

УДК 581.1+577.34.05

И. Н. ДОМАНСКАЯ, М. С. РАДЮК, Е. А. БУДАКОВА, И. А. ДРЕМУК, Н. В. ШАЛЫГО

**СОРТОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
И АКТИВНОСТИ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРОРОСТКОВ ОЗИМОЙ
ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM*) ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ УВЛАЖНЕНИИ**

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: domanin07@mail.ru

(Поступила в редакцию 07.08.2014)

Введение. Подтопление посевов, особенно озимых хлебных злаков, приводящее к возникновению кислородной недостаточности (гипоксии), приводит к значительным потерям урожая. Многочисленные исследования, направленные на изучение подтопления, показали, что устойчивые к этому виду стресса растения обладают рядом морфолого-анатомических и физиолого-биохимических приспособлений, затрагивающих главным образом дыхательный метаболизм и энергетику клетки [1].

Установлено, что у сельскохозяйственных растений отсутствие кислорода может вызывать остановку роста, например у ячменя [2, 3]. В условиях гипоксии может происходить удлинение побегов, в то время как рост корней обычно тормозится. Такая картина наблюдается у риса [4]. При ограничении доступа кислорода к тканям у многих растений происходит утолщение и укорачивание корней, на них становится меньше корневых волосков, некоторые из них образуют при затоплении поверхностные дополнительные корни [2]. У представителей болотной флоры в тканях возникают воздухоносные полости – аэренхима. Образование аэренхимы, по которой может поступать в корни кислород, происходит благодаря активации ряда ферментов (пероксидазы, полигалактуроназы), целлюлозо-деградирующих и лизирующих клеточные стенки [4]. Деградации клеток предшествует ряд биохимических процессов, в частности накопление этилена в корнеобитаемой зоне и в корнях [5, 6], приводящее к экспрессии генов, с участием которых и происходит распад и гибель клеток. Именно этилен, концентрация которого заметно повышается при затоплении почвы и дефиците кислорода, является сигнальной молекулой – триггером последующих событий, приводящих к образованию аэренхимы [7].

Аэренхима образуется также у растений, обитающих на сухих почвах (пшенице, кукурузе, подсолнечнике, клевере), в тех случаях, когда корни испытывают дефицит кислорода при затоплении почвы [8]. Погибающие первичные корни при этом заменяются придаточными корнями. Таким образом, попытка компенсировать недостаток кислорода в среде, окружающей корни, за счет его транспорта из надземной части оказывается важным способом адаптации растений, особенно при образовании дополнительных морфологических и анатомических приспособлений. Такая стратегия избегания анаэробнобиоза растениями путем дальнего транспорта кислорода через аэренхиму называется *кажущейся толерантностью* [9, 10].

При длительной гипоксии дефицит кислорода становится настолько значительным, что растениям приходится изменять обмен веществ и приспосабливаться к функционированию в бескислородной среде, т. е. использовать метаболические приспособления [1]. Метаболическая адаптация к условиям гипоксии широко распространена в растительном мире и рассматривается как их *истинная толерантность* [9, 10]. Стратегия метаболической адаптации реализуется благодаря коренной перестройке белкового, углеводного и энергетического метаболизма растений. Эти изменения обеспечи-

вают необходимый для выживания энергетический уровень и поддержание равновесия окисления и восстановления коферментов. Сдвиги в обмене веществ у устойчивых растений включают синтез многочисленных стрессовых белков, главным образом ферментов гликолиза и брожения, таких как пируватдекарбоксилаза, энлаза, алкогольдегидрогеназа (АДГ) и др.

Цель работы – изучение влияния подтопления на морфометрические показатели проростков озимой пшеницы разных сортов, а также на общую активность АДГ и экспрессию генов, кодирующих изоформы этого фермента.

Объекты и методы исследования. Объектом исследования были листья и корни зеленых проростков озимой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) коллекционных сортов (Капылянка, Соната, Кубус, Мироновская 808, Ода, Знахідка одеська, Канвеер, Харьковская 105, Диканька, Безостая-1, Уздым, Элегія), выращенные при температуре 22 °С в режиме 10 ч темноты и 14 ч света (люминесцентные лампы ЛД-40, 130 мкМ·м⁻²·с⁻¹). Растения выращивали на водопроводной воде в специальных кюветах, имеющих отверстия для корней. Для моделирования подтопления 6-дневные проростки пшеницы заливали водой на 3 сут так, чтобы под водой были корни и половина колеоптиля (стрессовый период). Контролем служили растения, растущие без подтопления. Коллекционные сорта озимой пшеницы любезно предоставлены канд. с.-х. наук С. Н. Кулинковичем (РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию», г. Жодино).

Из морфометрических показателей определяли длину первого листа от зерновки, количество и длину всех корней, ширину листовой пластинки.

Активность АДГ и уровень экспрессии генов, кодирующих ее изоформы, определяли в корнях. Для определения активности АДГ отбирали пробы весом 0,5 г [11, 12], после чего навеску гомогенизировали при пониженной температуре в 2 мл среды выделения следующего состава: 0,05 М Трис-НСl буфер (рН 7,8), аскорбат натрия – 5 мМ, цистеин – 3 мМ, MgCl₂ (6-водный) – 1 мМ, дитиотреитол – 5 мМ. Полученный экстракт центрифугировали при 13 000 г в течение 15 мин на центрифуге с охлаждением (Sigma, Германия). Далее в опытах использовали полученный гомогенат (грубый ферментный препарат). Активность АДГ определяли спектрофотометрически по скорости образования НАДН при окислении этанола в течение 2 мин при 340 нм ($\epsilon=6,22 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [12]. Активность фермента рассчитывали в мкМ НАДН/мин на 1 мкг белка. Белок в грубом ферментном препарате определяли по методу Бредфорд [13].

Для определения уровня экспрессии генов, кодирующих изоформы АДГ, из корней проростков озимой пшеницы выделяли общую РНК с помощью реагента *TRISOL* (Sigma, США) по протоколу фирмы. Для получения кДНК на матрице РНК использовали реакцию обратной транскрипции с применением обратной транскриптазы. Реакцию проводили по стандартному протоколу фирмы с помощью набора реагентов Revert Aid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific). Расчет и дизайн праймеров проводили самостоятельно с использованием программы Vector NTI (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Нуклеотидная последовательность прямых (F) и обратных (R) праймеров

Фермент	Ген	Праймеры	Размер продукта, п. н.
АДГ, конститутивная изоформа	<i>ADH1A</i>	F-AAGATCCTCTTCACCTCCCT R-GATCCTGAGCAGATCACAC	237
АДГ, индуцибельная изоформа	<i>ADH2A</i>	F-CGCGTCAAGATCCTCTAC R-GTCACAGAGGTGCTCTCC	233

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в Институте биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. ПЦР проводили на приборе MJ Mini Cycler (Bio-Rad, США) в следующих условиях: предварительная денатурация – 95 °С, 3 мин; плавление – 94 °С, 30 с; отжиг – 55–64 °С, 45 с; элонгация – 72 °С, 45 с – 32 цикла; конечная элонгация 72 °С, 10 мин; 10 °С, 20 мин. Анализ полученных фрагментов проводили методом электрофореза в 2 %-ном агарозном геле, в ТАЕ (0,04 М Трис-ацетат, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА) буфере при постоянном напряжении 110 В в течение 35–40 мин. Количественный анализ полученных продуктов ПЦР проводили в программе TotalLab v.2.01 [14].

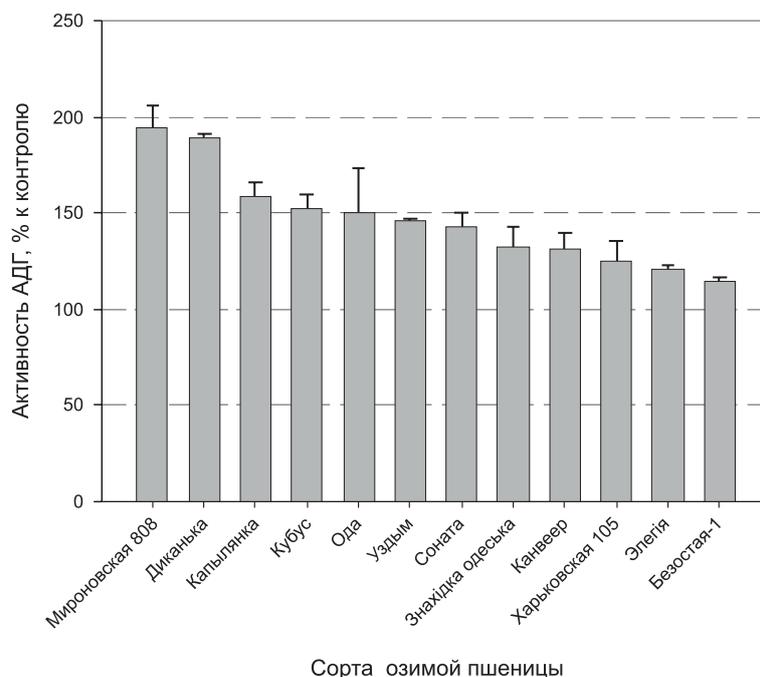
В работе представлены данные трех независимых опытов, проведенных в трехкратной биологической повторности.

Результаты и их обсуждение. Анализ роста и развития проростков озимой пшеницы показал, что подтопление приводит к ускорению роста их надземной части с одновременным замедлением роста корневой системы (табл. 2). По ответной реакции метрических характеристик проростков озимой пшеницы на данный вид стресса изученные сорта можно разделить на две группы. Для сортов Соната, Капылянка, Диканька и Уздым отмечено удлинение первого листа на 4–9 %, что сопровождается укорочением длины корней на 1–10 % по сравнению с контролем. Сорта Канвеер, Элегія, Кубус, Ода, Харьковская 105, Мироновская 808, Безостая-1 и Знахідка одеська характеризовались укорочением корней на 12–18 % с одновременным удлинением первого листа на 5–15 % по сравнению с контролем. Достоверное увеличение ширины листовой пластинки при подтоплении зарегистрировано только у растений сортов Кубус и Ода. Предполагается, что удлинение проростков в условиях подтопления связано с формированием аэренхимы, через которую кислород транспортируется в корни. Хорошо развитая аэренхима компенсирует недостаток кислорода в корнях, и угнетения их роста не происходит или сводится к минимуму. Как указывалось выше, такая стратегия избегания анаэробнозостра растений путем дальнего транспорта кислорода через аэренхиму описана в литературе как *кажущаяся толерантность* [9, 10]. Следует отметить, что закономерность «чем длиннее в условиях стресса лист, тем короче корневая система» в условиях нашего эксперимента проявлялась не всегда. В частности, при одной и той же степени удлинения листа наблюдалась разная степень угнетения корневой системы (сорта Капылянка, Мироновская 808), а в условиях примерно одинаковой степени ингибирования длины корней отмечалась разная степень удлинения надземной части проростков (сорта Канвеер, Элегія).

Т а б л и ц а 2. Влияние избыточного трехсуточного подтопления (оводнения) на морфометрические показатели проростков пшеницы разных сортов

Сорт озимой пшеницы	Длина 1-го листа от зерновки, см		Средняя длина корней, см		Ширина листовой пластинки, см	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Капылянка	15,2±0,4	15,7±0,5	10,6±0,5	9,6±0,7	0,34±0,01	0,34±0,01
Соната	14,9±0,3	16,3±0,3	8,1±0,30	8,0±0,3	0,33±0,01	0,34±0,01
Кубус	11,8±0,2	12,6±0,3	11,±0,32	9,8±0,3	0,40±0,01	0,42±0,01
Мироновская 808	13,6±0,5	14,5±0,4	8,8±0,4	7,3±0,3	0,35±0,01	0,36±0,01
Ода	9,9±0,2	11,1±0,2	12,9±0,3	11,2±0,3	0,38±0,01	0,41±0,01
Знахідка одеська	12,2±0,4	13,1±0,4	13,95±0,6	11,5±0,5	0,34±0,01	0,34±0,01
Канвеер	10,1±0,3	11,6±0,2	10,9±0,4	9,7±0,4	0,40±0,01	0,42±0,01
Харьковская 105	13,2±0,8	14,3±0,9	10,2±0,2	8,7±0,5	0,31±0,01	0,31±0,01
Диканька	14,8±0,3	15,5±0,3	8,7±0,4	7,9±0,24	0,31±0,01	0,31±0,02
Безостая-1	14,4±0,2	15,8±0,2	9,65±0,80	8,1±0,4	0,31±0,01	0,31±0,02
Уздым	13,0±0,4	13,8±0,4	10,8±0,5	9,5±0,4	0,34±0,01	0,34±0,01
Элегія	13,2±0,4	14,2±0,6	11,5±0,2	10,1±0,7	0,34±0,01	0,34±0,01

Для выявления особенностей влияния подтопления на метаболические процессы в корнях проростков озимой пшеницы определяли активность АДГ. Установлено, что во всех исследованных сортах активность АДГ после трехсуточного подтопления была выше, чем активность фермента в корнях контрольных проростков этого же сорта (см. рисунок). Для сортов Диканька, Капылянка и Мироновская 808 активность АДГ возрастала на 60–94 % по сравнению с контролем. Большая группа сортов (Кубус, Ода, Уздым, Соната, Знахідка одеська и Канвеер) показала увеличение активности АДГ на 30–50 % относительно контроля. Среди изученных сортов выявлен один сорт озимой пшеницы (Безостая-1), в котором зарегистрировано наименьшее увеличение активности АДГ (на 15 % по отношению к контролю). Как известно, синтез стрессовых (аноксических) белков, главным образом ферментов гликолиза и АДГ, рассматривается также как признак *истинной устойчивости* растений к подтоплению [9, 10]. Следовательно, сорта озимой пшеницы, обладаю-



Активность алкогольдегидрогеназы в корнях разных сортов озимой пшеницы через 3 сут подтопления относительно своего контроля

щие наибольшей активностью АДГ при подтоплении, будут более устойчивыми к данному виду стресса. Такими сортами могут быть Мирановская 808, Диканька, Капылянка, Кубус и Ода.

Известно, что АДГ имеет несколько изоформ: одну конститутивную и две индуцибельные, которые кодируются генами *ADH1A*, *ADH2A* и *ADH3A* соответственно [15, 16]. В настоящей работе нами изучен уровень экспрессии генов *ADH1A* и *ADH2A* в корнях двух сортов озимой пшеницы, существенно различающихся по активности АДГ, – Мирановская 808 и Элегія. Установлено, что уровень экспрессии гена *ADH1A* в корнях проростков озимой пшеницы сорта Мирановская 808 в условиях стресса составляет $139 \pm 7\%$ по отношению к контролю, а для корней сорта Элегія этот показатель равен $104 \pm 9\%$. В корнях проростков сорта Мирановская 808 уровень экспрессии гена *ADH2A* увеличивается до $133 \pm 23\%$, а у сорта Элегія, напротив, снижается до $94 \pm 10\%$ по сравнению с контролем, что согласуется с полученными данными об общей активности АДГ при подтоплении (см. рисунок).

Заключение. Установлено, что подтопление в течение 3 сут 6-дневных проростков озимой пшеницы разных сортов, как правило, приводит к удлинению первого листа, что сопровождается замедлением роста корневой системы. Полученные результаты указывают на наличие кажущейся устойчивости проростков озимой пшеницы к данному виду стресса. Показано, что в условиях подтопления в корнях проростков сортоспецифически увеличивается активность ключевого фермента гликолиза (АДГ) за счет возрастания уровня экспрессии как ее конститутивной, так и индуцибельной изоформы. Высказывается предположение, что общая активность АДГ и уровень экспрессии генов, кодирующих ее отдельные изоформы, могут быть использованы для выявления сортообразцов озимой пшеницы с повышенной метаболической (истинной) устойчивостью к подтоплению.

Литература

1. Чиркова Т. В. Пути адаптации растений к гипоксии и аноксии. Л., 1988.
2. Чиркова Т. В. Физиологические основы устойчивости растений. СПб., 2002.
3. Шальго Н. В., Доманская И. Н., Радюк М. С. и др. // Физиол. растен. 2012. Т. 59, № 6. С. 746–755.

4. Drew M. C. // Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1997. Vol. 48. P. 223–250.
5. Jackson M. B., Drew M. C. // Flooding and Plant Growth / Ed. T. T. Kozlowski. New York: Academic, 1984. P. 47–163.
6. Watkin E. L. J., Thomson C. J., Greenway H. // Ann. Bot. 1998. Vol. 81. P. 349–354.
7. Brailsford R. W., Voeselek L. A. C. J., Blom C. W. P. M. et al. // Plant Cell Environ. 1993. Vol. 16. P. 1071–1080.
8. Jackson M. B., Armstrong W. // Plant Biol. 1999. Vol. 1. P. 274–287.
9. Вартапетян Б. Б. // Вестн. РФФИ. 2007. №5. С. 28–57.
10. Вартапетян Б. Б. // Физиол. растен. 2006. Т. 53, №6. С. 805–836.
11. Астафурова Т. П., Войцековская С. А., Верхотурова Г. С. // Вестн. Томского гос. ун-та. Биология. 2007. №1. С. 67–74.
12. Методы биохимического анализа растений / Под ред. В. В. Полевого, Г. Б. Максимова. Л., 1978.
13. Bradford M. // Analyt. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
14. Технология ДНК-типирования генов устойчивости ячменя к засухе: метод. указания. Минск, 2011.
15. Harberd N. P., Edwards K. J. R. // Gen. Res. 1983. Vol. 41. P. 109–116.
16. Hanson A. L., Brawn A. D. H. // Biochem. Gen. 1984. Vol. 22. P. 495–515.

I. N. DOMANSKAJA, M. C. RADYUK, E. A. BUDAKOVA, I. A. DREMUК, N. V. SHALYGO

VARIETAL PARTICULARITY OF MORPHOMETRIC PARAMETERS AND ACTIVITY OF ALCOHOL DEHYDROGENASE OF WINTER WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM*) SEEDLINGS DURING WATERLOGGING

Summary

It is shown that the waterlogging of seedlings of different winter wheat varieties in model conditions usually leads to a lengthening of the first leaf, which is accompanied by slower growth of the roots and which indicates the apparent tolerance of seedlings to such stress. During waterlogging the activity of alcohol dehydrogenase in the roots of seedlings increases in variety-specific manner by increasing the expression level of its both constitutive and inducible isoforms. It is suggested that the total activity of alcohol dehydrogenase and the expression level of genes encoding some of its isoforms, can be used to identify cultivars of winter wheat possessing high true tolerance to waterlogging.