

✓ АКАДЕМИЯ НАУК СССР

M. Feldman

T.K. Usov

ГЕНЕТИКА

(ОТДЕЛЬНЫЙ ОТТИСК)

МОСКВА · 1979

ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ХРОСОМ Х-ГЕНОМА ПЫРЕЯ НА СКОРОСТЬ АДАПТАЦИИ К НИЗКИМ ТЕМПЕРАТУРАМ ДОПОЛНЕННЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ ($2n = 44$)

Т. К. УСОВА, В. Д. ФЕДОТОВА

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Приведены данные по изучению влияния пониженных температур на энергетическую эффективность дыхания (эффект ДНФ) тканей узлов кущения дополненных линий, содержащих 42 хромосомы пшеницы и разные хромосомы генома Х пырея.

Обработка растений циклогексимидом в разные периоды I фазы закаливания позволили дифференцировать 7 дополненных линий на 3 группы в отношении их реакции на охлаждение.

Показано, что у 2 линий (I и II) 3 суток закаливания достаточно, чтобы обеспечить определенный уровень морозоустойчивости (судя по эффекту ДНФ), в то время как у 3 линий (III—IV—V) этот уровень достигался на 6-е сутки. В 2 линиях (VI и VII) положительный эффект не обнаруживался.

У дополненных линий процесс адаптации к холоду находится под контролем ядерных генов, которые локализованы в 5 хромосомах генома Х пырея, а их активация зависит от длительности охлаждения в период закаливания.

Ранее показано [1], что присутствие целого генома Х пырея *Agropyron glaucum* у 56-хромосомного ППГ 829 или его гаплоидного набора у 49-хромосомных гибридов F_1 сопровождается реакцией на охлаждение, типичной для зимостойких форм (судя по эффекту ДНФ). Исследования, проведенные на 7 дополненных линиях пшеницы Лютеценс 329 ($2n=43$) с разными хромосомами генома Х пырея *A. glaucum*, позволили выявить влияние отдельных хромосом на направление энергетических процессов в клетке. Так, установлено, что не все хромосомы этого генома принимают одинаковое участие в ответной реакции на охлаждение. Из 7 исследованных нами линий у 5 обнаружен положительный эффект ДНФ, что характерно для зимостойкого ППГ 829. В 2 других линиях подобный эффект не наблюдался [2]. Полученные данные дали возможность предположить, что так называемые «гены зимостойкости» расположены в 5 пырейных хромосомах. В то время из этих данных следовало, что добавление даже одной из этих хромосом достаточно, чтобы у пшеничного растения сохранялась высокая энергетическая эффективность дыхания после воздействия отрицательной температуры, свойственная зимостойким формам. Отрицательный эффект ДНФ, полученный в 2 линиях, мы объясняли либо отсутствием так называемых «генов зимостойкости» в этих хромосомах Х-генома, либо тем, что они находятся в неактивном состоянии.

Настоящее исследование выполнено на 7 дополненных линиях пшеницы Лютеценс 329 с целью дальнейшего изучения роли отдельных хромосом Х-генома пырея в процессе адаптации к низким температурам. Интерес к данному исследованию возник в связи с тем, что в некоторых работах [3, 4] делаются определенные выводы о роли цитоплазматических белков

в процессе холодовой адаптации, синтез которых индуцируется пониженными температурами.

Известно, что скорость адаптации к низким температурам у озимых форм с разным уровнем морозоустойчивости различна и генетически обусловлена. Поэтому представлялось интересным выяснить влияние отдельных хромосом пырейного X-генома на этот процесс. Для установления возможной связи устойчивости с новообразованием белков при пониженной температуре мы применили ингибиторный анализ с использованием циклогексимида. В своей работе мы поступали подобно другим исследователям, которые использовали циклогексимид в качестве специфического ингибитора зависимого от ядра синтеза белка [4-7].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектами исследования были зимостойкий гибрид ППГ 829 ($2n=56$) с геном X пырея *A. glaucum*, озимая пшеница Лютеценс 329 ($2n=42$), их 49-хромосомный гибрид (F_1), у которого к полному набору хромосом пшеницы добавлен гаплоидный набор X-генома пырея ($n=7$), и 7 (I-VII) дополненных линий пшеницы Лютеценс 329 с одной из пар хромосом генома X ($2n=44$). Дополненные линии получены и цитологически идентифицированы согласно описанному нами методу [2].

Растения выращивали в теплице с гидропонным способом питания до фазы кущения. Хорошо раскустившиеся растения закаливали в холодной комнате на свету при $0-2^\circ\text{C}$ в течение 6 дней. В период закаливания растения стояли в стаканах с водой (контроль) или раствором циклогексимида (опыт) в концентрации 2,5 мг/л. Циклогексимид (актидион фирмы «Serva», ФРГ) использовали согласно прописи Труновой и Зверевой [4]. Каждые 2 дня меняли воду и раствор циклогексимида (ЦГИ). Варианты опытов были следующими: а—6 дней закаливания на воде; б—6 дней закаливания на ЦГИ; в—1 день закаливания на воде и 5 дней — на ЦГИ; г—3 дня закаливания на воде и 3 дня — на ЦГИ. Основной смысл этой схемы состоял в том, чтобы, не изменяя условий закаливания, вызвать торможение синтеза цитоплазматических белков в различные периоды закаливания. Промораживание растений проводили в климатической камере Feutron (ГДР) при -4°C в течение 48 ч. После часового оттаивания при 1°C растения использовали в опытах с ДНФ. Об энергетической эффективности дыхания судили по стимулирующему действию 2,4-динитрофенола (ДНФ) на интенсивность дыхания тканей, которую определяли манометрически в аппарате Варбурга при 10°C . Воду и раствор ДНФ (10^{-4} М, рН 7,0) инфильтрировали на холоду (2°C) в ткани стеблевой части растения, включая узел кущения. Навеска на сосуд 500 мг, одновременно работало по 3 параллельных сосуда, показания манометров снимали каждые 15 мин в течение 1-1,5 ч.

Данные статистически обработаны.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

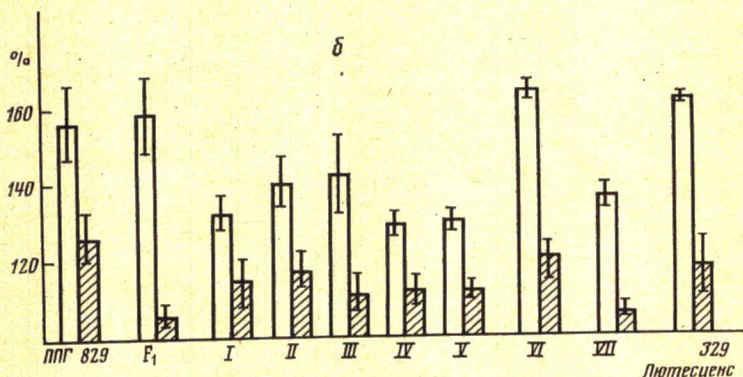
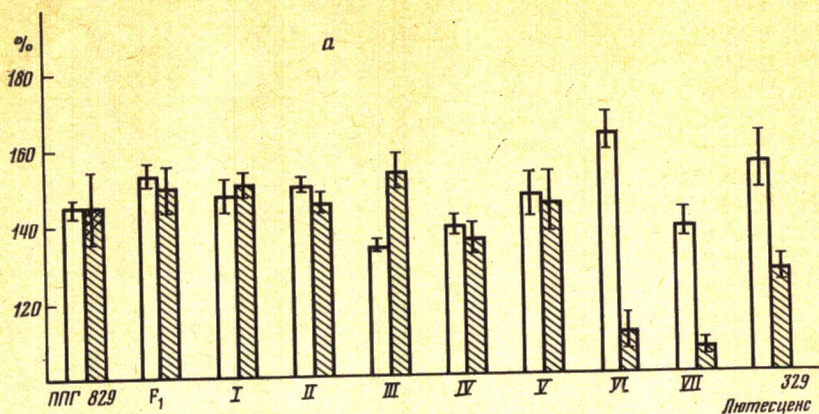
На рисунке, а представлены результаты 1-го варианта опытов. В течение всего периода закаливания (6 дней) растения стояли в стаканах с водой, после чего они были использованы в опытах с ДНФ. Эта серия служила контролем для последующих экспериментов с ингибитором белкового синтеза циклогексимидом. Данные, полученные после воздействия температурой -4°C в течение 48 ч, позволили нам распределить все ис-

следуемые формы на 2 группы: 1 — с положительным эффектом ДНФ (сохранение стимуляции дыхания под действием ДНФ на уровне контроля или превышение этого уровня), что, как показано нами ранее [1], характерно для зимостойких форм, и 2 — с отрицательным эффектом ДНФ (стимуляция дыхания достоверно ниже контрольного уровня), что было типичным для незимостойких форм. В первую группу вошли зимостойкий ППГ 829, 49-хромосомный гибрид (F_1), а также 5 дополненных линий (I, II, III, IV, V). Во второй группе оказались озимая пшеница Лютеценс 329 и 2 дополненные линии (VI и VII).

Данные, полученные в этом эксперименте, хорошо совпали с результатами наших предыдущих исследований, проведенных на аналогичных формах и тех же дополненных линиях [2], и подтвердили вывод, что у закаленных растений 5 хромосом X-генома пырея *A. glaucum* принимают участие в обеспечении положительного эффекта ДНФ, свойственного зимостойким формам. Полное совпадение результатов с предыдущими исследованиями дало нам основание продолжить работу с использованием раствора циклогексимида. Мы полагали, что если в период закаливания пониженные температуры действительно индуцируют синтез белков, которые играют важную роль в процессах, обеспечивающих развитие морозоустойчивости, то торможение синтеза в определенные периоды закаливания будет оказывать существенное влияние на этот процесс, а на фоне отрицательных температур это может отразиться на эффекте ДНФ. Если это так, можно было ожидать, что в условиях полного подавления синтеза белка ЦГИ положительный эффект ДНФ у зимостойких форм после 48-часового воздействия температурой -4°C окажется сильно ослабленным или полностью устранится. Чтобы выявить предполагаемую зависимость, провели опыты на растениях, которые весь период закаливания находились на растворе ЦГИ.

После промораживания положительный эффект ДНФ, наблюдаемый нами в предыдущем эксперименте у ППГ 829, гибрида F_1 и у 5 дополненных линий, полностью устранялся (см. рисунок, б). Этот результат указывает на то, что при применении ингибитора белкового синтеза в течение всего периода закаливания развитие морозоустойчивости (судя по эффекту ДНФ) не происходит, видимо, вследствие того, что имеет место блокирование синтеза белков, принимающих активное участие в обеспечении стабильной работы митохондрий после действия отрицательной температуры.

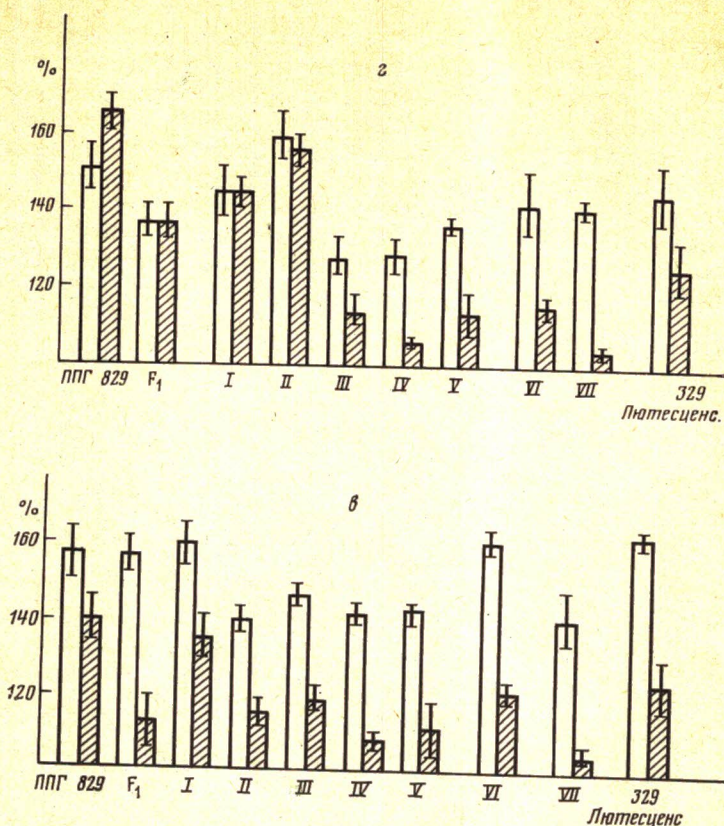
На рисунке, в представлены результаты 3-го варианта, который отличался от предыдущего тем, что ЦГИ вводили в раствор не сразу, а на 2-й день после начала закаливания. Полученные результаты оказались аналогичными предыдущему эксперименту, т. е. все исследуемые формы имели отрицательный эффект ДНФ. Нам не удалось отметить положительного эффекта даже у такой высокозимостойкой формы, как у ППГ 829, видимо, потому, что 1 суток закаливания оказалось явно недостаточно, чтобы была обеспечена наработка соответствующих белков. Этот эксперимент по существу был своего рода повторностью к предыдущему. Интересные результаты получены в последнем варианте, где ЦГИ вносили в раствор после 3 суток закаливания, т. е. 3 дня растения стояли на воде и 3 дня на растворе ЦГИ. Первое, что обращает на себя внимание, это наличие положительного эффекта у ППГ 829, гибрида F_1 , а также у 2 дополненных линий (I и II). Следовательно, 3 суток закаливания оказалось достаточным, чтобы был обеспечен определенный уровень морозоустойчивости у этих форм. Важно отметить, что положительный эффект ДНФ показали не все 5 дополненных линий, как в 1-м варианте, а только 2 из них. Таким образом, можно сделать заключение, что скорость адаптации у 7 дополненных линий пшеницы различна и обусловлена присутствием определенных хромосом генома X пырея.



ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время имеется достаточно обширная литература, посвященная возможному участию белков в защитных реакциях клетки на повреждающие воздействия различной природы. Это относится как к растительным, так и к животным объектам. Имеются данные об увеличении содержания растворимых белков у озимых пшениц при воздействии на них низкими температурами [8–10]. Показано [3, 4], что при пониженных температурах ($\sim 0^{\circ}\text{C}$) происходит синтез белков *de novo*, которые участвуют в процессах, обуславливающих закаленное состояние растений.

Полученные результаты дают возможность предположить, что устойчивость клеточных структур к действию отрицательных температур по-видимому, связана с синтезом белка, индуцируемым низкими положительными температурами. Об этом свидетельствует тот факт, что блокирование синтеза белка ЦГИ в течение всего периода закаливания тормозит развитие морозоустойчивости (судя по эффекту ДНФ). В работе Труновой и Зверевой [4] при использовании аналогичной концентрации ЦГИ не наблюдалось развития морозоустойчивости у озимой пшеницы во время закаливания. Используя метод прямого промораживания, они показали, что морозоустойчивость обработанных ЦГИ растений оставалась на уровне незакаленных. Таким образом, использованная нами схема опытов с ЦГИ позволила, с одной стороны, сравнить все дополненные линии, находящиеся в одинаковых условиях закаливания, по их адаптационной способности, а с другой — установить связь этого процесса с синтезом белка.



Влияние ДНФ на поглощение O_2 тканями растений при $0^\circ C$ (светлые столбики) и после $-4^\circ C$ (заштрихованные столбики), % от контроля (инфильтрация водой):

а — 1-й вариант, 6 дней на воде; б — 2-й вариант, 6 дней на растворе ЦГИ (2,5 мг/л); в — 3-й вариант, 1 день на воде и 5 дней на растворе ЦГИ; г — 4-й вариант, 3 дня на воде и 3 дня на растворе ЦГИ

Ранее показано, что в определенных условиях охлаждения присутствие гаплоидного набора (7 хромосом) генома X сопровождается реакцией, типичной для зимостойкой формы, т. е. отмечается положительный эффект ДНФ. В данной работе эта закономерность выявляется для 2 линий (I и II) на 3-и сутки закалывания, для III, IV, V линий — на 6-е сутки, а VI и VII линии за этот период закалывания не показали положительного эффекта ДНФ. Таким образом, у 2 линий (I и II) обнаружена самая быстрая реакция на температурное воздействие. Следует отметить, что ранее на незакаленных растениях, выращенных в теплице, были также установлены значительные различия между дополненными линиями по реакции их митохондрий на охлаждение [11]. В частности, показано, что при охлаждении растений в течение 1 ч при $-4^\circ C$ митохондрии только 2 линий № 3 и 10 (в нашей работе они соответствуют I и II линиям) быстро изменяли свою функциональную активность, подобно зимостойкой форме ППГ 829. Это позволило авторам сделать вывод, что данные изменения зависят от присутствия одной хромосомы генома X пырея. Все эти факты указывают на то, что в становлении устойчивого состояния принимает участие не весь геном одновременно, а отдельные его хромосомы, которые подключаются в работу постепенно по мере длительности охлаждения в период закалывания.

На основании проведенных нами экспериментов обсуждение вопроса об индуцированном синтезе белка *de novo* при действии закалочных температур ($\sim 0^\circ\text{C}$) представляет определенные трудности, ибо не было вполне прямых экспериментов в этом плане. Тем не менее само наличие различных по скорости реакций на низкие температуры дополнительных линий в первом приближении позволяет рассматривать этот факт как косвенное указание на то, что определенные хромосомы X-генома пырея несут локусы, функционирование которых зависит от определенного температурного режима, и ответственные за появление белкового продукта, принимающего участие в обеспечении стабильной работы митохондрий в условиях отрицательной температуры.

Поступила в редакцию 10 мая 1978 г.

Литература

1. В. Д. Федотова, Т. К. Усова, В. В. Хвостова. Роль отдельных хромосом генома X пырея в наследовании физиологических основ зимостойкости. Генетика, т. 11, № 10, 5, 1975.
2. В. Д. Федотова, В. В. Хвостова, Т. К. Усова. Цитогенетическое изучение линий пшеницы с дополнительными хромосомами пырея *Agropyron glaucum*, различающихся по эффекту 2,4-динитрофенола. Генетика, т. 14, № 6, 1024, 1978.
3. A. Casperska-Palasz, E. Dlugokecka, J. Breitenwald, B. Weis'lenska. Physiological mechanisms of frost tolerance: possible role of protein in plant adaptation to cold. Biol. Plantarum, v. 19, 10, 1977.
4. Т. И. Трунова, Г. Н. Зверева. Влияние ингибиторов белкового синтеза на морозостойкость озимой пшеницы. Физиол. растений, т. 24, вып. 2, 395, 1977.
5. В. Б. Иванов. Клеточные основы роста растений. М., «Наука», 1974, стр. 125.
6. А. С. Спирин, Л. П. Гаврилова. Рибосома. М., «Наука», 1971.
7. Э. Е. Хавкин. Формирование метаболических систем в растущих клетках растений. М., «Наука», 1977.
8. Э. А. Барашкова. Изменение фракционного состава растворимых белков у разных по зимостойкости сортов озимых пшениц в период перезимовки. Бюл. ВИР, вып. 23, 23, 1972.
9. А. С. Дорошко. Белково-углеводный обмен и водный режим в период закали и перезимовки у сортов озимых пшениц с разной зимостойкостью. Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции, т. 43, вып. 1, 33, 1970.
10. Gerloff E. D., Stahmann M. A., Smith D. Soluble proteins in alfalfa as related to cold hardiness. Plant Physiol., v. 42, 7, 1967.
11. В. К. Войников. Последствие охлаждения на активность митохондрий растений, различающихся по генотипу. Автореф. канд. дис. Киев, Ин-т мол. биол. и генетики АН УССР, 1978.

INFLUENCE OF INDIVIDUAL CHROMOSOMES OF AGROPYRON GLAUCUM X GENOME ON THE ADAPTATION RATE OF ADDITIONAL WHEAT LINES ($2n=44$) TO LOW TEMPERATURE

T. K. USOVA, V. D. FEDOTOVA

*Institute of Cytology and Genetics, Academy of Sciences of the USSR,
Siberian Division, Novosibirsk*

Summary

The inhibitive method was used to study the cold adaptation rate of the additional lines of winter wheat *Triticum aestivum* (var. *Lutescens* 329), bearing different chromosomes of *Agropyron glaucum* X genome. Cycloheximide treatment of plants at different periods of the I phases of hardening permitted to differentiate these lines according to their response to cooling. It was supposed that the adaptation process to cold in 7 additional lines was under the control of nuclear genes, which are localized on 5 chromosomes of the *Ag. glaucum* X genome, but their activation depends on the prolongation of cooling during the hardening.

