

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.
Одеський 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 алоплазматичних ліній м'якої пшениці 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. Алоплазматичні лінії Донської напівінтенсивної реагували 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 зростали.

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

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

Наявність множинних 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 алоплазматичних ліній м'якої пшениці 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-плазмонних поєднань у гібридів алоплазматичних ліній пшениці 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 паростків буфером (0,05 М трис-НCl, рН = 6,8, 0,1% дитіотреїтол, 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 площу 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 алоплазматичних ліній пшениці та їх гібридів з *Elytricum fertile* та пшеницею Степняк 2К

	Донська напівінтен- сивна	Донська напівінтен- сивна × <i>Elytricum fertile</i>	(Донська напівінтен- сивна × <i>Elytricum fertile</i>) × Степняк 2К	Миронівська 808	Миронівська 808 × <i>Elytricum fertile</i>	(Миронівська 808 × <i>Elytricum fertile</i>) × Степняк 2К	Середня	НСР _{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)		
НСР _{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)	–	
НСР _{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)		
НСР _{0,05}							0.070	–

Зміни спектра пероксидази алоплазматичних ліній в'якої пшениці за гібридації

Продовження таблиці 1

	Донська напівінтен- сивна	Донська напівінтен- сивна × <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>	(Донська напівінтен- сивна × <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>) × Степняк 2К	Миронівська 808	Миронівська 808 / <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>	(Миронівська 808 · <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>) × Степняк 2К	Середня	НСР _{0,05}
Цик 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
НСР _{0,05}							0.075	–
Цик 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(0.545)	
<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
НСР _{0,05}							0.112	–
Цик 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
НСР _{0,05}							0.075	–

	Донська напівінтен- сивна	Донська напівінтен- сивна / <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>	(Донська напівінтен- сивна / <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>) \ Степняк 2К	Миронівська 808	Миронівська 808 × <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>	(Миронівська 808 × <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>) / Степняк 2К	Середня	НСР _{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
НСР _{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
НСР _{0,05}							0.103	—

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

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 площі 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 зазначеної 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 зазначеної 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 Rf 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 зазначеної фракції пероксидази. Інших відмінностей на електрофореграмах в залежності від ядерного геному або від джерела цитоплазми не виявлено.

Третя фракція (пік 3, табл. 1) утворена смугами з Rf 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 формі 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*

Таблиця 2

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

	Донська напівінтен- сивна	Донська напівінтен- сивна / <i>Elytricum fertile</i>	(Донська напівінтенсив- на × <i>Elytricum fertile</i>) × Степняк 2К	Миронів- ська 808	Миронів- ська 808 × <i>Elytricum fertile</i>	(Миронівська 808 × <i>Elytricum fertile</i>) × 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	
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	—
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	

Зміни спектра пероксидази алоплазматичних ліній в'якої пшениці за гібридизації

	Донська напівінтен- сивна	Донська напівінтен- сивна / <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>	(Донська напівінтенсив- на \ <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>) \ Степняк 2К	Миронів- ська 808	Миронів- ська 808 × <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>	(Миронівська 808 × <i>Elytricum fertile</i>) × Степняк 2К	Середня	НСР _{0,05}
Пік 4								
<i>Aegilops cylindrical</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		
НСР _{0,05}							6.4	–
Пік 5								
<i>Aegilops cylindrical</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	–	
НСР _{0,05}							9.0	–
Пік 6								
<i>Aegilops cylindrical</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	–	
НСР _{0,05}							6.4	–

	Донська напівінтен- сивна	Донська напівінтен- сивна \ <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>	(Донська напівінтенсив- на / <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>) / Степняк 2К	Миронів- ська 808	Миронів- ська 808 \ <i>Elytricum</i> <i>fertile</i>	(Миронівська 808 × <i>Elytricum fertile</i>) - Степняк 2К	Середня	НСР _{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
НСР _{0,05}							7.1	
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
НСР _{0,05}							8.3	–

та *T. aestivum*. Аналіз фракції з урахуванням експресивності ферменту (табл. 2) також підтвердив позитивний ефект алоплазми від *Ae. ventricosa*. Ефекти ядерних геномів щодо експресивності зазначеної фракції пероксидази у цьому випадку співпадали з їх ефектами на долю фракції в спектрах пероксидази. За дослідження ліній пшениці Донська напівінтенсивна та їх гібридів з *Elytricum fertile* істотних відмінностей в експресії даної фракції пероксидази (в пікселях) не виявлялося, бо зменшення площі смуг на електрофореграмах 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 алоплазми від *Ae. ventricosa* ($P < 0,05$) у порівнянні з еуплазмою (*T. aestivum*) та алоплазмами 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%. Ефектив алоплазми у відношенні частки цієї фракції в загальному спектрі не виявлено. Щодо впливу ядерного геному, то алоплазматичні лінії на основі пшениці Донська напівінтенсивна мали вірогідно ($P < 0,05$) більшу частку цієї фракції, ніж лінії на основі пшениці 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 алоплазматичних ліній на основі Миронівської 808 вища, ніж у ліній на основі Донської напівінтенсивної. Про це свідчить той факт, що у ліній Миронівської 808 зазначена фракція ферменту на електрофореграмах займала меншу площу (табл. 1), а оптична щільність відповідних фракцій у зазначених 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 алоплазми. Форми на основі алоплазм 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. Виявлена більша ($P < 0,05$) частка цієї фракції у алоплазматичних ліній з ядерним геномом пшениці Миронівська 808 у порівнянні з гібридами (Миронівська 808 \times *Elytricum fertile*) \times Степняк 2К. Аналіз експресивності фракції

(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 алоплазм від *Ae. variabilis*, *Ae. ventricosa* та *T. dicoccoides*. Враховуючи дані щодо варіації розміру фракції, можна припустити, що алоплазма від *Ae. cylindrica* негативно впливає на активність ферментів даної фракції, а алоплазми від *Ae. ventricosa* та *T. dicoccoides* — позитивно.

Наступна фракція (пік 7, табл. 1) утворена смугами з Rf 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 алоплазматичних ліній м'якої пшениці Донська напівінтенсивна з *Elytricum fertile*. Аналіз експресивності фракції (табл. 2) виявив таку ж закономірність. Тому більш ймовірно, що гібридизація алоплазматичних ліній Донської напівінтенсивної з амфіплоїдом *Elytricum fertile* призводить до збільшення кількості молекул ферменту, а не до підвищення їх активності.

Найменш рухливу фракцію складала білки з Rf 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 алоплазм була виражена набагато менше. Виключення складають лише лінії на основі алоплазми 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 алоплазматичні 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 гібриду (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 вивченні лише алоплазматичних ліній середньорухливі фракції були найменш виражені у ліній 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 зменшенням 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.

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.

Литература

1. Симоненко В. К., Хангильдин В. В., Власенко В. А. Влияние генома сорта на адаптивные особенности аллоплазматических 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 аллоплазматических 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. — P. 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 p.
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. — P. 1519–1528.
8. Папковская А. А., Латыпов А. З., Богданов А. В. Результаты электрофоретического изучения пероксидазы у видов и индуцированных мутантов пшениц // Вестн. АН БССР. Сер. биол. 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. Gripshover 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. Ikić // Abstr. 9th European Fusarium Seminar. — Wageningen (Netherlands), 2006. — P. 117.
13. Strausbaugh, C. A., Murray, T. D. Use of epidermal cell responses to evaluate resistance of winter wheat cultivars to *Pseudocercospora herpotrichoides* // Phytopathology. — 1989. — Vol. 79, N 10. — P. 1043–1047.

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

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

ИЗМЕНЕНИЯ СПЕКТРА ПЕРОКСИДАЗЫ АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ПРИ ГИБРИДИЗАЦИИ

Резюме

Исследовали изозимные спектры пероксидазы у аллоплазматических линий мягкой пшеницы и их гибридов с *Elytricum fertile* и пшеницей Степняк 2К. Наиболее переменными 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 полунтенсивной 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, изозимы, 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 poluintensivnaya 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, alloplasmas, common wheat, wide crosses.