

6. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA / Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. // Plant J. – 1994. – V. 6. – P. 271-282.
7. Jefferson R.A., Bevan M.W., Kavanagh T.A. The use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase as a gene fusion marker for studies of gene expression in higher plants // Biochem. Soc. Trans. – 1987. – V. 15. – P. 17-18.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – P. 473-479.
9. Comparison of GFP and GUS reporter genes / Murray F., Brettell R., Matthews P., Bishop D., Jacobsen J. // Plant Cell Rep. – 2004. – V. 22. – P. 397-402.
10. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice / Peng J.Y., Wen F.J., Lister R.K., Hodges T.K. // Plant Mol. Biol. – 1995. – V. 27. – P. 91 - 104.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, second ed. – Cold Spring Harbor Laboratory Press. – Cold Spring Harbor: NY, 1989. – 1659 p.
12. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression / Santarem E.R., Trick H.N., Essig J.S., Finer J.J. // Plant Cell Rep. – 1998. – V. 17. – P. 752-759.
13. Shrawat A.K., Becker D., Lorz H. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Sci. – 2007. – V. 172. – P. 281-290.
14. Tang W. Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens* mediated loblolly pine transformation // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 555-562.
15. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation / Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. // Plant J. – 1997. – V. 11. – P. 1369-1376.
16. Trick H.N., Finer J.J. SAAT: sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation // Transgenic Res. – 1997. – V. 6. – P. 29-36.
17. *Agrobacterium*-mediated stable transformation of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare*) / Wu H., McCormac A.C., Elliott M.C. Chen D.-F. // Plant Cell Tis. Org. Cult. – 1998. – V. 54. – P. 161-171.

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ ПЕРОКСИДАЗЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ СОИ

Л.Ф. ДЬЯЧЕНКО, кандидат биологических наук;

В.Н. ТОЦКИЙ, доктор биологических наук;

В.А. ТОПТИКОВ, кандидат биологических наук

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова

В.И. СИЧКАРЬ, доктор биологических наук

Селекционно-генетический институт УААН, Одесса

Введение

Наряду с каталазой и супероксиддисмутазой пероксидаза (ПО) входит в ферментативную антиоксидантную систему растений и обладает способностью реагировать на любые воздействия внешней среды изменениями наборов изозимов и/или экспрессивности отдельных изоформ этого фермента [1, 2, 7]. Не исключено, что на разных стадиях развития растений адаптивная роль отдельных изоформ ПО не одинакова, однако убедительных доказательств дифференцированной экспрессии генов пероксидазы в онтогенезе многих растений, в частности сои, мы не нашли. В связи с этим цель настоящей работы состояла в изучении экспрессивности отдельных изоформ пероксидазы на разных стадиях развития растений сои, отличающихся

продолжительностью периода вегетации. Последняя в значительной степени детерминируется серией аллелей генов фотопериодизма [8]. Таким образом, результаты работы содержат новую информацию не только о функциональном состоянии изоформ ПО на разных стадиях развития растений, но и о взаимодействии генов ПО с генами, контролирующими продолжительность вегетации сои.

Объекты и методы исследования

Материалом служили 20 сортов сои, из которых 9 условно обозначили как «скороспелье» (Устя, Медея, Юг-30, Диона, Л-2 (Орел), Валентина, Блискавица, Аннушка, Спринт – период вегетации 85-95 дней), а 11 – «раннеспелье» (Аметист, Елена, Марьяна, Селекта, Киевская 98, Припять, Рось, Романтика, Степовичка, Ксения, Георгина) – продолжительность вегетации 95-110 дней.

Листья для экстракции ПО отбирали на трех стадиях развития растений: I – появление первого тройчатого листа, II – начало цветения, III – начало созревания бобов. Для исключения влияния фактора старения листа для анализа фермента отбирали самый последний развернутый лист. Экстрагирование, разделение в полиакриламидном геле и визуализацию ПО проводили по ранее описанным методикам [5]. Анализ электрофореграмм проводили по компьютерной программе АнаИС, с помощью которой для каждой изоформы определяли площадь и интенсивность окрашивания соответствующих полос в условных единицах. Статистическую обработку данных проводили в Excel.

Результаты и обсуждение

Электрофоретическое разделение ПО показало, что количество изоформ фермента в листьях варьирует в зависимости от стадии развития растений. Наименьшее количество наблюдали в начале цветения (15 изоформ), наибольшее – в начале созревания бобов (18 изоформ).

В начале цветения растений (стадия II) в листьях сои определяется 15 изоформ пероксидазы разной экспрессивности и относительной подвижности. Относительная подвижность форм фермента колеблется в достаточно широком диапазоне Rf – от 0,05 до 0,77. Самой высокой экспрессивностью (определяли по интенсивности окрашивания полос на электрофореграммах) характеризовались малоподвижные изоформы № 14, № 13, № 11 и среднеподвижная изоформа № 6.

Экспрессивность формы № 6 сильно варьирует у разных сортов сои. Она выражена сильнее в листьях растений сортов Медея, Марьяна, Валентина, Селекта, Георгина, чем в листьях растений других сортов. В листьях лишь одного сорта – Юг-30 – наблюдается высокая экспрессивность изоформы № 3.

На более ранней стадии развития растений (первый тройчатый лист) ПО представлена 16 молекулярными формами, т.е. на одну изоформу больше, чем в начале цветения (ее обозначили как № 8а). Наличием /отсутствием именно этой изоформы пероксидазы отличаются листья растений двух указанных этапов развития. По сравнению с другими изоформами ПО более высокая экспрессивность свойственна изоформам № 14 (особенно у сортов Устя и Медея), № 13 (у сорта Степовичка), № 6 (примерно у половины исследованных сортов), № 2 (сорта Юг-30, Елена, Марьяна, Валентина, Аннушка, Спринт, Степовичка, Георгина).

В начале созревания бобов (стадия III) количество изоформ фермента составляет 18 (рис. 1). По сравнению со стадией II на стадии III наблюдаются изоформы № 5а, № 8а и № 9а. Из перечисленных форм ПО изоформа № 8а выявлена в листьях на ранней стадии онтогенеза сои, на II стадии ее экспрессивность резко снижается и практически не выявляется, а на стадии III экспрессивность этой формы снова увеличивается. Изоформы

№ 5а и № 9а свойственны листвам только поздней (III) стадии онтогенеза растений сои. На электрофорограмме интенсивнее других, кроме полос № 15-12, окрашиваются полосы № 4, 2, 1. Две последние изоформы заметно слабее экспрессируются в листвах растений на предыдущих, более ранних, стадиях развития сои.

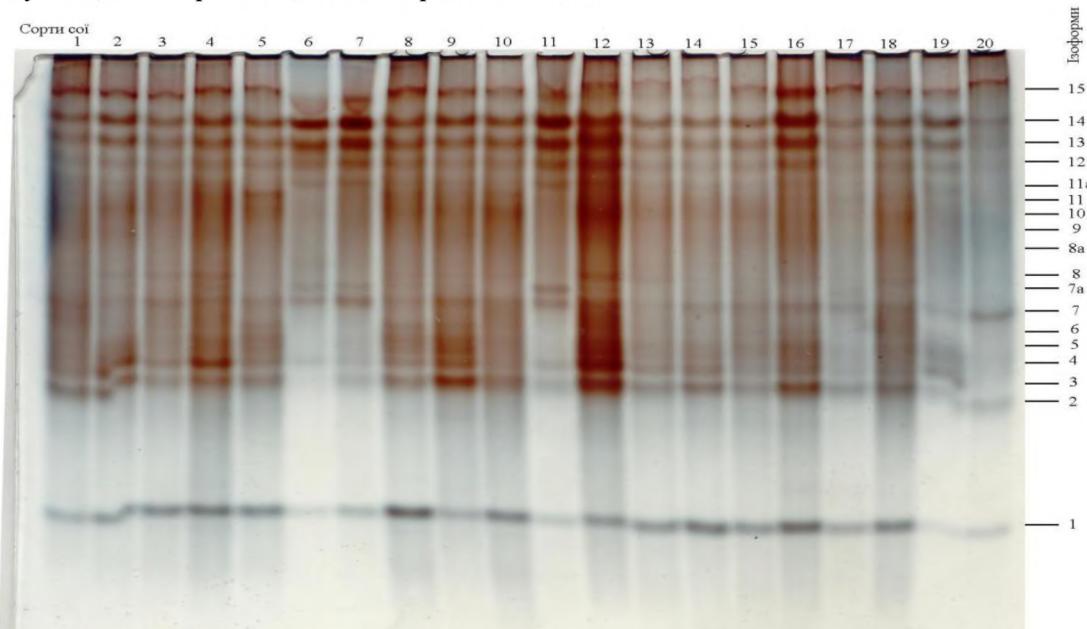


Рис. 1. Множественные молекулярные формы пероксидазы исследуемых сортов сои при анализе листьев на стадии III:

- 1 – Устя, 2 – Медея, 3 – Юг-30, 4 – Диона, 5 – Л-2 (Орел), 6 – Аметист, 7 – Елена,
- 8 – Марьяна, 9 – Валентина, 10 – Блискавица, 11 – Селекта, 12 – Киевская 98,
- 13 – Припять, 14 – Рось, 15 – Аннушка, 16 – Спринт, 17 – Романтика,
- 18 – Степовичка, 19 – Ксения, 20 – Георгина

В табл. 1 представлены величины экспрессивности изоформ пероксидазы в условных единицах (средние по 20 сортам сои). Видно, что преобладающее количество форм ПО выявляется на всех трех этапах онтогенеза сои. Всего таких форм 15, изоформа ПО № 8а является общей для листьев на этапах I и III, а формы № 5а и 9а выявляются только на III этапе развития сои. В табл. 1 отмечены формы, экспрессивность которых в листвах сои на II и III стадиях развития достоверно изменяется по сравнению с I стадией. На стадии начала цветения по сравнению со стадией первого тройчатого листа таких изоформ фермента пять.

У трех из них (№ 3, 12, 13) экспрессивность на этапе II, у двух (№ 6, 10) – увеличивается на 16 и 48%.

Экспрессивность пероксидазы листьев сои на стадии созревания бобов наиболее существенно отличается от ее экспрессивности в листвах, собранных на двух более ранних стадиях развития растений. Достоверные количественные изменения экспрессивности на этапе III по сравнению с этапом I наблюдаются у семи форм фермента: у трех из них она снижается (снижение колеблется в пределах 25-43%), у четырех – возрастает (в пределах 19-25%). Сравнительно с этапом II на этапе III достоверно изменяется экспрессивность восьми форм. В результате указанных изменений общая экспрессивность пероксидазы листьев в период созревания бобов на 17% выше этого показателя в период цветения ($P \leq 0.05$).

Таблица 1

Экспрессивность пероксидазы листьев на разных этапах развития растений сои

№ изоформы	I стадия	II стадия	III стадия
1	19,41 ± 0,88	20,59 ± 0,64	24,37**^ ± 1,2
2	27,56 ± 1,53	30,16 ± 1,41	34,66**^^ ± 2,55
3	25,16 ± 1,09	19,6** ± 0,92	25,36 ^± 2,26
4	25,67 ± 1,26	23,86 ± 1,08	19,66**^ ± 1,65
5	25,07 ± 1,07	23,61 ± 0,69	20,25**^ ± 1,51
5a	0	0	22,64 ± 1,62
6	34,29 ± 1,34	39,75* ± 1,63	26,37** ± 1,07
7	25,6 ± 1,22	25,2 ± 0,97	18,9 ± 0,93
8	27,86 ± 1,04	29,8 ± 1,13	22,44 ± 1,07
8a	28,93 ± 0,93	0	26,23 ± 0,91
9	31,92 ± 0,97	33,13 ± 1,15	33,06 ± 1,53
9a	0	0	33,16 ± 2,16
10	23,96 ± 1,04	35,63** ± 1,19	24,46 ± 1,21
11	30,93 ± 1,3	31,86 ± 1,13	23,05**^^ ± 1,43
12	28,51 ± 0,85	25,46* ± 1,08	29,43 ± 1,72
13	36,64 ± 1,08	29,18** ± 1,3	37,91^ ± 2,82
14	48,68 ± 2,39	43,0 ± 2,34	44,81 ± 2,36
15	32,09 ± 1,54	29,1 ± 1,71	45,93**^^ ± 2,31
Σ	472,31 ± 13,31	439,93 ± 12,78	515,7^ ± 22,18

Примечание: n = 20 сортов, * - P ≤ 0,05, ** - P ≤ 0,005 при сравнении с такой же изоформой на I стадии, ^ - P ≤ 0,05, ^^ - P ≤ 0,005 при сравнении с такой же изоформой на II стадии, Σ - суммарная экспрессивность ПО

В табл. 2 представлены величины экспрессивности изоформ ПО листьев двух групп сортов сои, отличающихся длительностью периода вегетации приблизительно на 10 дней. Эти группы сортов сои практически не отличаются экспрессивностью ПО на стадии первого тройчатого листа (I стадия не показана). В начале цветения растений (II стадия) экспрессивность изоформы № 7 в группе «скороспелых» сортов достоверно отличается от экспрессивности аналогичной изоформы ПО в группе «раннеспелых», различие составляет 16% в пользу последних.

В начале созревания бобов (стадия III) указанных двух групп сортов сои достоверное различие экспрессивности наблюдается уже не у одной, а у трех изоформ ПО. Это форма № 5a, у которой достоверное снижение экспрессивности у «раннеспелых» сортов составляет 23%, формы № 6 и 1 – уменьшение на 14 и 19% соответственно. Таким образом, различия между «скороспелыми» и «раннеспелыми» группами исследованных сортов сои наблюдаются лишь на поздних стадиях развития растений.

Представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что в процессе онтогенеза растений сои происходит постоянное перераспределение экспрессивности ПО между отдельными множественными молекулярными формами. В целом в течение исследуемого периода развития растений сои достоверные изменения экспрессивности на том или ином этапе наблюдались у 11 изоформ фермента. Таким образом, только у части изоформ ПО экспрессия поддерживается на одном стабильном уровне, тогда как экспрессивность большей части изоформ в процессе онтогенеза находится в динамическом состоянии. Полученные данные вполне согласуются как с данными

литературы [4], так и с результатами, полученными нами при исследовании влияния различных стрессовых условий на динамику изоформ пероксидазы пшеницы [3, 6].

Таблица 2

Экспрессивность изоформ пероксидазы листьев растений сортов сои с разным вегетационным периодом

№ изоформы	II стадия		III стадия	
	Длительность вегетации (дни)			
	85-95	95-110	85-95	95-110
1	20,72 ± 1,04	20,48 ± 0,84	27,22 ± 1,38	22,03* ± 1,6
2	29,19 ± 1,43	30,95 ± 2,31	42,55 ± 2,65	33,65 ± 3,8
3	19,99 ± 1,61	19,27 ± 1,09	28,62 ± 2,08	22,7 ± 3,64
4	23,72 ± 1,39	23,98 ± 1,65	21,12 ± 1,12	18,47 ± 2,89
5	22,98 ± 1,0	24,13 ± 0,96	23,1 ± 1,37	17,92 ± 2,34
5a	0	0	25,89 ± 1,3	19,98* ± 2,53
6	40,9 ± 2,83	38,82 ± 1,93	28,62 ± 1,03	24,53* ± 1,59
7	23,14 ± 0,76	26,89* ± 1,5	19,98 ± 1,01	18,02 ± 1,46
8	28,42 ± 1,29	30,93 ± 1,74	23,17 ± 1,02	21,85 ± 1,79
8a	0	0	28,03 ± 1,49	24,75 ± 0,96
9	31,41 ± 1,0	34,54 ± 1,86	35,55 ± 1,92	31,02 ± 2,17
9a	0	0	35,58 ± 1,73	31,18 ± 3,64
10	33,29 ± 1,88	37,54 ± 1,34	25,28 ± 1,18	23,79 ± 2,01
11	31,11 ± 1,98	32,48 ± 1,33	21,48 ± 1,2	24,33 ± 2,4
12	24,06 ± 1,26	26,61 ± 1,64	27,7 ± 1,67	30,85 ± 2,81
13	28,37 ± 1,68	29,84 ± 1,98	35,69 ± 2,3	39,73 ± 4,82
14	41,65 ± 3,95	44,1 ± 2,89	41,08 ± 1,73	47,87 ± 3,9
15	28,6 ± 1,25	29,52 ± 2,8	47,07 ± 1,95	44,99 ± 3,97
Σ	427,54 ± 14,69	450,07 ± 20,0	537,73 ± 19,62	497,67 ± 37,1

Примечание: * - Р ≤ 0,05 при сравнении «скороспелых» (85-95 дней) и «раннеспелых» (95-110 дней)

Выводы

1. Электрофоретические спектры пероксидазы тканей листьев сои представлены 15-18 изоформами разной подвижности и экспрессивности.
2. Наиболее заметные изменения экспрессивности пероксидазы наблюдаются в тканях листьев сои в начале стадии созревания бобов по сравнению с более ранними стадиями развития.
3. Экспрессивность значительной части изоформ пероксидазы динамично изменяется в зависимости от этапа онтогенеза растений сои.
4. Сорта сои с периодом вегетации 85-95 дней достоверно отличаются от сортов с периодом вегетации 95-110 дней экспрессивностью одной изоформы ПО на стадии II и трех изоформ фермента на стадии III.

Список литературы

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. – М.: Наука, 1988. – 128 с.
2. Воронков Л.А., Живописцева И.В. Изучение катализических свойств

пероксидазы хлоропластов // Физиология и биохимия здорового и больного растения. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – С. 305-311.

3. Множинні форми деяких ферментів у тканинах рослин озимої пшениці з контрастною стійкістю до бурої листової іржі / Дьяченко Л.Ф., Тоцький В.М., Топтіков В.А., Бабаянц Л.Т. // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: ЛОГОС, 2007. – Т. 1. – С. 23-27.

4. Легкобит М.П., Хадеева Н.В. Изоферментные спектры кислых пероксидаз у представителей рода *Stachys* // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 7. – С. 930-934.

5. Сафонов В.И., Сафонова М.Р. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в поликариламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений. – М.: Наука, 1971. – 113 с.

6. Сопряженность устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe и множественных молекулярных форм некоторых ферментов / Топтиков В.А., Мирось С.Л., Дьяченко Л.Ф., Тоцкий В.Н., Залогина М.А. // Цитология и генетика. – 2002. – Т. 36, № 3. – С. 3-11.

7. Хуссейн И.А., Кошиева Е.З., Хадеева Н.В. Изменение спектров пероксидаз у регенерантов *Stachys sieboldii* в результате гормональных и мутагенных воздействий // Генетика. – 2000. – Т. 36, № 8. – С. 1093-1099.

8. Cober E.R., Madill J., Voldeng H.D. Early tall determinate soybean genotype E1E1e3e3e4e4dt1dt1 sets high bottom pods // Can. J. Plant Sci. – 2000. – V. 80, N 3. – P. 527-531.

ИЗУЧЕНИЕ ВНУТРИВИДОВОГО И МЕЖВИДОВОГО КОНСЕРВАТИЗМА ЛОКУСОВ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ (SSR)

А.В. ЗЛАЦКАЯ, кандидат биологических наук;

Ю.В. ШИТИКОВА; Л.В. КОРОЛЬ

Украинский институт экспертизы сортов растений, Киев

Введение

Локусы микросателлитных (SSR) последовательностей ДНК растений в настоящее время занимают одну из ключевых позиций в исследовании их геномов, картировании и маркировании локусов хозяйственно ценных признаков, идентификации интрогрессии чужеродного генетического материала переданного от вида-донора в геном видареципиента и изучении организации определенных регионов растительного генома. Ценность локусов SSR для исследований заключается в том, что они относительно равномерно распространены по всему геному растения, а также для большинства культурных растений, в том числе мягкой пшеницы, созданы генетические карты сцепления SSR [13]. В последнее время значительный интерес представляют работы по исследованию организации геномов культурных растений, изучение богатых генами регионов [11], коллинеарность порядка расположения генов при межвидовых сравнениях в пределах родов, порядков и классов [4], а также выявлении консервативных локусов. Последнему направлению способствовала серия работ по сравнению расположения локусов EST у мягкой пшеницы и арабидопсиса, мягкой пшеницы и риса [10].

Кроме теоретической ценности данные работы позволяют решить и ряд прикладных задач. Например, микросателлитные маркеры, идентифицированные в геноме мягкой пшеницы, использовали в исследованиях близкородственных видов семейства *Triticeae* (<http://wheat.pw.usda.gov>), что дало возможность увеличить число