

УДК 633:11.+577.151.64

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

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

<sup>2</sup> 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

Исучены 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],  $\alpha$ -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, контролируемых определенными адаптивными признаками, 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 листовую 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 Эритропермум 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

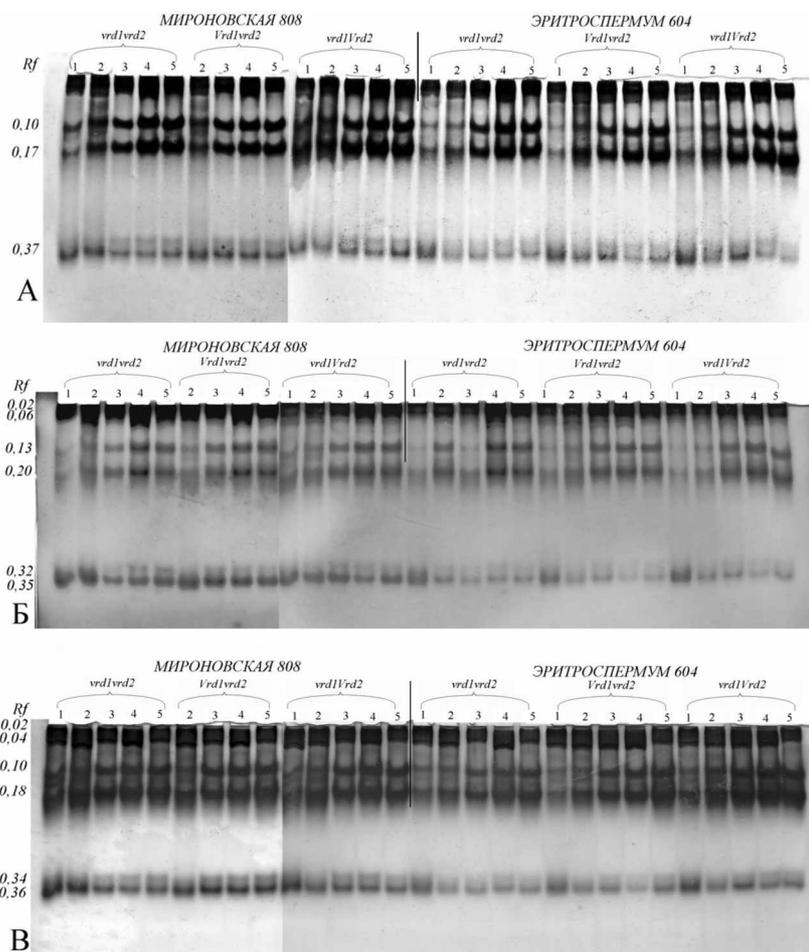


Рис. 1. Электрофореграммы пероксидазы (А), фенолоксидазы (Б) и цитохромоксидазы (В) в процессе закаливания растений. 1 — до закаливания (контроль), 2–7-е; 3–14-е; 4–21-е; 5–26-е сутки закаливания

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 закалки растений повышается.

Уровень корреляции экспрессивности отдельных изоформ исследованных ферментов с продолжительностью закалки 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. <i>Rf</i>	Мироновская 808 (рецессив)	Мироновская 808- <i>Ird1</i>	Мироновская 808- <i>Ird2</i>
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 закалки 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  $+2^{\circ}\text{C}$  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. Rf	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. Физиология растений : 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., Рябчин 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., Мирось 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. Piliipenko 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. Дьяченко<sup>1</sup>, В. М. Тоцький<sup>1</sup>, В. І. Файт<sup>2</sup>, В. А. Топтиков<sup>1</sup>

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

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

## ЕКСПРЕСИВНІСТЬ ДЕЯКИХ ГЕН-ЕНЗИМНИХ 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), птохромоксидази (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 загартування 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 геномі Еритроспермуму.

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**<sup>1</sup>, **V. N. Totsky**<sup>1</sup>, **V. I. Fait**<sup>2</sup>, **V.A. Toptikov**<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Plant Breeding and Genetics Institute,  
Ovidiopskaya 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.