

В.А. ТОПТИКОВ, Л.Ф. ДЬЯЧЕНКО, В.Н. ТОЦКИЙ

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова
E-mail: wat.22@mail.ru

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ И БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ ТКАНЕЙ ПРОРОСТКОВ ОЗИМЫХ И ЯРОВЫХ ФОРМ ЗЛАКОВ ПРИ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ КОЛЕБАНИЯХ ТЕМПЕРАТУРЫ



*Выращивание проростков мягкой пшеницы и ячменя при экстремальных колебаниях температуры приводило к уменьшению общего содержания кислых белков в тканях более чем на 25 % и снижению суммарной активности пероксидаз и супероксиддисмутаз. Суммарная фенолоксидазная активность при этом не изменялась. На фоне изменения общей экспрессивности ферментов происходило перераспределение активностей между их отдельными изоформами. Экстремальные температуры окружающей среды не приводили к достоверному изменению в клетках проростков отношения пероксидазной активности к супероксиддисмутазной, но вызывали изменение отношения пероксидазной активности к оксидазной в отдельных фракциях электрофоретического спектра. Зависимость экспрессивности структурных генов оксидоредуктаз от генетически детерминированного типа развития (озимости или яровости) определялась конкретной ситуацией во взаимоотношении «организм – среда». При выращивании злаков при постоянной оптимальной температуре количественные и качественные показатели спектров оксидоредуктаз не коррелировали с озимостью или яровостью исследуемых злаков. Однако при формировании ответной реакции на экстремальные колебания температуры степень изменений экспрессивности отдельных изоформ ферментов у озимых и яровых генотипов была различной, что свидетельствует о зависимости функционального состояния исследуемых ферментов от аллельного состава локуса *Vrn1*.*

© В.А. ТОПТИКОВ, Л.Ф. ДЬЯЧЕНКО, В.Н. ТОЦКИЙ,
2012

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2012. № 3

Введение. В последнее десятилетие резко возрос интерес генетиков к механизмам реализации функций генов-регуляторов и генов-интеграторов, имеющих отношение к становлению морфофункциональных и защитных реакций растительных организмов в процессе онтогенеза. К числу указанных генетических детерминант относится группа *Rr*- и *Prr*-генов, кодирующих белки ответа (*RR*-белки) – преимущественно факторы транскрипции для других структурных генов. Установлено, что к числу *Prr*-генов относятся гены, регулирующие циркадные ритмы растений [1–3], продолжительность фотопериода (локусы *Ppd1* или *pRR2*) [4–9], потребность в яровизации (локусы *Vrn*) [10, 11] и др.

К сожалению, круг ген-энзимных систем, контролируемых тем или иным гомеостатическим геном на разных стадиях развития растения, окончательно не установлен, и это в значительной степени ограничивает понимание генетических механизмов регуляции индивидуального развития. Сказанное в полной мере относится к механизмам регуляторной функции локуса *Vrn1*, аллельный состав которого отвечает за потребность злаков в яровизации и за их устойчивость к низкой температуре. По расчетам Стельмаха и соавт. [12, 13] упомянутая система генов определяет около 70 % генетического варьирования по степени отзывчивости на яровизацию и по фотопериодической реакции. Известно, что независимо от генетического фона озимость определяется рецессивным состоянием всех генов локуса *Vrn1*, а генотипы яровых форм содержат хотя бы один доминантный ген в этом локусе [12–15].

В настоящее время интенсивно исследуются молекулярно-генетические аспекты взаимодействия между системой генов *Vrn1* и другими генами, определяющими тип развития [10, 11, 15–25]. Однако многие вопросы генетико-биохимических механизмов интегральной роли генов развития и их влияния на экспрессивность структурных генов ферментов практически не изучены.

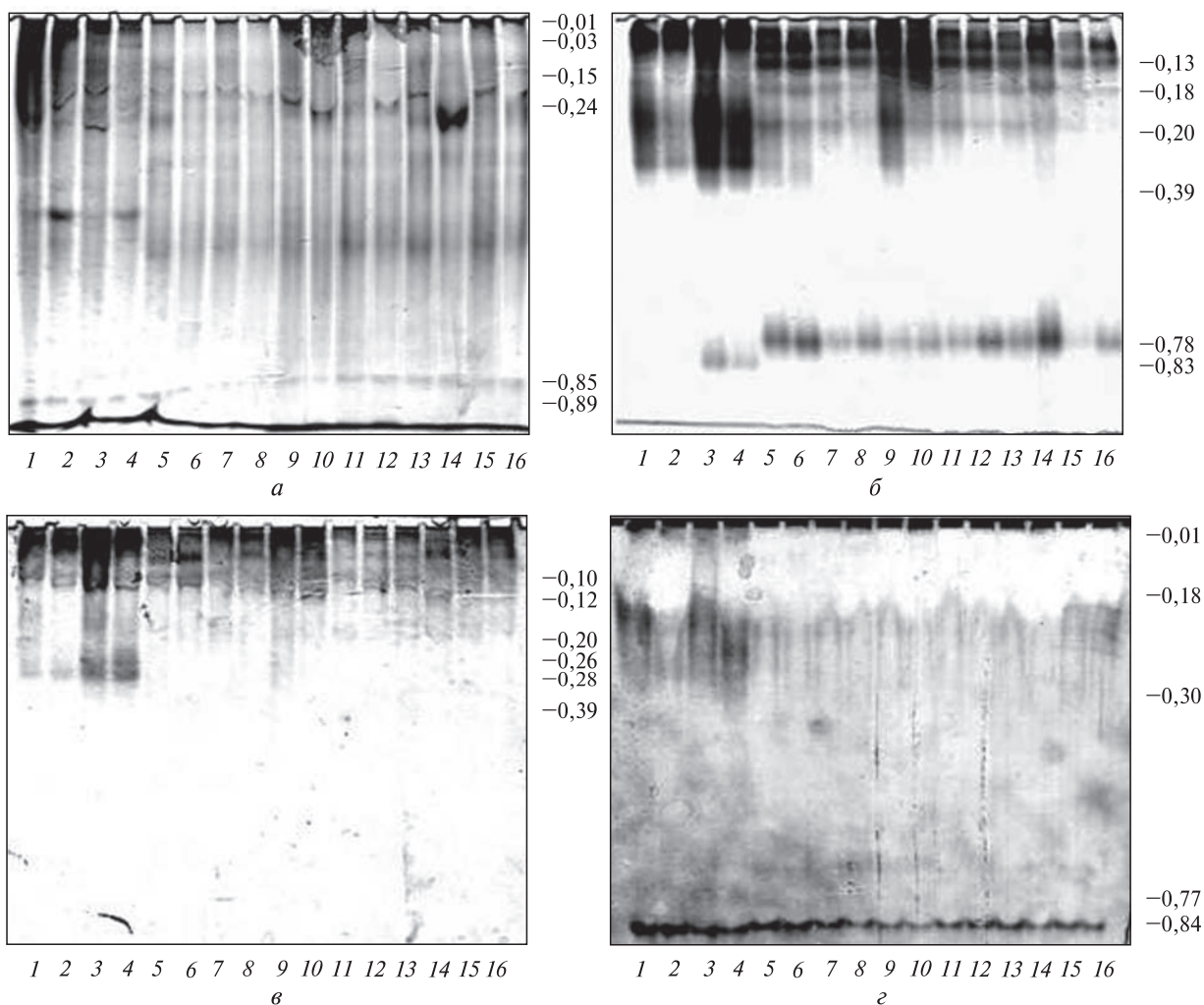
Исследования, проводимые нами ранее, показали, что одним из механизмов адаптации растений к неблагоприятным условиям является изменение экспрессивности ген-энзимных систем оксидоредуктаз, выражающееся в изменении активности и удельного веса от-

дельных изоформ ферментов [26–30]. Известно, что различные абиотические и биотические стрессовые воздействия приводят к увеличению содержания в клетках активных форм кислорода, а также к изменению активности оксидоредуктаз, имеющих отношение к их образованию и обезвреживанию [31]. Целью настоящей работы было изучение экспрессивности некоторых антиоксидантных оксидоредуктаз и общего содержания белков в тканях озимых и яровых форм злаков, альтернативных по содержанию доминантных и рецессивных аллелей в локусе *Vrn1*.

Материалы и методы. Исследования проводили на этиолированных проростках пяти озимых и пяти яровых форм злаков. Первая группа генотипов включала озимые сорта пшеницы Одесская полукарликовая, Дальницкая, Донская полуинтенсивная, линию 628/10 (линия любезно предоставлена заведующим отделом генетических основ селекции СГИ А.И. Рыбалко) и сорт озимого ячменя Тамань. Яровые генотипы представлены сортами пшеницы Журавка, Пранка, Gamut, Norin 29 и сортом ячменя Жозефин. Генотипы озимых форм пшеницы и ячменя содержат только рецессивные аллели *vrn1*. У яровых форм присутствуют следующие доминантные аллели соответствующего локуса: в сортах Журавка и Gamut – *VrnA1a* и *VrnB1a*, у Norin 29 – *VrnB1a*, у ярового ячменя Жозефин – *VrnH1*. У всех сортов локус *Vrn1* находится в хромосоме 5 гомеологичных геномов [14].

Условия выращивания проростков описаны в предыдущей работе [32]. Суть экстремальных воздействий состояла в резких колебаниях температуры выращивания (от +4 до +40 °С) на протяжении 4 сут. Получение растительных экстрактов и электрофоретическое разделение белков проводили, как указано в [27]. Анализировали общие спектры белков после окрашивания кумасси R-250 электрофореграмм, полученных в неденатурирующих условиях [33], а также спектры белков с пероксидазной, супероксиддисмутазной (СОД) и фенолоксидазной активностью по ранее указанной прописи [27]. Для электрофоретического анализа готовили средневзвешенные пробы из гомогенатов проростков, полученных в трех независимых повторностях экспе-

римента. Все пробы готовили при одинаковом соотношении ткань : буфер и в одинаковых количествах вносили в гель. Для количественного анализа электрофореграмм использовали компьютерную программу АнаИС (М.А. Поджарский, Д.Г. Рыбалка, *podzharsky@ukr.net*). Общее количество белка в пробе и активность ферментов рассчитывали в условных единицах оптической плотности на основании денситометрирования полученных электрофореграмм с помощью указанной программы. Сопоставляли показатели растений при 26–27 °С (контроль) с показателями, полученными для растений, которые выращены при экстремальных температурах (опыт). Интенсивность окраски полос на электрофореграммах, как известно, зависит не только от удельной активности соответствующего фермента, но и от количественного содержания его молекул в клетках. В связи с этим денситометрически измеряемая плотность отдельных электрофоретических полос и площадь под пиками, соответствующими этим полосам, нами расценивались как экспрессивность соответствующих изоформ данного фермента. Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием пакета программ Microsoft Excel. Объем выборок соответствовал количеству анализируемых генотипов. Проверку распределения полученных данных на нормальность проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка [34]. Во всех случаях распределение соответствовало нормальному. Достоверность различий устанавливали в соответствии с *t*-критерием Стьюдента для зависимых выборок (при определении влияния условий) или для независимых выборок (при сравнении показателей для озимых и яровых растений). Учитывая сравнительно малый объем выборок (количество исследуемых генотипов), дополнительно проводили анализ с помощью непараметрических критериев. При анализе независимых выборок использовали критерий Уилкоксона (Манна-Уитни) и критерий Вандер Вардена (X), для зависимых выборок – критерий Уилкоксона (T). Анализ связей показателей осуществляли с помощью коэффициента корреляции Пирсона (*r*), а также непараметрического коэффициента корреляции рангов Спирмена



Электрофоретические спектры белков при окрашивании кумасси (а), на пероксидазную (б), фенолоксидазную (в), супероксиддисмутазную (з) активности; экстракты получены из проростков: 1, 2 – озимого ячменя сорта Тамань, 3, 4 – ярового ячменя сорта Жозефин, 5, 6 – озимой пшеницы сорта Одесская полукарликовая, 7, 8 – яровой пшеницы сорта Журавка, 9, 10 – озимой пшеницы сорта Дальницкая, 11, 12 – яровой пшеницы сорта Gamut, 13, 14 – озимой пшеницы сорта Донская полуинтенсивная, 15, 16 – яровой пшеницы сорта Norin 29; нечетные варианты – выращивание растений в контрольных условиях, четные варианты – выращивание растений при экстремальных температурных условиях; изображение геля с супероксиддисмутазной активностью инвертировано; цифры по вертикали – относительная электрофоретическая подвижность (R_f)

(r_s). Результаты параметрической и непараметрической статистики оказались полностью идентичными.

Результаты исследований и их обсуждение.
Сравнение электрофоретических спектров белков и ферментов озимых и яровых генотипов при выращивании растений при постоянной температуре. Распределение белков на электрофо-

реграммах после окрашивания кумасси представлено на рисунке, а. Денситометрирование и математическая обработка полученных данных (конкретные значения не представлены) показали, что при постоянной температуре выращивания (26–27 °С) проростки яровых и озимых злаков принципиально не различались ни по общему содержанию бел-

ков в экстрактах, ни по их распределению в электрофоретическом спектре.

Окрашивание белков с помощью кумасси не является специфичным и позволяет оценить только общее состояние белкового обмена. Для оценки адаптивности тканей особое значение имеет изучение экспрессии окислительно-восстановительных ферментов, прямо или опосредованно влияющих на концентрацию в тканях активных форм кислорода [31, 35, 36]. Анализ электрофореграмм пероксидаз, СОД и фенолоксидаз из тканей контрольных растений исследуемых форм злаков не выявил достоверной связи экспрессивности указанных ферментов с генетически детерминированным типом развития (рисунок, б–г).

Общие для яровых и озимых генотипов изменения в белковом обмене и спектрах ферментов, происходящие при экстремальных условиях. После воздействия экстремальных температур в тканях проростков на фоне снижения их массы происходит увеличение относительного содержания РНК и такого важного функционального показателя, как отношение РНК : ДНК [32]. Это может свидетельствовать о перепрограммировании при этих условиях обмена

веществ, в первую очередь синтеза белков. Высказанное предположение согласуется с мнением авторов, согласно которому адаптация растений к неблагоприятным условиям сопровождается дифференциальным изменением активности генов [37–41], сдвигом баланса между синтезом и распадом белков, модификацией полипептидов [42–44], изменением трансляционной активности полисом [45, 46] и т.п.

По усредненным для всех генотипов данным количество белка, которое выявлялось на электрофореграммах экстрактов растений, выращенных при экстремальных температурных условиях, было меньше по сравнению с нормой более чем на 25 % ($P < 0,001$) (табл. 1). Примененная в работе электрофоретическая система Дэвиса позволяет разделять только кислые белки. Катионные, положительно заряженные протеины выпадают из анализа. Тем не менее можно полагать, что изменение содержания кислых белков адекватно отражает общее состояние белкового обмена. Уменьшение содержания белка в тканях растений, наблюдаемое после действия на них экстремальных температур, затрагивало почти весь

Изменение содержания белка в различных фракциях электрофоретического

Показатели	Относительная электрофоретическая					
	0,01	0,03–0,07	0,10–0,11	0,015	0,18–0,19	0,21–0,23
Все генотипы *	$-32,12 \pm 10,06$ ↓ 0,02	–	$-40,37 \pm 7,66$ ↓ 0,03	$-37,37 \pm 4,15$ ↓ 0,0005	$-34,72 \pm 4,26$ ↓ 0,003	–
Озимые генотипы *	$-40,96 \pm 8,41$ ↓ 0,03	–	–	$-27,05 \pm 2,94$ ↓ 0,007	–	–
Яровые генотипы *	–	$-42,52 \pm 7,05$ ↓ 0,05	$-52,91 \pm 2,40$ ↓ 0,01	$-47,68 \pm 0,85$ ↓ 0,02	$-37,16 \pm 5,98$ ↓ 0,02	–
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя	–	–	–	0,007 ** $r = -0,94$	–	–

Примечание. В табл. 1–7: * – приведены значения изменений исследуемого показателя, рассчитан ↓, ↑ – направление изменений показателя в опыте по сравнению с контролем с указанием значения до сравнения яровых и озимых растений с помощью метода расчета для несопряженных совокупности достоверных различий между сравниваемыми вариантами; в этом случае конкретные значения

белковый спектр. Достоверно не изменялось количество лишь небольшого числа фракций с Rf 0,03–0,07; 0,21–0,25 и 0,85–0,90. Несмотря на уменьшение общего количества белка в тканях растений, выращиваемых при экстремальных колебаниях температуры, распределение различных фракций в белковых спектрах существенно не изменялось: достоверно снижался только удельный вес группы белков, расположенных в зоне с относительной подвижностью 0,10–0,15 (табл. 2).

Таким образом, выращивание растений в экстремальных температурных условиях при водило к уменьшению общего содержания белка в тканях. Однако количество белка в отдельных фракциях, составляющих около 20 % всех анионных белков, практически не изменялось.

Выяснилось, что в ответ на стрессовое воздействие в тканях растений происходят существенные изменения экспрессивности исследуемых оксидоредуктаз (рисунок, б–г и табл. 3–5). Так, при выращивании растений в условиях резких колебаний температуры суммарная активность пероксидаз в них снижалась почти на 20 %. При этом проис-

ходило количественное перераспределение активности между фракциями фермента: активность быстроподвижной молекулярной формы фермента увеличилась примерно на 40 %, зато на столько же снижалась активность изоформ со средней подвижностью. Соответственно удельный вес быстрой фракции пероксидазы возрастал почти вдвое, а доля ее изоформ с относительной электрофоретической подвижностью от 0,13 до 0,26 падала (табл. 3).

В ответ на экстремальное воздействие температуры в проростках исследуемых форм злаков понижалась также экспрессивность структурных генов супероксиддисмутаза (табл. 4). Это происходило за счет уменьшения активности в медленной ($Rf = 0,01–0,18$) и быстрой ($Rf = 0,84$) зонах электрофоретического спектра. Снижение суммарной активности СОД сопровождалось изменением ее распределения в электрофоретическом спектре: при экстремальных условиях выращивания удельный вес медленных форм фермента ($Rf = 0,01–0,18$) в тканях проростков уменьшался на 20 % и увеличилась доля фракции с $Rf = 0,30–0,77$. Удельный вес супероксиддис-

Таблица 1
спектра при выращивании растений в условиях резких колебаний температуры

подвижность фракций, Rf							Всего
0,24–0,25	0,28–0,30	0,33–0,37	0,40–0,41	0,46–0,53	0,58–0,82	0,85–0,89	
–	$-22,00 \pm 8,14$ ↓ 0,05	$-22,45 \pm 4,97$ ↓ 0,01	$-17,98 \pm 4,32$ ↓ 0,01	$-15,44 \pm 5,89$ ↓ 0,03	$-23,39 \pm 9,91$ ↓ 0,05	–	$-25,65 \pm 3,99$ ↓ 0,0004
–	–	–	$-19,48 \pm 2,09$ ↓ 0,06	–	–	–	$-19,81 \pm 5,35$ ↓ 0,01
–	–	$-21,21 \pm 5,91$ ↓ 0,05	–	–	–	–	$-31,50 \pm 4,80$ ↓ 0,02
–	–	–	–	–	–	–	

ные по формуле (опыт – контроль)/контроль, %, и стандартная ошибка среднего арифметического; достоверности различий, вычисленного методом сравнения сопряженных совокупностей; ** – результаты тей; r – значение коэффициента корреляции между изменением показателя и озимостью; «–» отсутне приведены.

Изменение удельного веса белковых фракций в электрофоретических спектрах

Показатели	Относительная электрофоретическая					
	0,01	0,03–0,07	0,10–0,11	0,015	0,18–0,19	0,21–0,23
Все генотипы *	–	–	–21,13 ± 7,80 ↓ 0,03	–15,78 ± 4,96 ↓ 0,02	–	–
Озимые генотипы *	–27,33 ± 6,23 ↓ 0,04	–	–	–	–	–
Яровые генотипы	–	–	–31,60 ± 4,26 ↓ 0,02	–23,81 ± 4,38 ↓ 0,03	–	–
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя	–	–	–	0,05** <i>r</i> = 0,61	–	–

мутазной активности в быстрой зоне спектра ($R_f = 0,84$) при этом достоверно не изменялся (по выборке из всех генотипов).

Общее состояние растительных клеток и их реактивность зависят от концентрации в них пероксида водорода, которая определяется соотношением между молекулярно-биологическими системами, способствующими образованию пероксида водорода (ряд оксидаз, СОД), и функционированием компонентов, разрушающих этот пероксид (в частности пероксидаз) [35, 47, 48]. В связи с этим определяли отношение пероксидазной активности к супероксиддисмутазной, выявляемых на электрофореграммах. Оказалось, что экстремальные колебания температуры при выращивании проростков не приводили к достоверным изменениям указанного соотношения.

Суммарная фенолоксидазная активность проростков в отличие от активности ферментов при выращивании растений в неблагоприятных температурных условиях существенно не изменялась. Выявлено уменьшение активности и удельного веса форм, составляющих чуть более $1/5$ всего спектра фенолоксидазной активности (табл. 5).

Пероксидазная и фенолоксидазная активности тесно сопряжены друг с другом и, возможно, определяются одним белком [49]. В связи с этим рассчитывали отношение пероксидазной активности, выявляемой на электрофореграммах, к фенолоксидазной. Анало-

Изменение экспрессивности пероксидаз в

Показатели	Относитель	
	0,03–0,07	
Все генотипы*	–	
Озимые генотипы*	–	
Яровые генотипы*	–	
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя **		
Все генотипы*	–	
Озимые генотипы*	–	
Яровые генотипы*	+8,09 ± 1,50 ↑ 0,05	
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя	–	

гичные расчеты проводили также для отдельных областей электрофоретических спектров указанных ферментов. Несмотря на то, что отношение суммарных активностей при экстремальных температурах выращивания растений оставалось постоянным, отношения

Таблица 2

экстрактов проростков при их выращивании в экстремальных температурных условиях

подвижность фракций, <i>Rf</i>						
0,24–0,25	0,28–0,30	0,33–0,37	0,40–0,41	0,40–0,53	0,58–0,82	0,85–0,89
–	–	–	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–
–	–	+13,63 ± 5,83 ↓ 0,05	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–	–

Таблица 3

проростках злаков, выращиваемых в условиях резких колебаний температуры

ная электрофоретическая подвижность фракций, <i>Rf</i>					Всего
0,10–0,12	0,13–0,18	0,20–0,26	0,28–0,39	0,78–0,83	
<i>Активность</i>					
–	–30,25 ± 5,71 ↓ 0,04	–41,81 ± 7,13 ↓ 0,01	–38,98 ± 4,89 ↓ 0,04	+38,40 ± 3,95 ↑ 0,05	–19,86 ± 3,55 ↓ 0,05
–	–	–55,98 ± 10,97 ↓ 0,05	–36,91 ± 7,66 ↓ 0,04	–	–
–	–53,29 ± 5,28 ↓ 0,03	–	–	–	–
–	–	–	–	–	–
<i>Удельный вес фракций</i>					
–	–23,58 ± 5,58 ↓ 0,05	–31,79 ± 1,26 ↓ 0,01	–	+80,58 ± 1,45 ↑ 0,01	
–	–	–33,83 ± 1,98 ↓ 0,05	–51,94 ± 1,43 ↓ 0,05	+98,39 ± 1,54 ↑ 0,05	
–	–42,68 ± 1,54 ↓ 0,05	–	–	+106,65 ± 2,61 ↑ 0,05	
–	0,05 ** <i>r</i> = 0,60	–	0,04 ** <i>r</i> = –0,68	–	

активностей отдельных фракций ферментов при этом изменялись (табл. 6). Статистически достоверным было относительное усиление оксидазной реакции по сравнению с пероксидазной в области спектра с подвижностью 0,28–0,39.

Связь генетически детерминированного типа развития растений с изменениями содержания белка и активности структурных генов ферментов в тканях проростков при экстремальных температурах их выращивания. В целом изменения в суммарном содержании бел-

ков, происходившие после влияния экстремальных температур, у растений с разным типом развития были сходны (табл. 1 и 2). Однако для фракции общих белков с $Rf = 0,15$ выявлена сильная связь между степенью ответных изменений в содержании белков с присутствием в генотипе аллелей, определяющих потребность в яровизации: коэффициент корреляции с озимостью (присутствием рецессивных аллелей локуса *Vrn1*) в этом случае составил 0,94.

Типичной особенностью изменений в экспрессивности исследуемых ферментов, вызванных резкими колебаниями температуры, было количественное перераспределение активности между различными фракциями электрофоретических спектров. В целом (при анализе всех генотипов) для ответной реакции растений на экстремальные температуры характерным являлось уменьшение удельного веса форм пероксидаз с $Rf = 0,13-0,18$ и $Rf =$

$= 0,20-0,26$ (табл. 3). При этом степень изменений экспрессивности отдельных фракций пероксидаз у озимых и яровых генотипов существенно различалась. Снижение доли форм с $Rf = 0,13-0,18$ в спектре пероксидаз статистически достоверно только для яровых форм при коэффициенте корреляции с озимостью $r = 0,60$, изменения в области спектра с $Rf = 0,20-0,26$ достоверны только для озимых злаков. Кроме того, у озимых форм злаков существенно уменьшалась доля пероксидаз с подвижностью $0,28-0,39$ (корреляция с озимостью $r = -0,68$).

Изменения экспрессивности СОД в проростках при действии экстремальных колебаний температуры сильнее проявлялись у озимых генотипов (табл. 4). Кроме того, только у озимых повышался удельный вес быстроподвижной ($Rf = 0,84$) формы упомянутого фермента (корреляция с озимостью $r = 0,71$).

Таблица 4

Изменение экспрессивности супероксиддисмутаза в проростках злаков, выращиваемых в условиях резких колебаний температуры

Показатели	Относительная электрофоретическая подвижность фракций, Rf				Всего
	0,01–0,18	0,22–0,27	0,30–0,77	0,84	
<i>Активность</i>					
Все генотипы*	$-61,52 \pm 5,49$ ↓ 0,03	—	—	$-16,65 \pm 2,11$ ↓ 0,05	$-27,70 \pm 8,72$ ↓ 0,05
Озимые генотипы*	—	—	—	—	$-40,16 \pm 14,77$ ↓ 0,05
Яровые генотипы*	—	—	—	—	—
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя**	—	—	—	—	—
<i>Удельный вес фракций</i>					
Все генотипы*	$-21,52 \pm 2,16$ ↓ 0,01	—	$+18,11 \pm 0,71$ ↑ 0,04	—	
Озимые генотипы*	$-28,88 \pm 2,31$ ↓ 0,02	—	$+18,93 \pm 0,71$ ↑ 0,05	$+16,13 \pm 1,14$ ↑ 0,003	
Яровые генотипы*	—	—	—	—	
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя	—	—	—	$0,03$ ** $r = 0,71$	

Что касается фенолоксидазы и ее изоформ, то озимость или яровость злаков (аллельный состав локусов *Vrn1*) достоверно не влияли на показатели их экспрессивности (табл. 5).

Отношение пероксидазной активности к супероксиддисмутазной, как указывалось ранее, у озимых и яровых форм злаков было константным и не изменялось под влиянием внешних условий. Вполне возможно, что соотношение указанных ферментативных активностей является очень важным для поддержания гомеостаза растительного организма и мало изменяется даже в экстремальных условиях. Отношение пероксидазной активности к фенолоксидазной оказалось более лабильным и заметно изменялось при экстремальных температурных условиях. По динамике этого показателя яровые и озимые генотипы злаков достоверно различались (табл. 6).

Из представленных в работе данных можно заключить, что зависимость экспрессивности

генов исследуемых оксидоредуктаз от типа развития растений определяется конкретной ситуацией во взаимоотношении «организм — среда» и, возможно, связана с функционированием определенной регуляторной системы в клетке. Так, количественные и качественные показатели спектров исследуемых оксидоредуктаз злаков, выращенных при постоянной температуре, принципиально не зависели от аллельного состояния локуса *Vrn1*. Однако при действии на растения экстремальных колебаний температуры обнаруживались существенные различия в экспрессии исследуемых оксидоредуктаз у озимых и яровых генотипов (табл. 1–6).

В предыдущей работе [32] было показано, что при экстремальных колебаниях температуры выращивания в проростках всех генотипов увеличивалось отношение РНК : ДНК, что свидетельствует об усилении функциональной активности генетического аппарата.

Таблица 5

Изменение экспрессивности фенолоксидаз в проростках злаков, выращиваемых в условиях резких колебаний температуры

Показатели	Относительная электрофоретическая подвижность фракций, <i>R_f</i>					Всего
	0,03–0,07	0,10–0,12	0,13–0,18	0,20–0,26	0,28–0,39	
<i>Активность</i>						
Все генотипы*	—	–18,28 ± 2,40 ↓ 0,03	—	—	—	—
Озимые генотипы*	—	—	—	—	—	—
Яровые генотипы*	—	—	—	—	—	—
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя**	—	—	—	—	—	—
<i>Удельный вес фракций</i>						
Все генотипы*	—	–16,81 ± 1,09 ↓ 0,01	—	–46,60 ± 0,34 ↓ 0,03	—	—
Озимые генотипы*	—	—	—	—	—	—
Яровые генотипы*	—	–16,02 ± 1,24 ↓ 0,05	—	–45,49 ± 0,27 ↓ 0,02	—	—
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя	—	—	—	—	—	—

Таблица 6

Изменение соотношения пероксидазной и фенолоксидазной активностей в проростках злаков, выращиваемых в условиях резких колебаний температуры

Показатели	Относительная электрофоретическая подвижность фракций, R_f					Всего
	0,03–0,07	0,10–0,12	0,13–0,18	0,20–0,26	0,28–0,39	
Все генотипы*	–	–	–	–	$-94,56 \pm 54,80$ ↓ 0,05	–
Озимые генотипы*	–	–	–	–	$-96,00 \pm 37,27$ ↓ 0,05	–
Яровые генотипы*	–	–	–	–	–	–
Сравнение озимых и яровых генотипов по изменению показателя**	–	–	–	–	$0,05^{**}$ $r = -0,64$	–

Таблица 7

Изменение показателей внутреннего разнообразия электрофоретических спектров пероксидазы и супероксиддисмутазы при действии на растения экстремальных колебаний температуры

Показатели	Ген-энзимные системы		
	ПО + СОД	ПО	СОД
Все генотипы *	$-6,74 \pm 3,00$ ↓ 0,01	–	$-5,82 \pm 3,65$ ↓ 0,04
Озимые генотипы *	–	–	$-9,18 \pm 6,09$ ↓ 0,04
Яровые генотипы *	$-5,65 \pm 2,80$ ↓ 0,03	$-8,85 \pm 3,61$ ↓ 0,03	–

В связи с этим существенный интерес представляет вопрос об особенностях генетического контроля над экспрессивностью структурных генов ферментов у озимых и яровых форм злаков при экстремальных условиях окружающей среды. Для решения этой задачи применили специальный интегральный показатель внутреннего разнообразия электрофоретического спектра K_D [50]. Поскольку наиболее существенные изменения выявлены для спектров пероксидаз и супероксиддисмутаз, анализу подвергли изменения именно в этих ферментных системах (табл. 7).

Два первых основных закона кибернетики гласят: 1) сложность системы управления должна быть адекватна сложности управляемой системы; 2) процесс управления приводит к

понижению уровня неопределенности управляемой системы, т.е. уменьшению ее разнообразия [51]. Парно сравниваемые контрольные и опытные группы растений генетически сходны, поскольку относятся к одному сорту или линии. Следовательно, можно предположить, что наблюдаемое в опыте уменьшение величины показателя K_D связано не с изменением сложности управляющей системы (генома), а обусловлено активизацией функции регуляторных генов, приводящей в экстремальных условиях к установлению со стороны генетического аппарата более жесткого контроля над экспрессией исследуемых оксидоредуктаз. Из данных, представленных в табл. 7, видно, что у яровых генотипов, несущих доминантные аллели в локусе *Vrn1*, при

стрессе в первую очередь усиливается регуляция пероксидазной системы растительных клеток. В отличие от этого рецессивные аллели локуса *Vrn1*, свойственные озимым формам злаков, определяют преимущественно контроль над экспрессией структурных генов супероксиддисмутаза. Представленные в работе данные (табл. 4 и 7) об активном регулировании при стрессе супероксиддисмутазной ген-энзимной системы у озимых злаков принципиально согласуются с результатами, полученными другими авторами. В этом плане можно указать на работы по изучению экспрессии генов супероксиддисмутаза, содержащей марганец при холодной акклимации почти изогенных озимых и яровых линий пшеницы [52, 53]. В приведенных работах показана важная роль стимуляции функции СОД для обеспечения адаптивных возможностей растений и установлена более продолжительная гиперфункция генов СОД при стрессе растений озимых линий.

На основании проведенных исследований можно заключить, что зависимость экспрессивности структурных генов исследуемых оксидоредуктаз от генетически детерминированного типа развития (озимости или яровости) проявляется именно в экстремальных условиях выращивания злаков. Это влияние осуществляется путем усиления генетического контроля над экспрессией изоформ пероксидаз и супероксиддисмутаза. Различия в регулировании активности структурных генов оксидоредуктаз доминантными и рецессивными аллелями локусов *Vrn1* являются, возможно, одной из причин формирования неодинаковых адаптивных возможностей озимых и яровых форм злаков к действию температурных факторов среды.

В свете современных представлений локус *Vrn1* (*WAP1*) рассматривается в качестве гомеотического гена, продукт которого осуществляет регуляцию экспрессии многих других генов [54]. Исходя из полученных нами результатов, можно предположить, что аллели упомянутого локуса влияют (прямо или опосредованно через другие регуляторные системы) на экспрессивность структурных генов оксидоредуктаз.

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

OXIDOREDUCTASES EXPRESSION
AND PROTEINS STORAGE IN WHEAT AND
SPRING CEREALS UNDER EXTREMAL
TEMPERATURE CONDITION

Cultivation of wheat and barley plants under temperature stress fluctuations was the reason of reduction of acid protein common storage in the tissues more than 25 % and the reason of reduction of peroxidase and superoxidismutase common activities. There were no changes of common phenoloxidase activity. Activity redistribution between separate fractions of enzyme spectra were linked with enzyme expression changes. Alteration of peroxidase/oxidase ratio for separate fractions of electrophoretical spectra has been defined as a result of extreme temperature influence over a period of plant growing. At the same time there were no alterations in peroxidase/superoxidoreductase fraction ratio in seedlings. The *Vrn1*-loci did not have a single meaning for expression of investigated oxidoreductases because their influence was determined by the «organism–environment» definite situation. In «normal» growth circumstances there was no correlation between the type of development and qualitative and quantitative characteristics of oxidoreductase spectra. The alteration of definite enzyme isoform degree in forming of plant stress response was different for spring and winter genotypes that testifies dependence of the functional state of the probed enzymes on allelic composition of locus *Vrn1*.

V.A. Topnikov, L.F. D'yachenko, V.M. Toцький

ЕКСПРЕССИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ
ОКСИДОРЕДУКТАЗ І БІЛКОВИЙ ПРОФІЛЬ
ТКАНИН ПАРОСТКІВ ОЗИМИХ ТА ЯРИХ
ФОРМ ЗЛАКІВ ЗА ЕКСТРЕМАЛЬНИХ
КОЛИВАНЬ ТЕМПЕРАТУРИ

Вирощування рослин м'якої пшениці і ячменю за екстремальних коливань температури приводило до зменшення загального вмісту кислих білків у тканинах на понад 25 % та зниження сумарної активності пероксидаз і супероксиддисмутаза. Загальна фенолоксидазна активність при цьому не змінювалась. На тлі змін загальної експрессивності ферментів відбувався перерозподіл активностей між їхніми окремими ізоформами. Екстремальні температури довели до достовірної зміни у клітинах паростків відношення пероксидазної активності до супероксиддисмутазної, але викликали зміну відношення пероксидазної активності до фенолоксидазної в окремих фракціях електрофоретичного спектра. Залежність експрессивності структурних генів оксидоредуктаз від генетично детермінованого типу роз-

витку (озимість чи ярість) визначалась конкретними обставинами у взаємовідношенні «організм – середовище». За вирощування рослин при постійній оптимальній температурі кількісні та якісні показники спектрів оксидоредуктаз не корелювали з озимістю чи ярістю досліджуваних злаків. Однак за формування реакції у відповідь на екстремальні коливання температури ступінь змін експресивності окремих ізоформ ферментів у ярих та озимих генотипів відрізнявся, що свідчить про залежність функціонального стану локусів досліджуваних ферментів від алельного складу локусу *Vrn1*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Matsushika A., Makino S., Kojima M., Mizuno T. Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: Insight into the plant circadian clock // *Plant Cell Physiol.* – 2000. – **41**. – P. 1002–1012.
2. Salome P., To J., Kieber, J., McClung C. Arabidopsis response regulators ARR3 and ARR4 play cytokinin-independent roles in the control of circadian period // *Plant Cell.* – 2006. – **18**. – P. 55–69.
3. Nakamichi N., Kita M., Niinuma K. et al. Arabidopsis clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway // *Plant Cell Physiol.* – 2007. – **48**, № 6. – P. 822–832.
4. Yano M., Katayose Y., Ashikari M. et al. Hd1, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the Arabidopsis flowering time gene CONSTANS // *Plant Cell.* – 2000. – **12**. – P. 2473–2483.
5. Liu J., Yu J., McIntosh L., Kende H., Zeevaart J. Isolation of a CONSTANS ortholog from *Pharbitis nil* and its role in flowering // *Plant Physiol.* – 2001. – **125**. – P. 1821–1830.
6. Turner A., Beales J., Faure S., Dunford R., Laurie D. The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley // *Science.* – 2005. – **310**. – P. 1031–1034.
7. Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W., Laurie D.A. A pseudo-response regulator is mis-expressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2007. – **115**. – P. 721–733.
8. Niinuma K., Nakamichi N., Miyata K. et al. Roles of Arabidopsis PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR) genes in the opposite controls of flowering time and organ elongation under long-day and continuous light conditions // *Plant Biotechnol.* – 2008. – **25**. – P. 165–172.
9. Wilhelm E.P., Turner A.S., Laurie D.A. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.) // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – **118**, № 2. – P. 285–294.
10. Yan L., Loukoianov A., Blechl A. et al. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization // *Science.* – 2004. – **303**, № 5664. – P. 1640–1644.
11. Yan L., Fu D., Li C. et al. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**, № 51. – P. 19581–19586.
12. Стельмах А.Ф., Авсенин В.И., Воронин А.Н. Каталог сортов яровой мягкой пшеницы по генотипам системы локусов *Vrn* (чувствительность к яровизации). – Одесса: ВСГИ, 1987. – 112 с.
13. Stelmakh A.F. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat // *Euphytica.* – 1993. – **65**. – P. 53–60.
14. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat. Gene symbols. Morphological and physiological traits. Response to vernalization. [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.
15. Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals. [Электронный ресурс] *Curr. Opin. in Plant Biol.* – 2009. – **12**. – P. 1–7. – Режим доступа: [doi:10.1016/j.pbi.2008.12.010](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.010).
16. Gendal A.R., Levy Y.Y., Wilson A., Dean C. The Vernalization 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis* // *Cell.* – 2001. – **107**, № 16. – P. 525–535.
17. Shindo C., Sasakuma T. Genes responding to vernalization in hexaploid wheat // *Theor. Appl. Genet.* – 2002. – **104**, № 6/7. – P. 1003–1010.
18. Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G. et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **100**, № 10. – P. 6263–6268.
19. Caicedo A.L., Stinchcombe J.R., Olsen K. M. et al. Epistatic interaction between *Arabidopsis* *FRJ* and *FLC* flowering time genes generation a latitude cline in a life history trait // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2004. – **101**, № 44. – P. 15670–15675.
20. Fu D., Szűcs P., Yan L. et al. Lange deletion within the first intron in *VRN1* are associated with spring growth habit in barley and wheat // *Mol. Genet. Genom.* – 2005. – **273**, № 1. – P. 54–65.
21. Von Zitzewitz J., Szűcs P., Dubcovsky J. et al. Mo-

- lecular and structural characterization of barley vernalization genes // *Plant. Mol. Biol.* – 2005. – **59**, № 3. – P. 449–467.
22. Loukoianov A., Yan L., Blechl A. et al. Regulation of *VRN-1* vernalization genes in normal and transgenic polyploid wheat // *Plant Physiol.* – 2005. – **138**, № 4. – P. 2364–2373.
 23. Sung S., Amasino R.M. Molecular genetic studies of the memory of winter // *J. Exp. Bot.* – 2006. – **57**, № 13. – P. 3369–3377.
 24. Szűcs P., Scinner J.S., Karsai J. et al. Validation of the *VRN-H2/VRN-H1* epistatic model in barley reveals that intron length variation in *VRN-H1* may account for the continuum of vernalization sensitivity // *Mol. Genet. Genom.* – 2007. – **277**, № 3. – P. 249–261.
 25. Distelfeld A., Tranquilli G., Li Y. et al. Genetic and molecular characterization of the *VRN2* loci in tetraploid wheat // *Plant Physiol.* – 2009. – **149**, № 1. – P. 245–257.
 26. Дьяченко Л.Ф., Топтиков В.А., Мирось С.Л., Бабаянц Л.Т., Тоцький В.М. Множинні молекулярні форми деяких оксидоредуктаз і резистентність м'якої пшениці до фузаріозу // *Вісн. ОНУ.* – 2001. – **6**, № 1. – С. 5–66.
 27. Топтиков В.А., Мирось С.Л., Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.Н., Залогина М.А. Сопряженність устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe. и множественных молекулярных форм некоторых ферментов // *Цитология и генетика.* – 2002. – **36**, № 3. – С. 3–11.
 28. Топтиков В.А., Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.Н., Хаустова Н.Д. Оксидоредуктазы в процессе индивидуального развития и адаптации растений картофеля *Solanum tuberosum* L. // *Біологічні проблеми і проблеми рослинництва : Зб. наук. пр. Уман. держ. аграр. ун-ту (спеціальний випуск).* – Умань, 2003. – С. 44–50.
 29. Топтиков В.А., Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.М., Бабаянц Л.Т. Электрофоретичні спектри пероксидази у різних за стійкістю до бурої листової іржі та твердої сажки ліній озимої м'якої пшениці та їх батьків // *Вісн. Одес. нац. ун-ту.* – 2005. – **10**, вип. 3. – С. 70–84.
 30. Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.Н., Файт В.И., Топтиков В.А. Экспрессивность некоторых ген-энзимных систем в проростках различающихся по генам *Vrd* линий озимой мягкой пшеницы в процессе закаливания // *Вісн. Одес. нац. ун-ту.* – 2007. – **12**, вип. 5. – С. 103–111.
 31. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegen F. The reactive oxygen gene network of plants // *Trends Plant Sci.* – 2004. – **9**, № 10. – P. 490–498.
 32. Топтиков В.А., Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.Н. Некоторые физиолого-биохимические показатели озимых и яровых генотипов злаков при действии экстремальных температурных условий // *Вісн. Одес. нац. ун-ту.* – 2010. – **15**, № 6. – С. 47–54.
 33. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот : Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М.: Наука, 1981. – 288 с.
 34. Атраментова Л.О., Утевська О.М. Статистичні методи в біології. – Харків, 2007. – 288 с.
 35. Hung S.-H., Yu C.-W., Lin C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // *Bot. Bull. Acad. Sin.* – 2005. – **46**. – P. 1–10.
 36. Курганова Л.Н., Веселов А.П., Гончарова Т.А., Синицына Ю.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система хлоропластов гороха (*Pisum sativum* L.) при тепловом шоке // *Физиология растений.* – 1997. – **44**, № 5. – С. 742–746.
 37. Косаковская И.И. Стрессовые белки растений. – Киев, 2008. – 154 с.
 38. Kreps J.A., Wu Y., Chang H.-S. et al. Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress // *Plant Physiol.* – 2002. – **130**. – P. 2129–2141.
 39. Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H. et al. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analysis // *Plant Physiol.* – 2003. – **133**. – P. 1755–1767.
 40. Langridge P., Paltridge N., Fincher G. Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals // *Brief. Func. Genom. and Proteom.* – 2006. – **4**, № 4. – P. 343–354.
 41. Sninnusamy V., Zhu J., Zhu J.-K. Gene regulation during cold acclimation in plants // *Physiol. Plant.* – 2006. – **126**. – P. 52–61.
 42. Блехман Г.И., Шеламова Н.А. Синтез и распад макромолекул в условиях стресса // *Усп. соврем. биологии.* – 1992. – **112**, № 3. – С. 281–297.
 43. Тарчевский И.А. Метаболизм растений при стрессе. – Казань, 2001. – 448 с.
 44. Zhu J.-K. Salt and drought stress signal transduction in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2002. – **53**. – P. 247–273.
 45. Веселов А.П., Курганова Л.Н., Ручкова О.В. Влияние теплового шока на цитоплазматическую белоксинтезирующую систему гороха // *Биохимия.* – 1997. – **62**, вып. 5. – С. 569–574.
 46. Бибишев В.А. Разработка молекулярно-кинетических маркеров стрессоустойчивости зерновых культур : Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Краснодар, 2007.

47. *Дмитриев А.П.* Сигнальные системы иммунитета растений // Цитология и генетика. – 2002. – **36**, № 3. – С. 58–68.
48. *Cheeseman J.M.* Hydrogen peroxide and plant stress: a challenging relationship // Plant stress. Global science books. – 2007. – **1**, № 1. – P. 4–15.
49. *Рубин Б.А., Ладыгина М.Е.* Физиология и биохимия дыхания растений. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1974. – 512 с.
50. *Топтиков В.А., Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.М.* Оценка спектров множественных форм ферментов с помощью показателя уровня внутреннего разнообразия // Цитология и генетика. – 2010. – **44**, № 1. – С. 46–53.
51. *Эшби У.Р.* Введение в кибернетику. – М.: Изд-во иностр. лит., 1959. – 432 с.
52. *Baek K.-H., Skinner D.Z.* Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near isogenic wheat lines // Plant Sci. – 2003. – **165**, № 6. – P. 1221–1227.
53. *Baek K.-H., Skinner D.Z.* Differential expression of manganese superoxide dismutase sequence variants in near isogenic lines of wheat during cold acclimation // Plant Cell Rep. – 2006. – **25**, № 2. – P. 223–230.
54. *Прокопик Д.К., Терновська Т.К.* Гомеотичні гени та їхня роль у формуванні ознак морфології в пшениці // Цитология и генетика. – 2011. – **45**, № 1. – С. 52–67.

Поступила 27.11.10