

ДЬЯЧЕНКО Л.Ф.¹, ФАЙТ В.И.², ТОЦКИЙ В.Н.¹, ТОПТИКОВ В.А.¹

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова
Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, carphen@ukr.net
Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и
сортоизучения,
Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дорога, 3, fayt@raso.net

ВЛИЯНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ ГЕНОВ *Ppd* НА ЭКСПРЕССИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ПРИ ЗАКАЛИВАНИИ В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ

Введение. Генетическая основа морозостойкости озимой пшеницы имеет количественную природу и контролируется многими генами. Закаливание существенно увеличивает толерантность растений к неблагоприятным условиям зимовки благодаря многочисленным биохимическим изменениям на клеточном и организменном уровнях (Guy, 1990; Pearce, 1999). Важнейшим звеном акклиматизации является динамическое изменение экспрессии генов (Chinnusamy, 2006; Christov, 2007). Уровень морозостойкости зависит, прежде всего, от темпов замедления начального роста (Fowler et al., 2001), который в условиях укороченного естественного дня осени контролируется генами фотопериодизма. Снижение чувствительности к фотопериоду обусловлено доминантными аллелями генов *Ppd*, а сильная реакция на фотопериод характерна для генотипов-носителей только рецессивных аллелей всех трех генов (Гончаров, 1986). Гены расположены на хромосомах 2A – *Ppd-A1*, 2B – *Ppd-B1*, 2D – *Ppd-D1* (McIntosh, 2003).

Цель данной работы состояла в выяснении взаимодействия генов *Ppd-B1* и *Ppd-D1* со структурными генами некоторых оксидоредуктаз, имеющих отношение к адаптивным реакциям, в процессе закаливания растений в природных условиях.

Материалы и методы. В качестве исходного материала использовали рекомбинантно-замещенные линии озимой пшеницы, созданные на основе итальянского сорта Mara

(генотипы: *Ppd-D1a* и *Ppd-D1b*) и французского сорта *Cappelle Desprez* (генотипы: *Ppd-B1a* и *Ppd-B1b*). Семена указанных линий высевали 1 октября 2006 г. Отбор материала (зеленые листья) начали с 25 октября и проводили на протяжении 10 недель через каждые семь суток. Температурные условия отвечали требованиям, необходимым для прохождения закаливания растений в природных условиях.

Экстрагирование, электрофорез и визуализацию ферментов (пероксидазы – ПО, фенолоксидазы – ФО, цитохромоксидазы – ЦХО, супероксиддисмутазы – СОД) проводили по описанным ранее методикам (Дьяченко, 2001). Электрофореграммы анализировали по программе АнаИС. Для каждой формы фермента по площади и интенсивности окрашивания полосы определяли экспрессивность фермента в условных единицах и удельную долю в процентах. Статистический, корреляционный и дисперсионный анализ результатов проводили по программам Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. Энзимограммы оксидоредуктаз в тканях листьев исследованных линий в начале эксперимента практически однотипны. Выявляемые различия носили количественный характер и проявлялись лишь в неодинаковой интенсивности окрашивания полос в геле. Это может свидетельствовать о различной экспрессивности и/или неодинаковых долях отдельных множественных форм ферментов у исследованных генотипов. По мере снижения температуры воздуха, т.е. прохождения закаливания растений, наблюдали повышение экспрессивности отдельных изоформ. Указанное повышение происходило по-разному для разных ферментов и генотипов. Так, в листьях линий *Cappelle Desprez* с пятой недели отмечено повышение экспрессивности шести форм ПО и трех форм ФО. Наличие доминантного аллеля *Ppd-B1a* у сорта *Cappelle Desprez* приводило к увеличению экспрессивности пяти форм СОД и шести форм ЦХО на четвертой неделе, а наличие рецессивного аллеля *Ppd-B1b* – на пятой неделе. Особенно заметно различие сроков изменения экспрессивности при закаливании в листьях линий сорта *Mara* с доминантными и рецессивными аллелями гена *Ppd-D1*. Так, экспрессивность ряда форм СОД, ФО, ЦХО в листьях линии *Mara Ppd-D1a* увеличивается на второй неделе эксперимента, а в листьях линии *Mara Ppd-D1b* – на пятой неделе.

Различия между генотипами с рецессивными и доминантными аллелями генов *Ppd* четко выявляется при сравнении величин, рассчитанных по формуле: $(Э - К) \times 100 \%$, где Э – экспрессивность фермента на десятой неделе эксперимента, К – экспрессивность этого же фермента на первой неделе (табл. 1). Экспрессивность всех исследуемых ферментов, за исключением пероксидазы у обоих линий сорта *Mara*, у генотипов с доминантными аллелями *Ppd* в конце закаливания увеличивается более существенно по сравнению с аналогичным показателем генотипов с рецессивными аллелями генов фотопериодизма. Особенно это характерно для ФО и ЦХО в листьях линии *Cappelle Desprez Ppd-B1a*, у которой выявлено 10-20-кратное превышение над рецессивным генотипом.

Таблица 1

Изменение общей экспрессивности на десятой неделе эксперимента

Фермент Генотип	Увеличение экспрессивности, %			
	Перокси- даза	Супероксиддис- мутаза	Фенолокси- даза	Цитохромокси- даза
<i>Mara-D1a</i>	183	71	230	476
<i>Mara-D1b</i>	197	22	60	200
<i>Cappelle Desprez- B1a</i>	119	48	531	390
<i>Cappelle Desprez- B1b</i>	41	8	20	32

Исследованные генотипы различаются количеством форм ферментов, экспрессивность которых достоверно коррелирует с длительностью закаливания растений в естественных условиях осени (табл. 2).

Таблица 2

Влияние закаливания растений пшеницы на отдельные показатели исследуемых ферментов

Генотип*	Фермент	Количество форм	Количество форм, экспрессивность которых коррелирует с закаливанием		Количество форм, доля которых коррелирует с закаливанием		Суммарная экспрессивность	Дисперсионный анализ экспрессивности	t-тест экспрессивности	Дисперсионный анализ долей	t-тест долей
			↑	↓	↑	↓					
M.-Ppd-D1a	ПО	11	5	-	2	4	↑	P ≤ 0,241	P ≤ 0,015	P ≤ 0,865	P ≤ 0,8
M.-Ppd-D1b	ПО	11	10	-	2	2	↑				
C.D.-Ppd-B1a	ПО	11	9	-	2	2	↑	P ≤ 0,469	P ≤ 0,052	P ≤ 0,996	P ≤ 0,994
C.D.-Ppd-B1b	ПО	11	6	-	3	3	-				
M.-Ppd-D1a	СОД	13	-	-	-	-	-	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,925	P ≤ 0,923
M.-Ppd-D1b	СОД	13	3	-	1	3	-				
C.D.-Ppd-B1a	СОД	13	2	-	2	-	↑	P ≤ 0,001	P ≤ 0,001	P ≤ 0,856	P ≤ 0,861
C.D.-Ppd-B1b	СОД	13	5	1	4	4	-				
M.-Ppd-D1a	ФО	10	7	-	2	2	↑	P ≤ 0,856	P ≤ 0,734	P ≤ 0,987	P ≤ 0,985
M.-Ppd-D1b	ФО	10	5	-	3	3	↑				
C.D.-Ppd-B1a	ФО	10	8	-	1	1	↑	P ≤ 0,294	P ≤ 0,079	P ≤ 0,999	P ≤ 0,999
C.D.-Ppd-B1b	ФО	10	-	-	2	2	↑				
M.-Ppd-D1a	ЦХ О	10	5	-	2	-	-	P ≤ 0,005	P ≤ 0,001	P ≤ 0,998	P ≤ 0,998
M.-Ppd-D1b	ЦХ О	10	8	-	2	-	↑				
C.D.-Ppd-B1a	ЦХ О	10	9	-	2	2	↑	P ≤ 0,392	P ≤ 0,087	P ≤ 0,968	P ≤ 0,96
C.D.-Ppd-B1b	ЦХ О	10	4	-	2	-	-				

Примечание: * - C.D. – Cappelle Desprez, M. – Mara.

Только в одном случае у линии Cappelle Desprez Ppd-B1b выявлена отрицательная корреляция между экспрессивностью формы СОД и длительностью закаливания растений. В то же время между процентными долями отдельных изоформ ферментов и продолжительностью закаливания растений обнаружены как положительные, так и

отрицательные корреляционные связи. Двухфакторный дисперсионный анализ и парный двухвыборочный t-тест для средних показал, что процентные доли отдельных множественных форм исследованных ферментов в листьях исследованных генотипов при сравнении доминантных и рецессивных генотипов достоверно не различаются. В то же время линии сортов *Mara* и *Cappelle Desprez* достоверно различаются по экспрессивности СОД, а *Mara Ppd-D1a* и *Mara Ppd-D1b* – по экспрессивности ЦХО. Парный t-тест для средних дополнительно выявил различие по экспрессивности пероксидазы между линиями с доминантными и рецессивными аллелями генов *Ppd*. В целом можно отметить, что доминантные аллели генов *Ppd B1* и *Ppd D1* способствуют большему росту общей экспрессивности ферментов в конце закаливания по сравнению с контролем, не подвергавшимся воздействию низкой температуры.

Выводы. Закаливание растений в естественных условиях осени вызывает перемены в функционировании исследуемых оксидоредуктаз, заключающиеся, как правило, в повышении экспрессивности отдельных изоформ и суммарной экспрессивности ферментов. Изменение экспрессивности множественных форм начинается в разные сроки от начала закаливания и зависит от генотипа (*Mara*, *Cappelle Desprez*), рецессивных и доминантных аллелей генов фотопериодизма (*Ppd B1* и *Ppd D1*) и от фермента.

Литература

Дьяченко Л.Ф., Топтіков В.А., Міресь С.Л., Бабаянц Л.Т., Тоцький В.М. Множинні молекулярні форми деяких оксидоредуктаз і резистентність м'якої пшениці до фузаріозу // Вісник ОНУ. – 2001. – Т. 5, № 1. – С. 59-66.

Гончаров Н.П. Генетический контроль фотопериодической реакции у мягкой пшеницы // С.-х. біологія. – 1986. - № 11. – С. 84-90.

Christov N.K., Yoneyama S., Shimamoto Y., Imai R. Differential expression of wheat genes during cold acclimation // Цитология и генетика. – 2007. - № 3. – С. 13-22.

Fowler B., Breton G., Limin A., Mahfoozi S., Sarhan F. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley // Plant Physiol. - 2001. - V. 127. - P. 1676-1681.

Guy C.L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism // Ann. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. – 1990. – V. 41. – P. 187-223.

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M. et al. Catalogue of gene symbols for wheat // Proc. 10th Intern. Wheat Genetics Symp. – Paestum (Italy), 2003. – P. 4.

Pearce R.S. Molecular analysis of acclimation to cold // Plant Growth Reg. – 1999. – V. 29. - P. 47-76.

Резюме. Вивчали електрофоретичні спектри деяких оксидоредуктаз в листах ліній озимої пшениці *Mara-Ppd-D1a*, *Mara-Ppd-D1a*, *Cappelle Desprez-B1a*, *Cappelle Desprez-B1b*. Збільшення експресивності окремих форм ферментів спостерігається в різні строки загартовування та залежить від генотипу і алельного стану генів *Ppd*. Домінантні алелі сприяють більш суттєвому збільшенню експресивності ферментів наприкінці загартування порівняно з рецесивними.

Резюме. Изучали электрофоретические спектры некоторых оксидоредуктаз в листьях линий озимой пшеницы *Mara-Ppd-D1a*, *Mara-Ppd-D1a*, *Cappelle Desprez-B1a*, *Cappelle Desprez-B1b*. Увеличение экспрессивности отдельных форм ферментов происходит в разные сроки закаливания, зависит от генотипа и алельного состояния генов *Ppd*. Доминантные аллели способствуют большему увеличению общей экспрессивности исследованных ферментов в конце закаливания.

Abstracts. The electrophoretic spectra of multiple molecular forms of some oxidoreductase in lines of wheat v.*Mara-Ppd-D1a*, *Mara-Ppd-D1a*, *Cappelle Desprez-B1a*, *Cappelle Desprez-B1b* have been studied. During autumn vernalization in the field different isoforms of enzyme increased expression in lines with dominant and recessive *Ppd* genes. Dominant *Ppd* genes promoted more

considerable increasing of enzyme total expression in the end of plant acclimation in comparison with recessive genes.