

FIZIOLOGIA ȘI BIOCHIMIA PLANTELOR**ЭФФЕКТЫ ГЕНОВ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ (*PPD* И *EE*) И ПОТРЕБНОСТИ В ЯРОВИЗАЦИИ (*VRN*) НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ У РАСТЕНИЙ**

**Жмурко В.В., Авксентьева О.А., Зубрич А.И., Юхно Ю.Ю., Петренко В.А.,
Попова Ю.В., Самойлов А.М., Хань Бин**

Кафедра физиологии и биохимии растений, Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина

Введение

Идентификация генов фотопериодической чувствительности (*PPD*) у пшеницы, ячменя, риса, [14] генов *EE* сои [13, 18], генов потребности в яровизации (*VRN*) у пшеницы, ячменя и арабидопсиса [11, 15, 16, 17, 20] обусловила интенсивные исследования механизмов их экспрессии. Выявлен ряд ее закономерностей в условиях разного фотопериода и при яровизации, на основании которых предложены схемы регуляторных эффектов генов на переход фотопериодически чувствительных видов и озимых форм растений к цветению [14, 17, 20]. Исследуются также фенотипическое проявление этих генов на хозяйственные признаки пшеницы [11] и сои [18].

Однако в литературе практически отсутствуют данные об изучении возможной роли генов *PPD* и *VRN* пшеницы, а также генов *EE* сои в детерминации физиолого-биохимических процессов. Вместе с тем такие данные важны для углубления представлений о физиологических и биохимических механизмах генетического контроля роста и развития растений [2]. Целью наших исследований было изучение возможного участия генов *PPD*, *VRN* и *EE* в детерминации углеводного и азотного обмена, фитогормонального статуса, биологической фиксации азота *in vivo*, а также каллюсо- и морфогенеза пшеницы и сои *in vitro*.

Материалы и методы

В качестве объектов использовали почти изогенные по генам *PPD* и *VRN* моногеннодоминантные линии пшеницы, созданные в генофонах сортов Мироновская 808 и Ольвия [8], а также изогенные по генам *EE* линии сои, созданные в генофоне сорта Clark [13]. Линии различаются по состоянию отдельных локусов генов - доминантному и/или рецессивному, что определяет различия между ними по скорости перехода в генеративное состояние.

Растения изогенных по генам *PPD* и *VRN* линий пшеницы, а также изогенные по генам *EE* линии сои выращивали на экспериментальном участке кафедры при оптимальных сроках сева в условиях естественного длинного дня (16 часов на широте Харькова) и на искусственном коротком дне (9 часов). Его создавали, затемняя растения светонепроницаемыми кабинами с 18 до 9 часов. Вегетационные опыты проводили в факторостатной камере кафедры. Растения

выращивали в почвенной культуре при освещенности на уровне верхних листьев 18-20 кЛк, температуре 18-22/14-16°C (день/ночь) и фотопериодах 16 и 9 часов. В полевых и вегетационных опытах для биохимических анализов использовали полностью сформировавшиеся листья. В них определяли суточную динамику содержания разных форм углеводов, общего, белкового, нитратного и аминного азота, активность оксидоредуктаз, амилазы, инвертазы и нитратредуктазы [6], а также активность и соотношение фитогормонов – ГК, ЦК, ИУК и АБК (фитогормональный статус).

В опытах *in vitro* экспланты изогенных по генам *PPD*, *VRN* линий пшеницы и по генам *EE* линий сои культивировали на стандартной среде МС с варьированием по содержанию фитогормонов. Использовали экспланты листьев, меристематические зоны корней и зародыши. Оценивали интенсивность каллюсогенеза и морфогенетический потенциал линий, цитологические показатели каллюсной культуры, а также биосинтез белка.

В опытах по изучению генетической предетерминации процесса азотфиксации определяли интенсивность формирования симбиотического аппарата у линий сои, а также ассоциативного аппарата фиксации азота у линий пшеницы. Нитрогеназную активность определяли ацетиленовым методом [7].

Исследования проведены на кафедре физиологии и биохимии растений Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина в течение 2005 - 2010 гг.

Результаты и обсуждение

Эффекты генов *PPD*, *VRN* и *EE* на рост и развитие изогенных линий. Результаты (табл.1) показали, что в условиях короткого дня изогенные по генам *PPD* линии пшеницы, независимо от состояния отдельных их локусов (доминантное и/или рецессивное), замедляли переход к колошению.

Однако в этих условиях линия с доминантным локусом *PPDB1a* колосилась на 20-22 дня позже, чем линии с доминантными локусами *PPD D1a* и *PPD A1a*. При этом у *PPD B1a* линии вегетативная масса и число побегов кущения были существенно больше, но переход к 3-4 этапам органогенеза наступал на 10-12 дней позже, чем у *PPD D1a* и *PPD A1a* линий [1]. Изогенные линии сои с локусами *E1E2E3* и *E1e2e3* на коротком фотопериоде зацветали на 10-15 дней раньше, чем в условиях длинного дня (короткодневные), а линии с локусами *e1e2e3*, *e1E2e3* и *e1e2E3* цвели одновременно на обоих фотопериодах (нейтральные). Короткий день у всех исследованных линий сои существенно замедлял формирование вегетативной массы и листьев [10].

Изогенные по генам *VRN* линии пшеницы существенно различались по срокам перехода к колошению при весеннем севе – на длинном дне линия с доминантным локусом *VRN B1a* на 18-20 суток колосилась позже, чем линии с доминантными локусами *VRN A1a* и *VRN D1a*. Короткий день в наибольшей мере тормозил развитие линии *VRN B1a*. При этом у медленно развивающейся линии формировалась большая вегетативная масса, чем у быстроразвивающихся линий [3]. Таким образом, исследованные линии существенно различались по характеру ростовых процессов и темпам развития в зависимости от доминантного и/или рецессивного состояния отдельных локусов генов *PPD*, *VRN* и *EE*.

Таблица 1. Развитие изогенных по генам фотопериодической чувствительности и потребности в ярковизации изогенных линий пшеницы и сои при разном фотопериоде.

Культура, сорт-генофон линии	Генотип линии	Дней от всходов до колошения (пшеница), цветения (соя), при фотопериоде	
		16-часовом	9-часовом
Пшеница, сорт Мироновская 808	PPD D1a	130 ±3	147 ±3
	PPD B1a	134 ±2	153 ±3
	PPD A1a	125 ±3	139 ±4
Пшеница, сорт Мироновская 808	VRN A1a	63 ±2	70 ±2
	VRN B1a	80 ±4	93 ±5
	VRN D1a	62 ±2	66 ±2
Соя, сорт Clark	E1E2E3*	55 ±2	43 ±1
	e1e2e3**	46 ±1	44 ±1

Примечание – здесь и далее: * – короткодневные и ** – фотопериодически нейтральные линии сои.

Эффекты генов PPD, VRN и EE на метаболические процессы. Изучение суточной динамики содержания разных форм углеводов в листьях изогенных по генам PPD линий пшеницы показало, (табл.2) что под влиянием короткого дня их накопление снижалось у всех исследованных линий. Однако у линии PPD B1a, которая замедленно развивается в этих условиях, углеводов накапливалось и оттекало меньше, чем у быстроразвивающихся линий PPD D1a и PPD A1a. Активность амилаз и инвертазы в листьях линии с доминантным локусом PPD B1a на коротком дне была выше, чем у линий с доминантными локусами PPD D1a и PPD A1a [1].

Таблица 2. Накопление и отток олигосахаров в листьях изогенных по генам PPD линий пшеницы сорта Мироновская 808 при разном фотопериоде, мг/г сухой массы.

Генотип линии	Дневное накопление		Ночной отток	
	Фотопериод, часы			
	16	9	16	9
PPD D1a	49,8 ±0,6	30,4 ±0,8	44,5 ±0,9	29,9 ±0,3
PPD B1a	37,7 ±0,7	29,0 ±0,5	31,7 ±0,7	22,7 ±0,1
PPD A1a	59,4 ±1,1	25,2 ±0,5	38,8 ±1,0	22,8 ±0,1

Таблица 3. Интенсивность накопления водорастворимых углеводов в листьях изогенных по генам VRN линий пшеницы сорта Мироновская 808, мг/г сухой массы в час.

Генотип линии	Интенсивность накопления		
	Моносахара	Олигосахара	Сумма сахаров
VRN A1a	0,87	3,64	4,51
VRN B1a	3,97	9,56	13,52
VRN D1a	1,01	6,74	7,76

В листьях линии пшеницы с доминантным локусом VRN B1a, которая развивается медленно, разных форм углеводов накапливалось больше, чем у

быстроразвивающихся линий с доминантными локусами *VRN A1a* и *VRN D1a* (табл.3). Больше накопление углеводов у этой линии связано, возможно, с менее интенсивным их оттоком, чем у линий *VRN A1a* и *VRN D1a*.

Изучение активности пероксидазы, полифенолоксидазы и β-ИУКоксидазы у *VRN* линий показало, что у медленно развивающейся линии с доминантным локусом *VRN B1a* она была ниже, чем у быстроразвивающихся линий *VRN A1a* и *VRN D1a* (табл.4). Медленно развивающаяся линия накапливала в листьях больше общего, но меньше аминного азота, чем быстро развивающиеся линии [4].

Таблица 4. Активность оксидоредуктаз в листьях изогенных по генам *VRN* линий пшеницы сорта Мироновская 808.

Генотип линии	Активность ферментов, Е в сек./г сырой массы		
	Пероксидаза	Полифенолоксидаза	β-ИУКоксидаза
<i>VRN A1a</i>	25,6 ± 0,2	14,1 ± 0,2	18,9 ± 0,6
<i>VRN B1a</i>	24,0 ± 0,4	13,5 ± 0,1	13,1 ± 0,3
<i>VRN D1a</i>	25,8 ± 0,3	16,2 ± 0,3	18,4 ± 0,8

Опыты с изогенными линиями сои показали, что у линий с локусами *E1E2E3* и *E1e2e3*, которые ускоряют переход к цветению на коротком дне, и у линий с локусами *e1e2e3*, *e1E2e3* и *e1e2E3*, которые зацветают одновременно на коротком и длинном дне, интенсивность накопления разных форм углеводов в листьях в условиях короткого фотопериода выше, чем в условиях длинного (табл.5).

Таблица 5. Интенсивность накопления водорастворимых углеводов в листьях изогенных по генам *EE* линий сои сорта Clark при разном фотопериоде, мг/г сухой массы в час.

Генотип линии	Фотопериод, часы	Интенсивность накопления		
		Моносахара	Олигосахара	Сумма сахаров
<i>E1E2E3*</i>	16	2,6	2,4	4,9
	9	5,2	2,7	7,9
<i>e1e2e3**</i>	16	3,4	2,8	6,2
	9	5,2	4,5	9,7

Эффекты генов *VRN* и *EE* на фитогормональный статус. Исследование фитогормонов показало, что активность ИУК, ГК и ЦК у медленно развивающейся изолинии *VRN B1a* была ниже, а АБК выше, чем у линий с доминантными локусами *VRN A1a* и *VRN D1a* [19]. Фитогормональный баланс в листьях – отношение содержания рост стимулирующих гормонов к рост ингибирующим (ИУК+ЦК+ГК/АБК) максимальным был у быстро развивающихся изолиний *VRN A1a* и *VRN D1a* (табл.6).

У всех исследованных линий сои, независимо от состояния локусов генов *EE*, короткий фотопериод снижал активность ИУК, но повышал активность АБК. Активность ГК на коротком дне у короткодневных линий была ниже, а у нейтральных – выше, чем на длинном дне [9]. Следовательно, у нейтральных линий *e1e2e3*, *e1E2e3* и *e1e2E3*, это изменения проявляются по-иному, чем у короткодневных линий с локусами *E1E2E3* и *E1e2e3* (табл.7).

Таблица 6. Фитогормональный баланс листьев изогенных по генам *VRN* линий пшеницы сорта Мироновская 808.

Генотип линии	Содержание фитогормонов, мкг/г сухой массы				ИУК+ЦК+ГК
	ИУК	ЦК	ГК	АБК	АБК
<i>VRN A1a</i>	7,1±0,2	3,1 ±0,1	228,7 ±15	54,1±0,8	4,41
<i>VRN B1a</i>	6,5 ±0,1	2,9 ±0,1	185,7 ±10	77,2±1,0	2,53
<i>VRN D1a</i>	6,9 ±0,1	3,1 ±0,1	214,0 ±12	56,4±1,1	3,96

Таблица 7. Активность фитогормонов в листьях изогенных по генам *EE* линий сои сорта Clark в условиях разного фотопериода, прирост биотеста, % к контролю.

Генотип линии	Активность фитогормонов					
	ИУК		ГК		АБК	
	Фотопериод, часы					
	16	9	16	9	16	9
<i>E1E2E3*</i>	245 ±18	182 ±10	232 ±10	192 ±7	43 ±2	79 ±4
<i>E1e2e3*</i>	181 ±10	133 ±8	165 ±8	129 ±8	18 ±1	54 ±3
<i>e1E2e3**</i>	201 ±11	153 ±8	173 ±7	236 ±12	43 ±2	56 ±3
<i>e1e2E3**</i>	163 ±9	129 ±7	109 ±10	155 ±11	32 ±2	50 ±2
<i>e1e2e3**</i>	202 ±12	166 ±10	175 ±8	268 ±14	43 ±3	66 ±3

Эффекты генов *VRN* и *EE* на процесс азотфиксации. Нами проведено также изучение возможной роли генов *VRN* во взаимодействии растение-микроорганизм на модели ассоциативной азотфиксации [3].

Таблица 8. Общая численность азотфиксаторов в корневой зоне и нитрогеназная активность у изогенных по генам *VRN* линий пшеницы сорта Мироновская 808 в фазу колошения

Генотип линии	Численность, 10 ⁶ клеток/г сухой почвы	Нитрогеназная активность, мкмоль C ₂ H ₄ /г сухих корней в час
<i>VRN A1a</i>	1291	3262,4
<i>VRN B1a</i>	1105	2916,5
<i>VRN D1a</i>	1704	4032,3
<i>HCP₀₅</i>	210	432,2

Результаты показали, что в корневой зоне медленно развивающейся линии, несущей доминантный локус *VRN B1a*, меньшее количество diaзотрофов и специфического азотфиксатора пшеницы *Azospirillum brasilense*, а также более низкая нитрогеназная активность, чем у быстроразвивающихся линий с доминантными локусами *VRN A1a* и *VRN D1a* (табл.8).

Изучение эффектов генов *EE* сои на симбиотическую азотфиксацию показало (табл.9), что в условиях короткого фотопериода у всех исследованных линий снижая объем симбиотического аппарата (число и масса клубеньков), а также активность нитрогеназы. Однако у фотопериодичности нейтральных линий (*e1e2e3*, *e1E2e3* и *e1e2E3*) это снижение было существенно меньшим, чем у короткодневных линий (*E1E2E3* и *E1e2e3*) [5]

Таблица 9. Число, масса клубеньков и активность нитрогеназы у изогенных по генам *EE* линий сои сорта Clark при разном фотопериоде

Генотип линии	Фотопериод, часы	Клубеньки на растении		Нитрогеназная активность, мкмоль C ₂ H ₄ /г клубеньков в час
		Штук	Масса, г	
E1E2E3*	16	25,4 ±1,7	99,4 ±5,1	17,6 ±1,5
	9	23,9 ±1,9	62,5 ±4,2	8,7 ±1,0
e1e2e3**	16	24,9 ±2,3	83,3 ±8,4	16,6 ±1,6
	9	19,6 ±2,0	61,7 ±6,3	12,1 ±1,5

Эффекты генов *PPD*, *VRN* и *EE* на процессы каллюсогенеза и морфогенеза *in vitro*. При исследовании данных генетических систем в условиях *in vitro* установлено (табл. 10), что медленно развивающиеся изолинии пшеницы *PPD1a* и *VRN1a* и фотопериодически нейтральная изолиния сои *e1e2e3*, независимо от типа экспланта (зрелые зародыши, апикальные участки корней, первичные листья), эффективнее вводятся в культуру *in vitro*, характеризуются более высоким потенциалом первичного каллюсогенеза, большей скоростью роста каллюсных тканей, оводнёностью, накоплением сырой/сухой биомассы.

Таблица 10. Частота каллюсо- и морфогенеза эксплантов зрелых зародышей изогенных по генам *PPD* и *VRN* линий пшеницы сорта Мироновская 808, %

Генотип линии	Каллюсогенез	Морфогенез	
		Прямой	Соматический эмбриоидогенез
<i>PPD D1a</i>	74, ±4,2	75,0 ±2,8	48,5 ±0,9
<i>PPD B1a</i>	98,5 ±1,2	70,0 ±1,4	26,2 ±0,4
<i>PPD A1a</i>	62,9 ±2,1	77,8 ±2,0	35,9 ±0,7
<i>VRN A1a</i>	18,5 ±2,0	72,2 ±3,0	28,5 ±0,9
<i>VRN B1a</i>	33,3 ±3,7	65,3 ±2,0	21,2 ±0,5
<i>VRN D1a</i>	33,3 ±3,5	87,5 ±4,1	30,2 ±0,8

Быстро развивающиеся изолинии *VRN A1a*, *VRN D1a* и *PPD D1a*, *PPD A1a* характеризовались более высокими показателями проявления разных форм морфогенного потенциала – геммогенеза, гемморизогенеза и соматического эмбриоидогенеза, а также максимальным показателем синтетической активности каллюсной ткани – более высоким содержанием фракции легкорастворимого белка [12].

Выводы

Полученные нами данные показывают, что исследованные линии, несущие конкретные локусы генов фотопериодической чувствительности и потребности в яровизации в доминантном и/или рецессивном состоянии, различаются по характеру роста, развития, углеводному и азотному обмену, активности ферментов и фитогормонов, интенсивности процессов каллюсо- и морфогенеза *in vitro*. Эти различия проявляются также и во взаимодействии растение-микроорганизм. Изложенное позволяет предположить, что эффекты этих генов на рост и развитие растений реализуются посредством их участия в регуляции физиолого-биохимических процессов.

Литература

1. Авксентьева О.А., Зубрич А.И., Жмурко В.В. Эффекты генов PPD на рост, развитие и обмен углеводов у изогенных линий пшеницы в условиях разной длины дня // Геном растений: Сборник научных статей V Международной конференции, 13-16 жовтня 2008 р. Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН (Україна). Одеса, 2008, с.42-45.
2. Жмурко В.В. Фотоперіодизм рослин: фізіолого-біохімічні та генетичні аспекти. – Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку у 2 т. НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетики, Укр. т-во фізіологів рослин; голов. ред. В.В. Моргун. К.: Логос, 2009, с.537-564.
3. Жмурко В.В., Авксентьева О.А., Самойлов А.М. Численность диазотрофов и нитрогеназная активность в ризоценозе изогенных по генам VRN линий пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. 2008, Т.40, №4, с.346-355.
4. Жмурко В.В., Авксентьева О.А. Некоторые физиолого-биохимические аспекты генетического контроля озимости и фотопериодической реакции растений // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Збірник наукових праць. Укр. т-во генетиків і селекціонерів імені М. І. Вавилова. К.: Логос, Т. 2, 2007, с. 28-33.
5. Жорняк Ю.В., Юхно Ю.Ю., Самойлов А.М., Жмурко В.В. Влияние фотопериода на нодуляцию и нитрогеназную активность у изогенных линий сои. – Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку у 2 т. // НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетики, Укр. т-во фізіологів рослин; голов. ред. В.В. Моргун. К.: Логос, 2009, с.501-507.
6. Методы биохимического исследования растений. Под ред. А.И. Ермакова. Л.: Агропромиздат, 1987, 430 с.
7. Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа, 2004. 256 с.
8. Стельмах А.Ф. Генетика темпів розвитку пшениць (внесок Селекційно-генетичного інституту за 30 років): Тр. по фундаментальній і прикладній генетикі. Харків: Штрих, 2001, с.89-108.
9. Юхно Ю.Ю., Жмурко В.В. Активність ауксинів та абсцизінів у листках ізогенних за генами EE ліній сої (*Glycine max* (L.) Merr.) за різних фотоперіодичних умов. Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку у 2 т. // НАН України, Ін-т фізіології рослин і генетики, Укр. т-во фізіологів рослин; голов. ред. В.В. Моргун. К.: Логос, 2009, с.649-654.
10. Юхно Ю.Ю., Жмурко В.В. Темпи розвитку та ростові процеси у ізогенних за генами EE ліній сої (*Glycine max* (L.) Merr.) за умов різного фотоперіоду // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія, 2010 рік. Вип.11 (№905), с.217-223.
11. Файт В.І. Ідентифікація і ефекти алелів генів темпів розвитку пшениці. Автореф. дис. докт. біол. наук. Селекційно-генетичний інститут НААНУ, Одеса, 2009. 39 с.
12. Avksentyeva O.A., Petrenko V.A., Tichenko A.A. and Zhmurko V.V. Callus initiation and morphogenesis *in vitro* culture of isogenetic on gene type and rate of development in winter wheat lines // Annual Wheat Newsletter. – August, 2008. Vol.54, p. 150-152.
13. Cober E.R., Curtis D. Both promoters and inhibitors affected flowering time in grafted soybean flowering-time isolines // Crop Sci., 2003. Vol. 43, p. 886-891.
14. Cocram J., Jones H., Leigh F.J., O'Sullivan D., Powell W., Laurie D.A. and Greenland A.J. Control of flowering time in temperate cereals: genes, domestication and sustainable productivity // J. Exp. Botany, 2007. Vol. 58, N6, p. 1231-1244
15. Hemming M.N., Fieg S., Peacock W.J., Dennis E.S. and Trevaskis B. Regions associated with repression of the barley (*Hordeum vulgare*) VERNALIZATION1 gene are not required for

cold induction // Molecular and General Genetics, 2009. Vol. 282, p. 107-117.

16. Greenup A., Peacock W.J., Dennis E.S. and Trevaskis B. The molecular biology of seasonal flowering-responses in Arabidopsis and the cereals// Annals of Botany, 2009. Vol. 103, p. 1165-1172.

17. Shimada S., Ogawa T., Kitagawa S. et al. A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an *APETALA1/FRUITFULL*-like gene, *VRN1*, is upstream of *FLOWERING LOCUS T*// Plant Journal, 2009. Vol. 58(4), p. 668–681.

18. Tasma I.M., Shoemaker R.C. Mapping flowering time gene homologs in soybean and their association with maturity (E) loci // Crop Sci., 2003. Vol.43, p.319-328.

19. Zhmurko V.V., Avksentyeva O.A. The correlation between IAA and ABA in leaves of near-isogenic *Vrn* gene lines of winter wheat // Annual Wheat Newsletter. 2006. Vol.52, p.131-132.

20. Wang S., Carver B., Yan L. Genetic loci in the photoperiod pathway interactively modulate reproductive development of winter wheat // Theoretical and Applied Genetics, 2009. Vol. 118, p. 1339-1349.