

УДК 633.11: 575.2: 581.19

О. Л. Січняк, канд. біол. наук, доц., **Т. А. Мандриченко**, лаб.,
В. М. Тоцький, д-р. біол. наук, проф., зав. каф.
Одесський національний університет ім. І. І. Мечникова,
каф. генетики та молекулярної біології,
Шампанський пров. 2, Одеса, 65058, Україна, e-mail: caphgen@ukr.net

ЗМІНИ СПЕКТРА ПЕРОКСИДАЗИ АЛОПЛАЗМАТИЧНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ГІБРИДИЗАЦІЇ

Досліджували ізозимні спектри пероксидази у аlopазматичних ліній м'якої пшеници та їх гібридів з *Elytricum fertile* та пшеницею Степняк 2К. Найбільш варіабельними виявилися електрофоретичні фракції ферменту з Rf 0,22 та Rf 0,10. Встановлено позитивний вплив цитоплазми *Ae. ventricosa* на експресію ізоформ з Rf 0,65, 0,22 та 0,18, що іноді супроводжувалося збільшенням частки відповідної фракції в спектрі. Аlopазматичні лінії Донської напівінтенсивної реагували на гібридизацію переважно зменшеннем частки та/або експресивності окремих фракцій пероксидази. В протилежність цьому у гібридів аlopазматичних ліній Миронівської 808 ці показники у порівнянні з материнськими формами зростали.

Ключові слова: пероксидаза, ізозими, аlopазми, м'яка пшениця, віддалена гібридизація.

Внаслідок інтенсивної селекції пшеници досягнута майже максимальна потенційна врожайність. На перший план все більше висуваються проблеми стійкості до біотичних та абіотичних чинників. Дикі співродичі пшеници є цінним джерелом генів стійкості до несприятливих умов середовища. Останнім часом чимало уваги в проблемах стійкості надається аlopазмам споріднених видів. Дослідження аlopазматичних ліній м'якої пшеници показали, що перспективними для селекції на адаптивність є плазмони *Aegilops variabilis*, *Ae. cylindrica*, *Ae. squarrosa var. strangulata*, *Triticum dicoccoides* [1].

Наявність багатьох молекулярних форм (ММФ) ферментів значно збільшує адаптивну здатність організмів. Одним із ферментів, що широко використовується як маркерний показник адаптивності, є пероксидаза [2]. Це поліморфний фермент, що виконує регуляторні й захисні функції в рослинах завдяки мінливості його молекулярних форм.

За дослідження спектра пероксидаз та параметрів адаптивності у аlopазматичних ліній м'якої пшеници з'ясувалося, що найбільш варіабельними є середньо рухливі (Rf 0,10–0,24) фракції ферменту, а за мінливістю параметра гомеостатування колоса лінії виявляють певну аналогію з мінливістю середньо рухливої фракції пероксидази [3].

Вивчення спектра пероксидази в залежності від геном-плазмоніх поєднань у гібридів алоплазматичних ліній пшеници складає мету представленої роботи.

Матеріали та методи

Як матеріал для досліджень використовували лінії м'яких пшениць Донська напівінтенсивна і Миронівська 808 з алоплазмами від *Aegilops cylindrica*, *Ae. variabilis*, *Ae. ventricosa*, *Triticum dicoccoides* та з еуплазмою (від *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring). Досліджувались також їх гібриди з пшенично-чужорідним амфіплоїдом *Elytricum fertile* (пшениця х *Elymus sibiricus*) і короткостебловим аналогом сорту Степняк 2 (Степняк 2К) (табл. 1, 2).

Екстракцію ферментів здійснювали з 7-денних етіолованих пастоків буфером (0,05 М трис-HCl, pH = 6,8, 0,1% дитіотреітол, 0,1% аскорбінова кислота, 15% сахароза, 1% тритон X-100) у співвідношенні тканина : буфер — 1 : 1. Для більш повної екстракції гомогенат залишали на ніч у холодильнику та центрифугували лише перед електрофорезом. Надосадова рідина містила легкорозчинні та мембранозв'язані форми ферментів.

Електрофоретичний розподіл ферментів проводили у 10% поліакриламідному гелі в системі Девіса [4] у варіанті електрофорезу без використання геля, що концентрує. Як субстрат за виявлення пероксидази використовували бензидин. Інтенсивність забарвлення та площа смуг оцінювали та математично обраховували за допомогою програми АНАІС. Кожний пік розглядали як окрему фракцію. Частка фракції у спектрі пероксидази оцінювалася у відсотках за відношенням площі піка до сумарної площі усіх піків. Інтенсивність забарвлення смуг обумовлена кількістю молекул у фракції та/або їх питомою активністю. Оскільки ми не мали змоги розділити вплив активності та кількості молекул на забарвлення смуг, то для позначення сумісної оцінки площі та інтенсивності забарвлення (у пікселях) кожного піку використовували термін "експресивність".

Результати та обговорення

У батьківських форм і гібридів виявлено по 8 фракцій пероксидази, які відрізнялися шириною та інтенсивністю забарвлення смуг. Зазначені показники варіювали в залежності від походження певного ядерного геному та плазмону. Ми розглядали окремо вплив гібридизації (тобто комбінації певних ядерних геномів) та різних алоплазм на спектр пероксидази. Для статистичного аналізу було сформовано двохфакторний дисперсійний комплекс без повторень [5].

Найбільш рухлива фракція з Rf 0,65 (табл. 1) була і найбільш виразною за інтенсивністю забарвлення і за площею. Її частка

Таблиця 1
Площа піків* спектра пероксидази (субстрат бензидин) у аlopазматичних ліній пшениці та їх гібридів з
Elytricium fertile та пшеницею Степняк 2К

	Донська напівінтенсивна	Донська напівінтенсивна \times <i>Elytricium fertile</i>	(Донська напівінтенсивна \times <i>Elytricium fertile</i>) \times Степняк 2К	Миронівська 808	Миронівська 808 \times <i>Elytricium fertile</i>	(Миронівська 808 \times <i>Elytricium fertile</i>) \times Степняк 2К	Середня	HCP _{0,05}
Пік1								
<i>Aegilops cylindrica</i>	27,6	38,7	27,3	28,3	31,1	36,2	31,5(1,191)	
<i>Aegilops variabilis</i>	21,7	19,5	23,1	23,8	30,1	34,6	26,5(1,078)	
<i>Aegilops ventricosa</i>	23,1	35,4	34,9	31,0	24,6	32,3	30,2(1,162)	
<i>Triticum dicoccoides</i>	27,1	28,3	26,2	27,4	27,7	23,2	26,7(1,085)	
<i>Triticum aestivum</i>	29,7	30,5	28,9	33,5	26,8	39,0	31,4(1,188)	
Середня	27,0(1,093)	30,5(1,165)	28,1(1,115)	28,8(1,132)	28,1(1,116)	33,1(1,122)	—	0,130
				HCP _{0,05}	0,118	—		
Пік2								
<i>Aegilops cylindrica</i>	19,2	7,5	16,2	14,1	12,9	4,0	12,8(0,772)	
<i>Aegilops variabilis</i>	21,1	18,2	15,8	15,6	14,5	12,8	16,3(0,830)	
<i>Aegilops ventricosa</i>	8,8	10,3	16,5	13,8	17,2	17,3	14,0(0,761)	
<i>Triticum dicoccoides</i>	8,7	15,9	16,0	13,2	23,0	19,1	16,0(0,815)	
<i>Triticum aestivum</i>	11,4	18,2	10,0	17,4	17,1	16,8	15,2(0,796)	
Середня	13,8(0,750)	14,0(0,758)	14,9(0,790)	14,8(0,790)	16,9(0,845)	14,6(0,775)	—	0,164
				HCP _{0,05}	0,150	—		
Пік3								
<i>Aegilops cylindrica</i>	10,1	4,7	7,0	8,3	7,1	7,2	7,4(0,548)	
<i>Aegilops variabilis</i>	9,1	7,2	5,3	8,0	8,4	8,0	7,6(0,560)	
<i>Aegilops ventricosa</i>	13,6	7,1	7,0	8,4	14,2	12,6	10,5(0,653)	
<i>Triticum dicoccoides</i>	9,7	5,9	6,3	8,5	7,1	9,6	7,8(0,566)	
<i>Triticum aestivum</i>	9,4	10,0	6,5	8,6	5,7	8,7	8,1(0,577)	
Середня	10,4(0,655)	6,9(0,531)	6,4(0,512)	8,4(0,595)	8,5(0,584)	9,2(0,614)	—	0,080
				HCP _{0,05}	0,070	—		

Продовження таблиці 1

	Донська напівнічен-сивна	Донська напівнічен-сивна \times <i>Elytricium fertile</i>	(Донська напівнічен-сивна \times <i>Elytricium fertile</i>) \times Степняк 2К	Миронівська 808	Миронівська 808 \times <i>Elytricium fertile</i>	(Миронівська 808 \times <i>Elytricium fertile</i>) \times Степняк 2К	Середня	HCP _{0,05}
Пік 4								
<i>Aegilops cylindrica</i>	8,5	4,9	4,8	10,3	6,7	5,3	6,8(0,520)	
<i>Aegilops variabilis</i>	7,9	5,3	5,5	8,4	6,9	9,1	7,2(0,540)	
<i>Aegilops ventricosa</i>	8,7	6,7	4,6	7,5	11,6	9,3	8,1(0,571)	
<i>Triticum dicoccoides</i>	6,3	6,4	6,6	6,0	7,2	6,5	6,5(0,516)	
<i>Triticum aestivum</i>	8,0	7,9	9,1	8,1	5,1	8,3	7,8(0,562)	
Середня	7,9(0,568)	6,2(0,503)	6,1(0,496)	8,1(0,574)	7,5(0,550)	7,7(0,560)	—	0,082
							HCP _{0,05}	0,075
Пік 5								
<i>Aegilops cylindrica</i>	13,5	7,3	8,3	7,2	6,4	4,9	7,9(0,564)	
<i>Aegilops variabilis</i>	5,4	12,6	13,5	9,1	4,7	8,4	9,0(0,598)	
<i>Aegilops ventricosa</i>	10,4	8,2	3,8	6,0	8,7	7,2	7,4(0,515)	
<i>Triticum dicoccoides</i>	11,9	7,2	6,5	5,7	8,6	7,0	7,8(0,0563)	
<i>Triticum aestivum</i>	12,4	6,9	6,2	6,4	9,1	6,2	7,9(0,564)	
Середня	10,7(0,660)	8,4(0,586)	7,7(0,549)	6,9(0,529)	7,5(0,551)	6,7(0,523)	—	0,123
							HCP _{0,05}	0,112
Пік 6								
<i>Aegilops cylindrica</i>	7,6	6,3	6,5	10,5	9,9	8,1	8,2(0,592)	
<i>Aegilops variabilis</i>	6,5	9,9	11,2	11,5	8,4	5,9	8,9(0,602)	
<i>Aegilops ventricosa</i>	10,4	7,3	7,6	8,8	8,1	5,7	8,0(0,571)	
<i>Triticum dicoccoides</i>	9,5	7,6	5,2	10,3	6,4	10,7	8,3(0,580)	
<i>Triticum aestivum</i>	7,6	4,8	4,6	7,3	8,1	6,2	6,4(0,511)	
Середня	8,3(0,585)	7,2(0,540)	7,0(0,530)	9,7(0,631)	8,2(0,579)	7,3(0,544)	—	0,082
							HCP _{0,05}	0,075

Закінчення таблиці 1

	Донська напівін-сивна	Донська напівін-сивна × <i>Elytricu-um fertile</i>	(Донська напівін-сивна × <i>Elytricu-um fertile</i>) × Степняк 2К	Миронівська 808	Миронівська 808 × <i>Elytricu-um fertile</i>	(Миронівська 808 × <i>Elytricu-um fertile</i>) × Степняк 2К	Середня	HCP _{0,05}
Пік 7								
<i>Aegilops cylindrica</i>	6,1	15,5	10,9	9,7	10,2	11,4	10,6(0,659)	
<i>Aegilops variabilis</i>	10,2	14,0	9,8	10,1	9,9	7,2	10,2(0,647)	
<i>Aegilops ventricosa</i>	11,1	10,6	11,2	13,5	6,4	6,4	9,9(0,633)	
<i>Triticum dicoccoides</i>	9,5	12,1	9,4	13,1	7,9	12,8	10,8(0,667)	
<i>Triticum aestivum</i>	6,4	10,2	11,5	9,1	13,9	7,4	9,8(0,630)	
Середня	8,7(0,593)	12,5(0,720)	10,6(0,661)	11,1(0,677)	9,7(0,627)	9,4(0,605)	—	0,108
						HCP _{0,05}	0,099	—
Пік 8								
<i>Aegilops cylindrica</i>	13,5	15,2	18,9	11,6	15,7	19,9	15,8(0,815)	
<i>Aegilops variabilis</i>	12,2	13,3	15,9	13,5	17,2	14,1	14,4(0,776)	
<i>Aegilops ventricosa</i>	13,9	14,5	14,3	11,1	9,3	9,3	12,1(0,707)	
<i>Triticum dicoccoides</i>	17,4	16,7	23,8	15,8	12,2	11,0	16,2(0,822)	
<i>Triticum aestivum</i>	15,1	11,6	23,2	9,3	14,2	7,5	13,5(0,741)	
Середня	14,4(0,778)	14,3(0,773)	19,2(0,904)	12,3(0,713)	13,7(0,755)	12,4(0,709)	—	0,112
						HCP _{0,05}	0,103	—

* — відсоток від загальної площин всіх смуг пероксидази; для середніх величин площі піків у дужках вказані значення, розраховані після перетворення формулою: $\varphi = 2 \arcsin \sqrt{p}$; значення HCP вказані також для розрахунків після перетворення через акринус.

в спектрах ферментів різних форм складала 19,5–39,0%. Однак, незважаючи на досить широке варіювання цих показників, виявлялася їх певна залежність від конкретного поєднання в клітинах ядерних та цитоплазматичних геномів. Обрахунок площин піків у пікселях, якій відображає активність даних фракцій в умовних одиницях, привів до висновку, що за гібридизації алоплазматичних ліній пшениці Миронівська 808 з *Elytricum fertile* та з пшеницею Степняк 2К (табл. 2) зростає експресивність зазначененої високорухливої форми ферменту. Це зростання особливо помітне в комбінації схрещування (Миронівська 808 × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К. При цьому спостерігаються достовірні відмінності між гібридами (Донська напівінтенсивна × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К та (Миронівська 808 × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К, хоч між алоплазматичними лініями на основі пшениць Донська напівінтенсивна та Миронівська 808 вірогідних відмінностей не було виявлено. Аналіз ефектів алоплазм на експресію швидкорухливої фракції пероксидази виявив вірогідні ($P < 0,05$) відмінності у випадку поєднання генотипів з цитоплазмами від *Ae. ventricosa* та *T. dicoccoides*. Алоплазма від *Ae. ventricosa* сприяла більш високій експресивності зазначененої форми пероксидази у порівнянні з алоплазмою *T. dicoccoides*, хоч і та, і інша за їх впливом на експресію пероксидази мало відрізнялися від впливу еуплазми ($P > 0,05$).

Наступна фракція (пік 2, табл. 1) утворена смугами з R_f 0,29, її частка в спектрах пероксидази складає від 7,0 до 23,0%. Жодних ефектів за зміни ядерного геному шляхом гібридизації або за зміни цитоплазми виявити не вдалося. Обчислення із врахуванням експресивності ферменту на ензимограмах (табл. 2) свідчить про вірогідні відмінності лише між лініями пшениці Миронівська 808 та їх гібридами з *Elytricum fertile*. Включення в гібридизацію амфіплоїда збільшувало експресивність зазначененої фракції пероксидази. Інших відмінностей на електрофорограмах в залежності від ядерного геному або від джерела цитоплазми не виявлено.

Третя фракція (пік 3, табл. 1) утворена смугами з R_f 0,22; її частка в спектрах пероксидази складає 5,3–14,2%. Залежність експресії від ядерних геномів виявлялася лише при порівнянні гібридів алоплазматичних ліній з батьківськими формами та між собою. Так, алоплазматичні лінії пшениці Донська напівінтенсивна мали вірогідно ($P < 0,05$) більшу частку цієї фракції в спектрі пероксидази, ніж гібриди Донська напівінтенсивна × *Elytricum fertile* та (Донська напівінтенсивна × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К. Останні мали вірогідно ($P < 0,05$) меншу частку даної фракції на ензимограмах, ніж гібриди (Миронівська 808 × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К. В зазначеній фракції ферменту виявлено також відмінності в залежності від наявної у форми цитоплазми. Так, форми злаків з цитоплазмою від *Ae. ventricosa* мали значно більшу частку цієї фракції в спектрі пероксидази ($P < 0,05$), ніж форми, створені на основі цитоплазм *Ae. cylindrica*, *Ae. variabilis*, *T. dicoccoides*.

Зміни спектра пероксидази аlopазматичних ліній м'якої пшениці за гібридизації

Таблиця 2

**Площа піків (в умовних одиницях) спектра пероксидази (субстрат бензидин) у аlopазматичних ліній
пшениці та їх гібридів з *Elytricium fertile* та пшеницею Степняк 2К**

	Донська напівінтенсивна	Донська напівінтенсивна \times <i>Elytricium fertile</i>	(Донська напівінтенсивна \times <i>Elytricium fertile</i>) \times Степняк 2К	Миронівська 808 \times <i>Elytricium fertile</i>	Миронівська 808 \times <i>Elytricium fertile</i> \times Степняк 2К	Середня	HCP _{0,05}
Пік 1							
<i>Aegilops cylindrica</i>	60,4	96,6	64,6	44,2	82,0	73,0	40,1
<i>Aegilops variabilis</i>	57,4	53,9	61,5	52,5	87,1	112,2	70,8
<i>Aegilops ventricosa</i>	62,7	93,4	91,8	68,9	75,7	131,0	87,3
<i>Triticum dicoccoides</i>	70,2	68,1	53,6	54,0	83,9	62,2	65,3
<i>Triticum aestivum</i>	59,9	80,6	57,5	71,5	64,6	81,9	69,3
Середня	62,1	78,5	65,8	58,2	78,7	92,1	—
				HCP _{0,05}	18,1	—	19,8
Пік 2							
<i>Aegilops cylindrica</i>	42,0	18,7	38,5	22,0	33,9	14,0	28,2
<i>Aegilops variabilis</i>	43,7	50,4	41,9	34,3	41,9	41,6	42,3
<i>Aegilops ventricosa</i>	23,9	27,1	43,4	30,6	53,0	70,1	41,4
<i>Triticum dicoccoides</i>	22,4	38,3	32,8	26,1	69,7	51,1	40,1
<i>Triticum aestivum</i>	23,0	48,0	20,0	37,2	41,3	35,2	34,1
Середня	31,0	36,5	35,3	30,0	48,0	42,4	—
				HCP _{0,05}	15,3	—	16,8
Пік 3							
<i>Aegilops cylindrica</i>	22,0	11,7	16,6	13,0	18,7	14,6	16,1
<i>Aegilops variabilis</i>	18,8	19,8	14,0	17,5	24,3	26,1	20,1
<i>Aegilops ventricosa</i>	37,1	18,7	18,4	18,6	43,7	51,3	31,3
<i>Triticum dicoccoides</i>	25,1	14,1	12,8	16,8	21,4	25,7	19,3
<i>Triticum aestivum</i>	19,0	26,5	12,9	18,4	13,7	18,2	18,1
Середня	24,4	18,2	14,9	16,9	24,4	27,2	—
				HCP _{0,05}	8,0	—	8,7

Продовження таблиці 2

	Донська напівінтенсивна	Донська напівінтенсивна \times <i>Elytricum fertile</i>	(Донська напівінтенсивна \times <i>Elytricum fertile</i>) \times Степняк 2К	Миронівська 808 \times <i>Elytricum fertile</i>	Миронівська 808 \times (<i>Mirronivs'ka</i> 808 \times <i>Elytricum fertile</i>) \times Степняк 2К	Середня	HCP _{0,05}
Пік 4							
<i>Aegilops cylindrica</i>	18,5	12,2	11,4	16,1	17,8	10,7	14,5
<i>Aegilops variabilis</i>	16,3	14,7	14,6	18,5	20,0	29,6	19,0
<i>Aegilops ventricosa</i>	23,8	17,8	12,2	16,6	35,6	37,7	24,0
<i>Triticum dicoccoides</i>	16,2	15,3	13,6	11,8	21,7	17,4	16,0
<i>Triticum aestivum</i>	16,1	20,8	18,1	17,3	12,3	17,4	17,0
Середня	18,2	16,2	14,0	16,1	21,5	22,6	—
					HCP _{0,05}	6,4	—
Пік 5							
<i>Aegilops cylindrica</i>	16,3	18,1	19,7	11,3	16,9	9,8	15,4
<i>Aegilops variabilis</i>	11,1	34,8	36,0	20,3	13,5	27,1	23,8
<i>Aegilops ventricosa</i>	28,2	21,7	10,1	13,2	26,8	29,1	21,5
<i>Triticum dicoccoides</i>	30,9	17,2	13,3	11,3	26,1	18,8	19,6
<i>Triticum aestivum</i>	25,0	18,2	12,4	14,4	22,0	13,0	17,5
Середня	22,3	22,0	18,3	14,1	21,1	19,6	—
					HCP _{0,05}	9,0	—
Пік 6							
<i>Aegilops cylindrica</i>	16,5	15,7	15,4	16,4	26,1	16,3	17,7
<i>Aegilops variabilis</i>	13,5	27,4	29,8	25,3	24,3	19,1	23,2
<i>Aegilops ventricosa</i>	28,3	19,3	20,4	19,6	24,8	23,1	22,6
<i>Triticum dicoccoides</i>	24,7	18,2	10,6	20,4	19,3	28,7	20,3
<i>Triticum aestivum</i>	15,2	12,6	9,1	15,6	19,7	13,0	14,2
Середня	19,6	18,6	17,1	19,5	22,8	20,0	—
					HCP _{0,05}	6,4	—

Зміни спектра пероксидази аlopазматичних ліній м'якої пшениці за гібридизації

Закінчена табл. 2

	Донська напівінтенсивна	Донська напівінтенсивна \times <i>Elytricium fertile</i>	(Донська напівінтенсивна \times <i>Elytricium fertile</i>) \times Степняк 2К	Миронівська 808	Миронівська 808 \times <i>Elytricium fertile</i>	(Миронівська 808 \times <i>Elytricium fertile</i>) \times Степняк 2К	Середня	HCP _{0,05}
Пік 7								
<i>Aegilops cylindrica</i>	13,3	38,8	25,9	15,2	26,8	23,0	23,8	
<i>Aegilops variabilis</i>	21,2	38,7	25,9	22,2	28,6	23,2	26,6	
<i>Aegilops ventricosa</i>	30,2	28,0	29,5	29,9	19,8	25,9	27,2	
<i>Triticum dicoccoides</i>	24,6	29,2	19,3	25,7	23,9	34,3	26,2	
<i>Triticum aestivum</i>	12,8	26,8	22,9	19,5	33,6	15,5	21,9	
Середня	20,4	32,3	24,7	22,5	26,5	24,4	—	7,8
Пік 8								
<i>Aegilops cylindrica</i>	24,9	37,8	44,7	18,1	41,4	40,0	35,2	
<i>Aegilops variabilis</i>	25,4	36,7	42,4	29,8	49,7	45,8	38,3	
<i>Aegilops ventricosa</i>	37,9	38,3	37,6	24,6	28,7	37,8	34,2	
<i>Triticum dicoccoides</i>	45,1	40,1	48,8	31,1	37,1	29,4	38,6	
<i>Triticum aestivum</i>	30,6	30,5	46,3	19,8	34,4	15,7	29,6	
Середня	33,7	36,7	44,0	24,7	38,3	33,7	—	9,0
					HCP _{0,05}	8,3	—	

та *T. aestivum*. Аналіз фракції з урахуванням експресивності ферменту (табл. 2) також підтверджив позитивний ефект аlopазми від *Ae. ventricosa*. Ефекти ядерних геномів щодо експресивності зазначеної фракції пероксидази у цьому випадку співпадали з іх ефектами на долю фракції в спектрах пероксидази. За дослідження ліній пшеници Донська напівінтенсивна та іх гібридів з *Elytricum fertile* істотних відмінностей в експресії даної фракції пероксидази (в пікселях) не виявлялося, бо зменшення площі смуг на електрофорограмах супроводжувалося збільшенням інтенсивності їх забарвлення.

Четверта фракція (пік 4, табл. 1) утворена смугами з Rf 0,18. Її частка в спектрах пероксидази складає 4,8–11,6%, і цей показник (доля в спектрі) мало змінюється за зміни геномів ядра чи цитоплазми. Аналіз фракції з урахуванням експресивності ферменту (в пікселях) (табл. 2) виявив позитивний ефект аlopазми від *Ae. ventricosa* ($P < 0,05$) у порівнянні з еуплазмою (*T. aestivum*) та аlopазмами від *Ae. cylindrica* та *T. dicoccoides*. Виявлено також вірогідні ($P < 0,05$) відмінності між гібридами (Донська напівінтенсивна \times *Elytricum fertile*) \times Степняк 2К та (Миронівська 808 \times *Elytricum fertile*) \times Степняк 2К. Останній варіант схрещувань виявився більш прийнятним для збільшення експресивності досліджуваної фракції пероксидази.

П'ята фракція (пік 5, табл. 1) утворена смугами з Rf 0,14; її частка в спектрах пероксидази складає 3,8–13,5%. Ефекти аlopазми у відношенні частки цієї фракції в загальному спектрі не виявлено. Щодо впливу ядерного геному, то аlopазматичні лінії на основі пшеници Донська напівінтенсивна мали вірогідно ($P < 0,05$) більшу частку цієї фракції, ніж лінії на основі пшеници Миронівська 808. Наступна гібридизація нівелювала ці відмінності. Аналіз експресивності фракції (табл. 2) не виявив жодних відмінностей в залежності від цитоплазми або ядерного геному. Однак можна припустити, що активність даної фракції у аlopазматичних ліній на основі Миронівської 808 вища, ніж у ліній на основі Донської напівінтенсивної. Про це свідчить той факт, що у лінії Миронівської 808 зазначена фракція ферменту на електрофорограмах займала меншу площину (табл. 1), а оптична щільність відповідних фракцій у зазначеніх ліній була приблизно однаковою.

Фракція, яка утворила 6-й пік (табл. 1) мала Rf 0,10 і частку в загальному спектрі форм від 4,6 до 11,5%. В цій фракції виявлено варіацію розмірів смуг в залежності як від ядерного геному, так і від аlopазми. Форми на основі аlopазм від *Ae. cylindrica* і *Ae. variabilis* мали вірогідно ($P < 0,05$) більшу частку цієї фракції в загальному спектрі пероксидази, ніж форми, створені на основі еуплазматичних ліній. Виявлено більша ($P < 0,05$) частка цієї фракції у аlopазматичних ліній з ядерним геномом пшеници Миронівська 808 у порівнянні з гібридами (Миронівська 808 \times *Elytricum fertile*) \times Степняк 2К. Аналіз експресивності фракції

Зміни спектра пероксидази аlopлазматичних ліній м'якої пшениці за гібридизації

(табл. 2) не виявив жодних відмінностей в залежності від ядерного геному. Враховуючи зменшення частки фракції у спектрі пероксидази у гібридів (Миронівська 808 × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К у порівнянні з лініями Миронівської 808, можна припустити, що у гібридів зросла активність ферментів даної фракції. Експресивність зазначених ізозимів у форм на основі еуплазми (*T. aestivum*) була нижчою ($P < 0,05$), ніж у форм на основі аlopлазм від *Ae. variabilis*, *Ae. ventricosa* та *T. dicoccoides*. Враховуючи дані щодо варіації розміру фракції, можна припустити, що аlopлазма від *Ae. cylindrica* негативно впливає на активність ферментів даної фракції, а аlopлазми від *Ae. ventricosa* та *T. dicoccoides* — позитивно.

Наступна фракція (пік 7, табл. 1) утворена смугами з R_f 0,07. Її частка в спектрі пероксидази у різних форм становила 6,1–15,5%. Для цієї фракції вдалося виявити вірогідне ($P < 0,05$) збільшення її частки лише у випадку гібридизації аlopлазматичних ліній м'якої пшениці Донська напівінтенсивна з *Elytricum fertile*. Аналіз експресивності фракції (табл. 2) виявив таку ж закономірність. Тому більш ймовірно, що гібридизація аlopлазматичних ліній Донської напівінтенсивної з амфіплоїдом *Elytricum fertile* призводить до збільшення кількості молекул ферменту, а не до підвищення їх активності.

Найменш рухливу фракцію складали білки з R_f 0,03. Частка цієї фракції від загальної кількості виявленої пероксидази коливалася, в залежності від генотипу, у межах 7,5–23,8% (табл. 1). Основні відмінності залежали від ядерного геному. Так, у випадку комбінації ядерних геномів (Донська напівінтенсивна × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К спостерігали вірогідно ($P < 0,05$) більшу частку цієї фракції у спектрі пероксидази, ніж в усіх інших. Залежність від аlopлазм була виражена набагато менше. Виключення складають лише лінії на основі аlopазми від *Ae. ventricosa*, у яких частка зазначеної фракції пероксидази була достовірно меншою, ніж у ліній з цитоплазмою від *Ae. cylindrica* та *T. dicoccoides*. Аналіз експресивності фракції (табл. 2) показав, що гібриди (Донська напівінтенсивна × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К виявляли вірогідно ($P < 0,05$) більшу оптичну щільність цієї фракції, ніж аlopазматичні лінії Донської напівінтенсивної та гібриди (Миронівська 808 × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К, а гібриди Миронівська 808 × *Elytricum fertile* — більшу, ніж лінії Миронівської 808 ($P < 0,05$). Враховуючи результати аналізу площ цієї фракції у різних форм, можна припустити, що більша сумарна активність фракції у гібриді (Донська напівінтенсивна × *Elytricum fertile*) × Степняк 2К обумовлена її кількісною перевагою, а у гібридів Донська напівінтенсивна × *Elytricum fertile* та Миронівська 808 × *Elytricum fertile* можна припустити більшу активність ферментів цієї фракції. Крім того, виявлені позитивні ефекти ($P < 0,05$) цитоплазм *Ae. variabilis* та *T. dicoccoides* на активність ферментів фракції у порівнянні з еуплазмою (*T. aestivum*).

Таким чином, найбільш варіабельними як за розмірами фракцій, так і за їх експресивністю виявилися фракції 3 (Rf 0,22) та 6 (Rf 0,10). У найбільш рухливих (1, 3) та середньорухливій (4) фракціях виявився позитивний вплив алоплазми *Ae. ventricosa* на експресивність ферментів, що інколи (3 фракція) супроводжувалося збільшенням частки фракції в загальному спектрі пероксидази. Малорухливі фракції (6 та 8) у випадку еуплазми (*T. aestivum*) виявляють менш численні або менш активні ізоформи. Цікаво відмітити, що при вивчені лише алоплазматичних ліній середньорухливі фракції були найменш виражені у лінії з алоплазмами *Ae. cylindrica* та *Ae. ventricosa* [3]. Ці алоплазми відносяться до плазматипу D, цитоплазми видів *Ae. variabilis*, *T. dicoccoides* та *T. aestivum* відносяться до плазматипу S [6]. Алоплазми типу D за даними літератури поєднувалися і з іншими ядерними геномами, і в цих випадках спостерігали позитивну для клітин взаємодію. Так, лінії пшениці Selkirk з алоплазмами від *Ae. cylindrica* та *Ae. ventricosa* значно збільшували врожай зерна у порівнянні з іншими алоплазматичними лініями сорту Selkirk на низькому агрофоні [7].

Враховуючи наявність видової [8] та внутрішньоклітинної специфічності розподілу ізопероксидаз [9], зокрема локалізацію їх у хлоропластах та мітохондріях, а також роль комплексу Гольджі у глікозуванні ферменту [10], можна вважати, що у форм з чужорідними цитоплазмами порушуються сталі ядерно-плазматичні зв'язки. Це вимагає певних компенсаторних ефектів, що відображується у збільшенні синтезу певних ізоферментів. Не виключено, що у цитоплазмі *Ae. ventricosa* детерміновані генами пшениці ізоформи піддаються модифікаціям, які збільшують їх активність. Мабуть, не випадково один з найбільш відомих сортів м'якої пшениці, створених внаслідок віддаленої гібридизації, — Roazon, який характеризується стійкістю до несприятливих чинників середовища, має цитоплазму від *Ae. ventricosa* [11–13].

Алоплазматичні лінії пшениці Донська напівінтенсивна у переважній більшості випадків реагували на гібридизацію зменшеннем частки та/або експресивності окремих фракцій пероксидази, в той час як у гібридів алоплазматичних ліній пшениці Миронівська 808 ці показники у порівнянні з материнськими формами зростали. Можливо, ядерні геноми Миронівської 808 та Донської напівінтенсивної забезпечують різну ефективність функціонування ген-ензимної системи пероксидази в хлоропластах та мітохондріях, внаслідок чого лініям на основі Миронівської 808 властиві більш інтенсивні окислювально-відновні процеси, що певним чином впливає на їх адаптивний потенціал.

Висновки

1. Електрофоретичні фракції пероксидази з Rf 0,22 та Rf 0,10 у досліджуваних форм виявилися найбільш варіабельними.

Зміни спектра пероксидази алоплазматичних ліній м'якої пшениці за гібридизації

2. Встановлено позитивний вплив цитоплазми *Ae. ventricosa* на експресію ізоформ з Rf 0,65, 0,22 та 0,18.
3. Алоплазматичні лінії Донської напівінтенсивної реагують на гібридизацію переважно зменшенням частки та/або експресивності окремих фракцій пероксидази. В протилежність цьому у гібридів алоплазматичних ліній Миронівської 808 ці показники у порівнянні з материнськими формами зростають.

Література

1. Симоненко В. К., Хангильдин В. В., Власенко В. А. Влияние генома сорта на адаптивные особенности алоплазматических линий озимой пшеницы // Цитология и генетика. — 2000. — Т. 34, № 3. — С. 21–27.
2. Андреева В. А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. — М.: Наука, 1988. — 128 с.
3. Мандриченко Т. А., Сечняк А. Л., Дьяченко Л. Ф. Спектр пероксидазы у алоплазматических линий мягкой пшеницы с различной адаптивностью // Адаптивная селекция растений. Теория и практика / Сб. тез. междунар. конф. — Харьков: УААН, Ин-т растениевод. им. В. Я. Юрьева, 2002. — С. 108–109.
4. Davis B. I. Disk-electrophoresis. 2. Method and application to human serum protein// Ann. N.- J. Acad. Sci. — 1964. — 121. — Р. 404–427.
5. Седловский А. И., Мартынов С. П., Мамонов Л. К. Генетико-статистические подходы к теории селекции самоопыляющихся культур. — Алма-Ата: Наука, 1982. — 200 с.
6. Tsunewaki K. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. — Tokyo: Jap. Soc. Prom. Sci., 1980. — 290 р.
7. Jones P., Keane E. M., Osborne B. A. Effects of alien cytoplasmic variation on carbon assimilation and productivity in wheat // J. Exp. Bot. 1998. — Vol. 49, N 326. — Р. 1519–1528.
8. Папковская А. А., Латыпов А. З., Богданов А. В. Результаты электрофоретического изучения пероксидазы у видов и индуцированных мутантов пшениц // Весн. АН БССР. Сер. біял. н. — 1974. — Т. 1. — С. 33–34.
9. Рубин Б. А., Ладыгина М. Е. Физиология и биохимия дыхания растений. — М.: Изд-во МГУ, 1974. — 512 с.
10. Griphover B., Morre D. J. Boss W. F. Fractionation of suspension cultures of wild carrot and kinetics of membrane labeling // Protoplasma. — 1984. — Vol. 123, N 1. — P. 213–217.
11. <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/>
12. Breeding wheat for yield and resistance to Fusarium Head Blight / S. Tomasovic, B. Palaversic, R. Mlinar, I. Ikic // Abstr. 9th European Fusarium Seminar. — Wageningen (Netherlands), 2006. — Р. 117.
13. Strausbaugh, C. A., Murray, T. D. Use of epidermal cell responses to evaluate resistance of winter wheat cultivars to *Pseudocercosporella herpotrichoides* // Phytopathology. — 1989. — Vol. 79, N 10. — Р. 1043–1047.

А. Л. Сечняк, Т. А. Мандриченко, В. Н. Тоцкий

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
каф. генетики и молекулярной биологии,
Шампанский переул. 2, Одесса, 65058, Украина, e-mail: caphgen@ukr.net

**ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРА ПЕРОКСИДАЗЫ
АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ
ПРИ ГИБРИДИЗАЦИИ**

Резюме

Исследовали изоизимные спектры пероксидазы у аллоплазматических линий мягкой пшеницы и их гибридов с *Elytricum fertile* и пшеницей Степняк 2К. Наиболее вариабельными оказались электрофоретические фракции фермента с Rf 0,22 и Rf 0,10. Установлено положительное влияние цитоплазмы *Ae. ventricosa* на экспрессию изоформ с Rf 0,65, 0,22 и 0,18, что иногда сопровождалось увеличением доли соответствующей фракции в спектре. Аллоплазматические линии Донской полуйнтенсивной реагировали на гибридизацию преимущественно уменьшением доли и/или экспрессивности отдельных фракций пероксидазы. В противоположность этому у гибридов аллоплазматических линий Мироновской 808 эти показатели по сравнению с материнскими формами возрастали.

Ключевые слова: пероксидаза, изоизимы, аллоплазмы, мягкая пшеница, отдаленная гибридизация.

A. L. Sechnyak, T. A. Mandrichenko, V. N. Totsky

Odessa National University, Department of Genetics and Molecular Biology,
Dvoryanskaya St. 2, Odessa, 65026, Ukraine, e-mail: caphgen@ukr.net

**THE PEROXIDASE SPECTRA VARIATION IN ALLOPLASATIC
LINES OF COMMON WHEAT AT HYBRIDIZATION**

Summary

The isozyme spectra of peroxidase at alloplasmatic lines of common wheat and their hybrids with *Elytricum fertile* and wheat Stepnyak 2K were investigated. The electrophoretic fractions of enzyme with Rf 0,22 and Rf 0,10 appeared most variability. The positive influence of *Ae. ventricosa* cytoplasm on expression of isoforms with Rf 0,65, 0,22 and 0,18 is established, that was sometimes accompanied by increasing in a share of corresponding fraction in a spectrum. Alloplasmatic lines of Donskaya poluiintensivnaya reacted to hybridization mainly reduction of a share and / or expressivity separate fractions of peroxidase. As opposed to this at hybrids alloplasmatic lines of Mironovskaya 808 these parameters in comparison with parent forms grew.

Keywords: peroxidase, isozymes, alloplasms, common wheat, wide crosses.