

ДЬЯЧЕНКО Л.Ф.¹, ТОЦКИЙ В.Н.¹, ФАЙТ В.И.², ТОПТИКОВ В.А.¹

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

Украина, 65026, Одесса, ул. Дворянская, 2, e-mail: diachenkolff@mail.ru

²Селекционно-генетический институт УААН, отдел генетики,

Украина, Одесса, 65036, Овидиопольская дор., 3, e-mail: fayt@paso.net

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ У РЕКОМБИНАНТНО-ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ОДЕССКАЯ 16/БЕЗОСТАЯ 1 ПРИ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ

Адаптация растений к холоду сопровождается существенной перестройкой метаболизма, при которой в организме срабатывают генетические механизмы защиты от разрушительных эффектов низкой температуры [1]. Процесс адаптации регулируется путем комплексного взаимодействия генотипа с окружающей средой, что приводит к значительным биохимическим изменениям [2]. Установлено, что закаливание растений в условиях низких положительных температур сопровождается изменением экспрессии большого количества генов [3, 4]. При этом синтез защитных физиологически активных веществ обусловлен составом и активностью множественных молекулярных форм ферментных систем, в частности, ферментов класса оксидоредуктаз, например пероксидазы, фенолоксидазы и др.

Цель настоящей работы - определение корреляционных связей экспрессивности отдельных молекулярных форм оксидоредуктаз с генами фотопериодической чувствительности (*Ppd*) и продолжительности яровизационной потребности (*Vrd*), непосредственно влияющими на формирование уровня устойчивости растений к низким отрицательным температурам, а также с генами короткостебельности (*Rht*).

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали идентифицированные по аллелям генов *Vrd1*, *Ppd-D1* и *Rht8* рекомбинантно-инбредные линии F₅ Одесская 16/Безостая 1, созданные в отделе генетики Селекционно-генетического института (СГИ) [5]. Семена указанных линий высевали 1.10.2006 г. на опытном участке отдела генетики СГИ. Материал для анализа (зеленые листья) отбирали с момента появления первого развернутого листа (25.10.06; контроль) через каждые семь суток на протяжении 10 недель, до наступления первых морозов. В первой декаде декабря в поле отбирали по 75-90 растений каждого генотипа (табл. 1) для промораживания при -16 °С методом пучков согласно Полтарева [6].

Таблица 1. Характеристика рекомбинантно-инбредных линий пшеницы

Линия	Генотип линий по генам <i>Ppd</i> , <i>Vrd</i> и <i>Rht8</i> *	Морозостойкость, % живых растений	Высота растений, см
436	<i>Vrd1 Ppd-D1a Rht8c</i>	50	78
459	<i>vrd1 Ppd-D1b Rht8a</i>	78,6	79
462	<i>vrd1Ppd-D1b Rht8a</i>	63	85
507	<i>Vrd1 Ppd-D1b Rht8a</i>	74,1	92
508	<i>Vrd1 Ppd-D1a Rht8a</i>	75	85
527	<i>Vrd1 Ppd-D1a Rht8a</i>	75	98
НСР _{0,05}		12	5

Примечание: *- указан гаплоидный генотип.

Экстрагирование, электрофорез и окрашивание ферментов (пероксидазы - ПО, фенолоксидазы - ФО, цитохромоксидазы - ЦХО, супероксиддисмутазы - СОД и эстеразы) проводили по ранее описанным методикам [7]. Электрофореграммы анализировали по программе АнаИС, математическую обработку - в Microsoft Excell.

Результаты и обсуждение

В результате электрофоретического разделения у каждой рекомбинантно-инбредной линии выявлено 9 изоформ ПО, 10 - ФО и ЦХО, 11 - СОД и эстеразы. Во всех случаях различия между генотипами были количественными, хотя и довольно существенными. По мере снижения температуры в процессе закаливания растений озимой пшеницы наблюдали неодинаковое повышение экспрессивности как отдельных изоформ, так и общей активности ферментов. Так, у линии 507 с длительностью яровизации достоверно коррелирует повышение экспрессивности всех наличествующих 9 изоформ пероксидазы, у линий 459, 462, 527 – 8 изоформ, у линий 508 и 436 – 6 и 5 изоформ ПО, соответственно. Суммарная экспрессивность пероксидазы у разных генотипов также повышается в разной степени: у линии 507 (генотип *Vrd1 Ppd-D1b*) – в 3,7 раз, у линий 508 и 527 (обе *Vrd1 Ppd-D1a*) – в 1,9 и 1,6 раз соответственно, у линий 459 и 462 (обе *vrd1 Ppd-D1b*) в 2,4 и 1,9 раз соответственно.

Рост экспрессивности всех без исключения изоформ фенолоксидазы достоверно коррелирует с длительностью яровизации у линий 436 и 462, минимальное количество таких корреляционных связей наблюдается у линии 508 – 6 изоформ. У всех линий к концу яровизации достоверно, хотя и в разной степени, повышается общая активность фермента. Так, максимально (втрое) общая экспрессивность ФО возрастает у линии 462, минимально (в 1,9 раза) – у линии 459.

Исследуемые рекомбинантно-инбредные линии существенно различаются по реакции цитохромоксидазы на закаливание растений. У линий 462 и 507 к окончанию закаливания происходит достоверное увеличение экспрессивности 8 изоформ из 10, тогда как у линии 436 всего одной изоформы. У этой же линии, в отличие от всех остальных, к окончанию закаливания не наблюдается увеличения общей экспрессивности ЦХО. У линий 462 и 507 общая экспрессивность фермента на десятой неделе возрастает вдвое по сравнению с экспрессивностью, зафиксированной на первой неделе эксперимента. У трех оставшихся линий увеличение тотальной экспрессивности ЦХО по сравнению с контролем не превышает 20 - 30 - %.

Слабее других ферментов на условия закаливания растений реагирует СОД, причем эта реакция у исследуемых генотипов неодинакова. Так, у линии 436 с продолжительностью закаливания коррелирует увеличение экспрессивности 5 изоформ, у линии 507 - 3, у линии 459 – одна изоформа. Достоверное увеличение тотальной экспрессивности супероксиддисмутазы наблюдается только у линии 507 (на 30 %). Более того, экспрессивность некоторых изоформ СОД у линий 527, 459, 436 к окончанию закаливания снижается.

Исследуемые генотипы пшеницы значительно различаются и по реакции эстераз на условия закаливания растений. Например, у линии 462 с продолжительностью закаливания достоверно коррелирует рост экспрессивности 8 изоформ эстеразы, у линии 507 – 6, линий 508, 459 и 527 – по 4, у линии 436 – 3. При этом суммарная экспрессивность эстеразы к окончанию закаливания у всех генотипов возрастала приблизительно вдвое.

Морозостойкость исследованных рекомбинантно-инбредных линий варьирует в пределах 50 – 79%; кроме того, они различаются аллелями генов *Vrd1*, *Ppd-D1*, *Rht8*. На низкую температуру указанные линии реагируют изменениями разного количества изоформ исследованных ферментов. Различия между генотипами оказываются меньшими относительно экспрессивности пероксидазы и фенолоксидазы и большими - со стороны цитохромоксидазы и супероксиддисмутазы.

В таблице 2. представлены величины корреляции между аллельным составом исследованных локусов и экспрессивностью или величинами О–К/К (К – экспрессивность в начале опыта, О – экспрессивность в конце опыта) некоторых изоформ ферментов. Видно, что изменения экспрессивности пероксидазы или ее изоформ у исследованных линий пшеницы коррелируют исключительно с аллелем *Rht8c* гена карликовости. Больше всего корреляционных связей с довольно высокой степенью достоверности прослеживается между аллелем *Rht8c* и величинами О–К/К подавляющего количества изоформ цитохромоксидазы. С этим аллелем коррелирует также величина О–К/К общей экспрессивности двух

ферментов – пероксидазы и супероксиддисмутазы. За исключением ПО у оставшихся ферментов наблюдается 7 достоверных позитивных корреляций с двумя возможными вариантами локуса *Vrd1*.

Таблица 2. Корреляция между аллельным составом локусов и экспрессивностью форм ферментов рекомбинантно-инбредных линий Одесская 16/Безостая 1

Ген	Изоформы ферментов			
	Экспрессивность		О – К/К	
	Форма	r	Форма	r
Пероксидаза				
<i>Rht8c</i>	№5	0,87	№5	0,82
	№4	0,92	№4	0,96
	-	-	№1	0,89
	-	-	∑	0,93
Фенолоксидаза				
<i>Vrd1</i>	№2	0,81	№4	-0,82
	№4	0,92	-	-
Цитохромоксидаза				
<i>vrd1</i>	-	-	№9	0,95
<i>Ppd-D1a</i>	-	-	№9	-0,85
<i>Rht8c</i>	-	-	№9	0,84
	-	-	№8	0,85
	-	-	№6	0,88
	-	-	№5	0,97
	-	-	№4	0,94
	-	-	№3	0,91
-	-	№2	0,99	
Супероксиддисмутаза				
<i>Vrd1</i>	∑	0,92	-	-
<i>Rht8c</i>	№7	0,82	∑	0,85
Эстераза				
<i>Vrd1</i>	№11	0,86	-	-
<i>Ppd-D1a</i>	№7	-0,84	№1	-0,83

Примечание: r – коэффициент корреляции; выборка – 6 генотипов; ∑ - суммарная экспрессивность; значение вероятности P соответствует коэффициентам корреляции: 0,81 – P≤0,05; 0,88 – P≤0,02; 0,92 – P≤0,01; 0,97 – P≤0,001.

Увеличение экспрессивности одной изоформы ЦХО и двух изоформ эстеразы достоверно коррелирует с присутствием в генотипе гена *Ppd-D1a*. Установление корреляционных связей между этим локусом и экспрессивностью ферментов нам кажется целесообразным, т.к. в наборе сортов СГИ с частотой почти 80 % встречаются сорта, моногенно доминантные по гену *Ppd-D1a* [8].

Наблюдается также корреляция экспрессивности некоторых изоформ исследованных ферментов с высотой растений, величины которой приведены в табл. 1. Так, с высотой коррелируют: величина О – К/К изоформы №7 пероксидазы (r=-0,81), экспрессивность изоформы №3 супероксиддисмутазы (r=-0,89), общая экспрессивность СОД (r=-0,84), величина О – К/К изоформы №1 СОД (r=-0,96), экспрессивность изоформы №1 цитохромоксидазы (r=0,86), величина О – К/К изоформы №1 ЦХО (r=0,83), величина О – К/К изоформы №4 эстеразы (r=-0,93). Положительная корреляция выявлена только с цитохромоксидазой, с остальными ферментами она негативна.

Аллель *Rht8a* гена карликовости выявлен у линии 436, остальные исследовавшиеся линии содержат аллель *Rht8c*. Установлена позитивная корреляционная связь между аллелем *Rht8a* и морозостойкостью растений (r=0,87).

Выводы

На влияние низкой положительной температуры растения рекомбинантно-инбредных линий озимой пшеницы реагируют, как правило, увеличением экспрессивности множественных молекулярных форм исследованных ферментов. Установлены корреляционные связи между аллельным составом локусов *Vrd1*, *Ppd-D1a*, *Rht8* и изменениями экспрессивности отдельных множественных форм ферментов. Реакция экспрессивности изоформ ферментов на влияние низкой температуры есть результат взаимодействия структурных генов ферментов с определенным аллельным составом локусов *Vrd1*, *Ppd-D1a*, *Rht8*.

Литература

1. *Sakai A., Larcher W.* Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress // Springer-Verlag. Ecological Studies – 1985 – 62.
2. *Fowler D.B. et al.* The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature-induced genes in wheat and rye // TAG – 1996. - V. 93. - P. 554 – 559.
3. *Chinnusamy V., Zhy J., Zhy J.-K.* Gene regulation during cold acclimation in plants // Physiol.Plant. – 2006. – V. 126. – P. 52 - 61.
4. *Pragya Sharma* The molecular biology of the low-temperature response in plants // BioAssays. – 2005. – V. 27. – P. 1048 – 1059.
5. *Файт В.И.* Генетический анализ зимо-морозостойкости пшеницы Модель и ее реализация // Тезисы III съезда ВОГиС России “Генетика в XXI веке : современное состояние и перспективы развития”. – М., 2004. – С. 296.
6. *Полтарев Е.М.* Оценка растений озимых культур на зимо- и морозостойкость методом промораживания растений в пучках // Методы определения морозо- и зимостойкости озимых культур. – М. – 1969. – С. 16.
7. *Дьяченко Л.Ф. и др.* Множинні молекулярні форми деяких оксидоредуктаз і резистентність м'якої пшениці до фузаріозу // Вісник ОНУ. – 2001. – Т. 5, № 1. – С. 59 – 66.
8. *Файт В.И., Федорова В.Р.* Ідентифікація сортів озимої м'якої пшениці за генами фотоперіодичної чутливості // Зб. наук. праць СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса. – 2007. – Вип. 9(49). – С. 9-21.

Резюме

Досліджували електрофоретичні спектри пероксидази, супероксиддисмутази, фенолоксидази, цитохромоксидази і естераз в листках рекомбінантно-інбредних ліній F₅ Одеська 16/Безоста 1. На вплив низької позитивної температури в умовах осені рослини відповідають збільшенням експресивності значної частки форм досліджуваних ферментів. Зазначена реакція значною мірою залежить від алельного складу локусів, що вивчали.

Исследовали электрофоретические спектры пероксидазы, супероксиддисмутазы, фенолоксидазы, цитохромоксидазы и эстераз в листьях рекомбинантно-инбредных линий F₅ Одесская 16/Безостая 1. На влияние низкой температуры в условиях осени растения отвечают увеличением экспрессивности значительной части форм исследуемых ферментов. Такая реакция в значительной степени зависит от аллельного состава изучавшихся локусов.

The electrophoretic spectra of multiple molecular forms of peroxidase, superoxide desmutase, phenoloxidase, cytochromoxidase and esterase in recombanant-inbred lines F₅ Odesskay 16/Bezostay 1. During autumn vernalization in the field some isoforms of enzyme increased their expression. Such reaction of the enzymes forms depends on allelic composition of locus *Vrd*, *Ppd*, *Rht8*.

ЕГОРОВА Е.М.

Институт цитологии и генетики СО РАН