

УДК 574.24:57.041/.042+574.123

В. А. Топтиков, канд. биол. наук, с. н. с.,
Л. Ф. Дьяченко, канд. биол. наук, в. н. с.,
В. Н. Тоцкий, д-р биол. наук, профессор, зав. каф.
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
кафедра генетики и молекулярной биологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: wat.22@mail.ru

НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ОЗИМЫХ И ЯРОВЫХ ГЕНОТИПОВ ЗЛАКОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЙ

Определяли сухую массу побегов, содержание ДНК, РНК и их соотношение в тканях растений, выращенных в нормальных условиях и при стрессовом воздействии. Экстремальные температурные условия проращивания приводили к снижению массы проростков на фоне значительного увеличения количества РНК в тканях. Уменьшалось также содержание ДНК в единице массы ткани. Под действием стресса возрастало отношение РНК:ДНК, что свидетельствовало об усилении транскрипции. Отмеченные изменения проявлялись как у озимых, так и у яровых генотипов. Яровые формы отличались более сильной ответной реакцией на экстремальные условия по таким показателям, как содержание РНК и отношение РНК:ДНК.

Ключевые слова: стресс, пшеница, ячмень, озимые и яровые генотипы, ответная реакция, содержание РНК, ДНК.

Система генов *Vrn*, наряду с генами *Ppd* и *Vrd*, относится к генетическим факторам, играющим важную роль в определении особенностей индивидуального развития злаковых культур [1—5]. В настоящее время вышеуказанные генетические системы рассматриваются как пример регуляторных. Гены индивидуального развития взаимодействуют как между собой, так и с множеством других генов, и исполняют роль триггеров, запускающих цепь последующих событий в жизни растения [6—11]. Указанные генетические системы обладают широким плеiotропным действием, влияя на разнообразные признаки организма, в том числе и на хозяйственно-ценные. Функционирование генов индивидуального развития имеет как прямое, так и опосредованное отношение к формированию адаптивных возможностей растительных организмов [12—24]. Несмотря на большое количество исследований в данной области, многие физиолого-биохимические аспекты влияния генов *Vrn* на развитие адаптивных процессов остаются малоизученными.

Целью работы было сравнение ответных реакций на воздействие стрессовых условий у форм злаковых, различающихся по системе генов *Vrn1*.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили на этиолированных проростках в трех независимых повторностях. Из озимых форм пшеницы были взяты сорта Одесская полумкарликовая, Дальницкая, Донская полунинтенсивная, а также линия 628/10, лю-

безно предоставленная сотрудником СГИ (г. Одесса) А. И. Рыбалко. В качестве озимого ячменя использовали сорт Тамань. Яровые формы представлены следующими сортами пшеницы: Журавка, Пранка, *Gamut*, *Norin 29*, а также сортом ярового ячменя Жозефин. Как отмечалось выше, тип развития растения определяется взаимодействием сложной системы генов. Озимость (потребность в яровизации) формируется, если все аллели *Vrn1* являются рецессивными; неозимый тип развития возникает при наличии хотя бы одного доминантного аллеля генов *Vrn1* [25]. В связи с тем, что аллельный состав системы *Vrn* установлен не для всех исследуемых растений, для обозначения их генотипов были использованы краткие формулы: озимые — *vrn*, яровые — *Vrn*.

Проростки выращивали при температуре 26—27 °С в темноте в течение 5 суток в пластмассовых кюветах в многослойной фильтровальной бумаге. Затем одну половину растений продолжали выращивать в тех же условиях. Данный вариант условий обозначили как «норма». Другая половина растений была подвергнута жесткому стрессу, заключавшемуся в резких колебаниях температуры по нижеследующей схеме. Шестые сутки: 3 часа при температуре +40 °С, 18 часов — при +4 °С. Седьмые сутки: 3 часа при нормальной температуре (26—27 °С), 2 часа при +40 °С, 2 часа при +4 °С, 2 часа при +40 °С, 15 часов при +4 °С. Восьмые сутки: 3 часа при нормальной температуре, 2 часа при +4 °С, 4 часа при 40 °С, 15 часов при +4 °С. Девятые сутки: 3,5 часа при нормальной температуре, 1,5 часа при +4 °С, 2 часа при 40 °С. После этого побеги срезали и использовали для анализа. В каждой исследуемой группе для измерений брали не менее 5 растений.

Определяли массу побегов после трехкратной обработки ацетоном при +4 °С. Полученные значения условно обозначили как «сухая масса». После взвешивания в этих же образцах определяли содержание РНК и ДНК. Для очистки и разделения нуклеиновых кислот применяли метод Шмидта и Тангаузера в модификации [26]. Содержание РНК и ДНК в растворах определяли спектрофотометрически [27]. Полученные данные рассчитывали в мкг нуклеиновой кислоты на мг сухой массы побега. Кроме абсолютных значений, анализировали степень изменения показателей в относительных величинах, которые рассчитывали по формуле

$$(X_{\text{стресс}} - X_0)/X_0 \cdot 100 (\%),$$

где $X_{\text{стресс}}$ — значения показателей при стрессовых условиях, X_0 — значения показателей в норме.

Математическую обработку результатов (расчет среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического, двухфакторный дисперсионный анализ, расчет коэффициента Стьюдента для сопряженных и несопряженных совокупностей, корреляционный анализ) осуществляли с помощью пакета программ *Microsoft Excel*.

Результаты исследований и их анализ

Выращивание растений в стрессовых условиях приводило к достоверному снижению сухой массы побегов как у яровых, так и у озимых генотипов (табл. 1). Выявленное ингибирование роста не коррелировало с аллельным состоянием системы генов *Vrn1*, т. е. озимым или яровым типом развития растений.

Содержание ДНК в ткани является важным интегративным показателем состояния организма. Количество ДНК положительно коррелирует с количеством митозов, что свидетельствует об интенсивности ростовых процессов в организ-

Таблица 1

Влияние стрессовых температур на сухую массу побегов

Исследуемые генотипы		Масса одного побега, мг		Ингибирование роста, %
		Норма	Стресс	
Озимые, <i>vtn</i>	Одесская полукарликовая	8,34±0,43	6,56±0,67	21,34
	Дальницкая	3,96±0,23	3,93±0,36	0,76
	Донская полунтенсивная	6,26±0,49	4,11±1,00	34,34
	Линия 628/10	13,58±1,35	10,60±0,70	21,94
	Тамань	7,70±1,30	6,99±1,03	9,22
Среднее по озимым генотипам		7,97±0,92	6,44±0,71**	19,20
Яровые, <i>Vtn</i>	Журавка	8,35±1,32	7,26±1,69	13,03
	<i>Gamit</i>	8,81±0,50	6,90±1,61	21,68
	<i>Norin 29</i>	8,38±1,24	7,07±1,64	15,63
	Пранка	13,53±1,26	10,83±0,43	19,96
	Жозефин	5,86±0,94	5,77±0,90	1,54
Среднее по яровым генотипам		8,99±0,79	7,57±0,69**	15,80
Среднее по всем генотипам		8,48±0,60	7,00±0,50**	17,45
Различие между озимыми и яровыми генотипами		Нет	Нет	Нет

Примечание: приведены средние арифметические и их стандартные ошибки; *, ** — достоверность различий между показателями в норме и при стрессовых условиях при уровне значимости $P < 0,05$ и $< 0,01$, соответственно, рассчитанном при сравнении сопряженных совокупностей; ■, ■■ — достоверность различий между показателями в норме и при стрессовых условиях при уровне значимости $P < 0,05$ и $< 0,01$, соответственно, рассчитанном с помощью двухфакторного дисперсионного анализа; различия между яровыми и озимыми генотипами рассчитывали при сравнении несопряженных совокупностей.

ме [28]. С другой стороны, эта величина обратно пропорциональна экстенсивности роста клеток, степени их растяжения и т. п. Как видно из представленных результатов (табл. 2), воздействие экстремальных температурных условий приводило, вероятно, к торможению процессов деления клеток в растениях. Колебания содержания нуклеиновых кислот в растениях при стрессе были обнаружены и на других объектах [29, 30]. По содержанию ДНК в побегах и его изменению после действия экстремальных температур достоверных различий между яровыми и озимыми генотипами обнаружено не было.

Под влиянием стрессовых условий в исследуемых растениях повышалось относительное содержание РНК (табл. 3). Соответственно увеличивалось и отношение РНК:ДНК (табл. 4).

Отмеченные изменения свидетельствуют о повышении функциональной активности генетического аппарата в тканях при экстремальных температурных условиях, что указывает в первую очередь на усиление процессов транскрипции и, возможно, биосинтеза белка. Сопоставляя эти данные с характером изменений массы побегов, можно заключить, что усиление белок-синтетических процессов не связано с интенсификацией пластического обмена, а с синтезом специфических стрессовых белков [31]. По уровню усиления функциональной активности генетического аппарата были выявлены различия между яровыми и озимыми формами: у яровых генотипов процент повышения содержания РНК и соотношения РНК:ДНК был в два раза выше по сравнению с озимыми генотипами.

Влияние стрессовых температур на содержание ДНК в побегах

Исследуемые генотипы		Количество ДНК, мкг/мг сухой массы побега		Степень изменений, %
		Норма	Стресс	
Озимые, <i>vrn</i>	Одесская полукарликовая	4,54±0,11	4,35±0,08	-4,18
	Дальницкая	4,40±0,17	4,28±0,31	-2,73
	Донская полунтенсивная	5,19±0,33	4,69±0,15	-9,63
	Линия 628/10	4,54±0,39	4,60±0,47	1,32
	Тамань	3,73±0,04	3,49±0,20	-6,43
Среднее по озимым генотипам		4,48±0,23	4,28±0,21	-4,46
Яровые, <i>Vrn</i>	Журавка	4,35±0,18	4,15±0,16	-4,60
	<i>Gamut</i>	5,24±0,34	5,07±0,30	-3,24
	<i>Norin 29</i>	4,64±0,04	4,51±0,07	-2,80
	Пранка	4,29±0,26	4,24±0,24	-1,17
	Жозефин	3,17±0,05	3,17±0,10	0,00
Среднее по яровым генотипам		4,34±0,34	4,23±0,31*	-2,53
Среднее по всем генотипам		4,41±0,12	4,26±0,12**	-3,40
Различие между озимыми и яровыми генотипами		Нет	Нет	Нет

Примечание: см. табл. 1.

Влияние стрессовых температур на содержание РНК в побегах

Исследуемые генотипы		Количество ДНК, мкг/мг сухой массы побега		Степень изменений, %
		Норма	Стресс	
Озимые, <i>vrn</i>	Одесская полукарликовая	13,30±0,26	13,23±0,42	-0,53
	Дальницкая	15,00±0,71	17,95±3,09	19,67
	Донская полунтенсивная	16,91±2,05	21,15±4,99	25,07
	Линия 628/10	9,94±1,92	12,81±1,00	28,87
	Тамань	11,61±0,14	11,94±0,81	2,84
Среднее по озимым генотипам		13,35±1,23	15,41±1,77*	15,43
Яровые, <i>Vrn</i>	Журавка	15,68±2,32	20,33±5,74	29,66
	<i>Gamut</i>	13,02±0,72	20,87±5,53	60,29
	<i>Norin 29</i>	13,06±1,40	23,29±5,11	78,33
	Пранка	8,41±0,63	9,09±0,48	8,09
	Жозефин	9,45±0,82	12,08±0,91	27,83
Среднее по яровым генотипам		11,93±1,32	17,13±2,76**	43,59
Среднее по всем генотипам		12,64±0,60	16,27±1,28**	28,72
Различие между озимыми и яровыми генотипами		Нет	Нет	Есть при P < 0,05

Примечание: см. табл. 1.

Таблица 4

Влияние стрессовых температур на отношение РНК:ДНК в побегах

Исследуемые генотипы		Количество ДНК, мкг/мг сухой массы побега		Степень изменений, %
		Норма	Стресс	
Озимые, <i>vrn</i>	Одесская полукарликовая	2,93±0,12	3,04±0,07	3,75
	Дальницкая	3,41±0,32	4,34±1,08	27,27
	Донская полунинтенсивная	3,33±0,59	4,47±1,01	34,23
	Линия 628/10	2,15±0,23	2,80±0,07	30,23
	Тамань	3,11±0,04	3,43±0,20	10,29
Среднее по озимым генотипам		2,99±0,23	3,61±0,34**	20,74
Яровые, <i>Vrn</i>	Журавка	3,66±0,71	5,00±1,61	36,61
	Garnut	2,49±0,03	4,01±0,84	61,04
	Norin 29	2,81±0,30	5,19±1,19	84,70
	Пранка	1,96±0,04	2,14±0,04	9,18
	Жозефин	2,99±0,29	3,84±0,39	28,43
Среднее по яровым генотипам		2,78±0,28	4,04±0,54**	50,81
Среднее по всем генотипам		2,88±0,13	3,83±0,28**	32,99
Различие между озимыми и яровыми генотипами		Нет	Нет	Есть при P < 0,05

Примечание: см. табл. 1.

Таким образом, аллельное состояние системы генов *Vrn1* оказывает специфическое регуляторное влияние на синтез РНК, приводящее к отмеченным различиям.

Выводы

1. Воздействие экстремальных температурных условий на растения как озимого, так и ярового типа развития приводит к снижению сухой массы побегов и содержания в них ДНК.
2. Экстремальные температурные условия проращивания вызывают усиление синтеза РНК в тканях и повышение соотношения РНК:ДНК. Количественные параметры данных изменений определяются аллельным состоянием системы генов *Vrn1*.

Литература

1. Ригин Б. Ф., Гончаров Н. П. Генетика онтогенеза пшеницы (Итоги науки и техники. Сер. Генетика и селекция возделываемых растений; т. 1). — М.: ВИНТИ, 1989. — 148 с.
2. Гончаров Н. П. Генетический контроль фотопериодической реакции у мягкой пшеницы (обзор) // С.-х. Биология. — 1986. — № 11. — С. 84—90.
3. Stelmakh A. F. Growth habit in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Euphytica. — 1987. — Vol. 36. — P. 513—519.
4. Snape J. W., Laurie D. A., Worland A. J. Understanding the genetics of abiotic stress response in cereals and possible strategies for their amelioration // Asp. Appl. Biol. — 1998. — №. 50. — P. 9—14.
5. Файт В. И. Генетическая система контроля различий по продолжительности яро-

- визации у озимой пшеницы // Цитология и генетика. — 2003. — Т. 37. — № 5. — С. 69—76.
6. *Tranquilli G. E., Dubcovsky J.* Epistatic interactions between vernalization genes *Vrn-A^{m1}* and *Vrn-A^{m2}* in diploid wheat // *J. Hered.* — 2000. — Vol. 91. — P. 304—306.
7. *Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanchez A., Dubcovsky J.* Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploidy wheat // *Plant Physiol.* — 2005. — Vol. 138. — P. 2364—2373.
8. *Sung S., Amasino R. M.* Molecular genetic studies of the memory of winter // *J. Exp. Bot.* — 2006. — Vol. 57. — N 13. — P. 3369—3377.
9. *Chinnusami V., Zhu J., Zhu J.-K.* Gene regulation during cold acclimation in plants // *Physiol. Plantarum.* — 2006. — Vol. 126. — P. 52—61.
10. *Fowler S., Thomashow M. F.* Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are indicated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway // *Plant Cell.* — 2002. — Vol. 14. — P. 1675—1690.
11. *Подольный В. З., Агамалова С. Р., Кокишарова Т. А., Чайлахян М. Х.* Влияние яровизации и фотопериода на рост молодых листьев растений мягкой пшеницы, различающихся по одному гену системы *Vrn* и *Ppd* // *Физиология растений.* — 1990. — Т. 37. — № 2. — С. 213—219.
12. *Stelmakh A. F.* Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat // *Euphytica.* — 1993. — Vol. 65. — P. 53—60.
13. *Стельмах А. Ф., Мартынюк В. Р.* Эффекты доминантных генов *Ppd* по особенностям органогенеза у озимой мягкой пшеницы // *Цитология и генетика.* — 1998. — 32. — № 6. — С. 27—34.
14. *Фещенко В. В., Подольный В. З., Кокишарова Т. А., Агамалова С. Р.* Влияние системы генов *Ppd* на рост и развитие апикальной меристемы и молодых листьев у пшеницы разных биотипов // *Биол. науки.* — 1992. — 6. — № 342. — С. 44—51.
15. *Кошкин В. А., Мережко А. Ф., Матвиенко И. И.* Влияние фотопериодизма и генов *Ppd* на морфофизиологические признаки гомозиготных линий пшеницы с различной фотопериодической чувствительностью // *Докл. РАСХН.* — 1998. — № 4. — С. 8—10.
16. *Кокишарова Т. А., Феденко Е. П., Агамалова С. Р.* Зависимость ростовой активности акцепторной зоны от генов яровизации и фотопериодизма у озимой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 16: Биология.* — 2006. — № 2. — С. 11—16.
17. *Scarth R., Kirby E. J. M., Law C. N.* Effects of the photoperiod genes *Ppd1* and *Ppd2* on growth and development of the shoot apex in wheat // *Ann. Bot.* — 1985. — Vol. 55. — N 3. — P. 351—359.
18. *Мусіч В. М., Пильнєв В. В., Нефьодов О. В., Рабінович С. В.* Фотоперіодична чутливість та адаптивність різних сортів озимої пшениці на півдні України // *Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України.* — Одеса, 1996. — С. 76—83.
19. *Файт В. И., Сухоносенко Н. В.* Особенности органогенеза, морозостойкость и урожайность различных по генам *Vrd* линий озимой мягкой пшеницы // *Вісн. Укр. т-ва генетиків та селекціонерів.* — 2005. — 3. — № 1/2. — С. 3—14.
20. *Бабенко В. И.* Метаболические аспекты ранних фаз онтогенеза озимых злаковых растений // *Сб. науч. тр. ВСГИ.* — 1974. — Вып. 11. — С. 26—28.
21. *Sarhan F., Chevrier N.* Regulation of RNA synthesis by DNA-dependent RNA polymerases and RNases during cold acclimation in winter and spring wheat // *Plant Physiol.* — 1985. — Vol. 78. — P. 250—255.
22. *Valiellahi E., Niazi A., Farsi M.* Semiquantitative Rt-PCR analysis to assess the expression levels of *Wcor* 14 transcripts in winter-type wheat // *Biotechnology.* — 2009. — Vol. 8. — № 3. — P. 323—328.
23. *Белозерова А. А., Боме А. Я.* Особенности развития растений озимых и яровых форм пшеницы (*Triticum aestivum* L.) на ранних этапах онтогенеза [Электронный ресурс]. — Заочная электронная конференция «Природно-ресурсный потенциал Сибири», 15—20 марта 2006 г. — Режим доступа: http://www.raefru/snt/pdf/2007/01/2007_01_38.pdf.

24. *Ishikawa K., Tateyama M.* Changes in hybridizable RNA in winter wheat embryos during germination and vernalization // *Plant and Cell Physiology*. — 1977. — Vol. 18. — № 4. — P. 875—882.
25. *McIntosh R. A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al.* Catalogue of gene symbols for wheat. Morphological and physiological traits. [Электронный ресурс]. — 11th International wheat genetics symposium 24—29 August, 2008. Brisbane Qld Australia. — 2008. — P. 42—45. — Режим доступа: www.grs.nig.ac.jp/wheat/komagi/genes/2008.
26. *Георгиев Г. П.* Методы определения, выделения и фракционирования нуклеиновых кислот // *Химия и биохимия нуклеиновых кислот* / Под ред. И. Б. Збарского и С. С. Дебова. — Л.: Медицина, 1968. — С. 74—120.
27. *Спирин А. С.* Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // *Биохимия*. — 1958. — Т. 23. — № 5. — С. 656—662.
28. *Жук О. И.* Кінетика ростових процесів пшениці і кукурудзи в умовах водного та високотемпературного стресів: дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біолог. наук: спец. 03.00.12. — К., 2004.
29. *Шарифова С. С.* Изучение влияния абиотических стрессовых факторов на устойчивые и слабоустойчивые образцы баклажан // *Современные проблемы науки и образования*. — 2009. — № 6. — С. 29—32.
30. *Slatyer R. O.* Physiological significance of internal water relations to crop yield // *Physiological aspects of crop yield. Proceeding of a symposium. January 20—24.* [Ed. By J. D. Eastin, F. A. Haskins, C. Y. Sullivan, C. H. M. Van Bavel and R. C. Dinaues]. — University of Nebraska. — Lincoln, 1969. — P. 53—88.
31. *Косаковская И. В.* Стрессовые белки растений. — К.: Видавництво фітосоціологічного центру, 2008. — 154 с.

В. А. Топтіков, Л. Ф. Дьяченко, В. М. Тоцький

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра генетики та молекулярної біології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: wat.22@mail.ru

ДЕЯКІ ФІЗИОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ РОСЛИН ОЗИМИХ ТА ЯРИХ ГЕНОТИПІВ ЗЛАКІВ ЗА ВПЛИВУ ЕКСТРЕМАЛЬНИХ ТЕМПЕРАТУРНИХ УМОВ

Резюме

Визначали суху масу пагонів, вміст ДНК, РНК та їх співвідношення в тканинах рослин, які вирощували за нормальних та стресових умов. Екстремальні температурні умови пророщування призводили до зниження сухої маси паростків при значному підвищенні кількості РНК в тканинах. Зменшувалась також кількість ДНК на одиницю маси тканини. За впливу стресу підвищувалось відношення РНК:ДНК, що свідчило про посилення транскрипції. Зазначені зміни відбувались як в озимих, так і в ярих генотипів. Ярі форми відрізнялись більш сильною реакцією у відповідь на екстремальні умови за такими показниками, як вміст РНК та РНК:ДНК-відношення.

Ключові слова: стрес, пшениця, ячмінь, озимі та ярі генотипи, реакція у відповідь, вміст РНК, ДНК.

В. А. Топтиков, Л. Ф. Дьяченко, В. Н. Топский

V. A. Topnikov, L. F. Diachenko, V. N. Totsky

Odessa National Mechnikov University,

Department of Genetics and Molecular Biology, Dvoryanskaya Str., 2, Odessa, 65082,
Ukraine, e-mail: wat.22@mail.ru

**PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL DATA OF WINTER AND SPRING
CEREAL GENOTYPES UNDER EXTREMAL TEMPERATURE**

Summary

The dryshoot mass, DNA and RNA content, their ratio in plant tissues has been studied. The investigated plants have been grown under normal conditions and stress influence. The extremal temperature condition for germinating reduced to normal shoot mass against the background of considerable increasing RNA content in plant tissues. DNA content in mass unit also decreased. Under the stress influence RNA: DNA ratio increased, and this fact was the evidence of transcription intensification. Indicated changes were observed in winter and spring cereal genotypes. Spring genotypes were noted for more strong response reaction in such data as RNA content and RNA: DNA ratio.

Key words: stress, wheat, barley, winter and spring genotypes, response reaction, RNA, DNA.