¹, В. М. Тоцкий¹, В. И. Файт², В. А. Топтиков¹

¹ Одеський національний університет,
кафедра генетики і молекулярної біології
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

² Селекційно-генетичний інститут УААН, відділ генетики
Овидіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ ДЕЯКИХ ГЕН-ЕНЗИМНЫХ СИСТЕМ В ПАРОСТКАХ РІЗНИХ ЗА ГЕНАМИ *Vrd* ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ В ПРОЦЕСІ ЗАГАРТОВУВАННЯ

Резюме

Проведено аналіз електрофоретичних спектрів множинних молекулярних форм пероксидази (КФ 1.11.1.7), супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1), фенолоксидази (КФ 1.10.3.1), цитохромоксидази (КФ 1.9.3.1) і естерази (КФ 3.1.1.-) в паростках майже ізогенних по генах *Vrd* ліній озимої м'якої пшениці сортів Миронівська 808 і Еритроспермум 604. Встановлено зростання експресивності окремих множинних молекулярних форм досліджуваних ферментів при загартовуванні рослин в умовах холодильної камери при +2°C. Коефіцієнти кореляції між експресивністю окремих ізоформ і тривалістю загартовування рослин в штучних умовах різні у гомозиготних рецесивів і домінантів по генах *Vrd1* і *Vrd2*. Вплив алеля *Vrd2* на експресивність окремих ізоформ ферментів сильніше виявляється в генотипі Еритроспермум 604.

мум 604 порівняно з геномом Миронівська 808, отже прояв ефекту гена *Vrd2* залежить від генного оточення.

Ключові слова: множинні молекулярні форми ферментів, експресивність ізоформ ферментів, майже ізогенні лінії пшениці.

L. F. Diachenko ¹, V. N. Totsky ¹, V. I. Fait ², V.A. Toptikov ¹

¹ Odessa National University, Department of Genetics and Molecular Biology
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 650026, Ukraine

² Plant Breeding and Genetics Institute,
Ovidiopolskaya St., 3, Odessa, 650036, Ukraine

SOME GENE-ENZYME SYSTEMS EXPRESSION OF DIFFERENT WHEAT LINES WITH *VRD1* AND *VRD2* GENES SEEDLINGS IN ADAPTATION TO LOW TEMPERATURE

Summary

The electrophoretic spectra of multiple molecular forms of peroxidase, superoxide desmutase, phenoloxidase, cytochromoxidase and esterase in epy shoots of some winter nearisogenic to genes *Vrd* lines of varieties Mironovskaya 808 and Erytrospermum 604 have been studied. The increasing of some enzyme isoforms expression was picking up under the low temperature (+2°C). The correlation coefficient between isoforms expression and length of hardening are differentiated in homozygote recessive and dominant genes *Vrd1* and *Vrd2*. The allele effect *Vrd2* was more strong in Erytrospermum 604 genome in comparison with Mironovskaya 808.

Keywords: multiple molecular enzyme forms, expression of enzyme isoforms, almost isogenic wheat lines.