



УДК 633.16:581.142

© 2012

О. А. Бубряк, Т. В. Акімкіна,
член-кореспондент НАН України **О. П. Дмитрієв,**
академік НАН України **Д. М. Гродзинський, І. І. Бубряк**

Вміст ДНК в ядрах корінців зародків насіння — як молекулярний маркер праймування насіння цукрового буряку

Стимулюючі обробки насіння осмотиками (праймування) призводять до активації в них біохімічних процесів, дають можливість клітинам зародків відновитись від ушкоджень та завершити необхідні етапи підготовки насіння до проростання. Показано, що праймування індукує початок клітинного циклу в зародках цукрового буряку. Проаналізовано зміни вмісту ДНК в ядрах клітин зародків при різних обробках. Виявлено значні відмінності в кількості клітин, які досягли G2 фази в кінці обробки, що веде до значного варіювання життєздатності праймованого насіння при зберіганні. Встановлено, що за оптимальних рівнів праймування цукрового буряку кількість клітин в G2 фазі з 4С вмістом ДНК не повинна перевищувати 15%. Запропоновано використовувати вміст клітин у G2 фазі клітинного циклу як молекулярний маркер ступеня праймування насіння цукрового буряку.

Якість насіння залежить у першу чергу від його однорідності щодо фізіологічного стану зародків. Навіть насіння високої якості може значно варіювати за ступенем зрілості, що обумовлює асинхронність його проростання. Недостатньо визріле насіння має більшу кількість пошкоджень ДНК зародків і потребує тривалішої репарації. Як наслідок, таке насіння проростає повільніше [1, 2]. Одне з найважливіших завдань стимулюючих обробок насіння (праймування) і полягає в синхронізації насіннєвого матеріалу щодо темпів проростання. Це досягається, зокрема, за рахунок обмеження доступної вологи для зародків під час обробки (наприклад, осмопраймування), внаслідок чого відбувається репарація ДНК, але затримується її реплікація та входження клітин у мітоз [3, 4].

Відомо, що для різних сортів, ліній і гібридів рослин оптимальні умови передпосівних обробок можуть значно варіювати [5]. Більше того, підбір оптимальних режимів праймування може бути необхідним навіть для окремих партій генетично спорідненого матеріалу. Тому очевидна необхідність проведення досліджень по оптимізації передпосівних обробок та пошуку універсального молекулярного маркера праймування на різноманітному генетичному матеріалі. У нашому випадку — на різних гібридах цукрового буряку.

При дослідженні клітинних та молекулярних процесів, що відбуваються під час праймування, використовували різноманітні підходи, такі як аналіз кількості розчинних цукрів у насінні [6], активності специфічних для проростання насіння ферментів (амілази, α -глюкозидази, β -мананази) [5, 6], ефективності репарації ДНК [7], пошуку специфічних для осмопраймування білків [8] і навіть зміни в гормональному стані насіння [9]. Найбільш перспективними з точки зору пошуку молекулярного маркера праймування є дослідження протеому. Так, встановлено, що у деяких бобових (люцерна) індуються 63 білки, специфічні для осмопраймування [8], а у цукрового буряку з 18 білків, що індуються при праймуванні, деякі можуть бути пов'язані з енергією проростання насіння [10]. Але ці дослідження мають певні обмеження, оскільки не дають змоги точно дискримінувати різні рівні праймування насіння та визначати його оптимальні рівні.

Ми ставили за мету пов'язати різні рівні передпосівної обробки насіння зі швидкістю входження зародкових клітин у перший клітинний цикл і запропонувати показник оптимального праймування для цукрового буряку.

Об'єктом досліджень було насіння цукрового буряку (гібриди “Мадісон” та “Дюк”). Праймування проводили витриманням насіння у герметичній камері з обертанням при 20 °С протягом 2–4 днів. Ступінь обробки варіював таким чином, що насіння 1-го варіанта на кінець обробки мало найнижчу вологість зародка (22,3%) — “недопраймоване насіння”, 2-го — проміжну (25%) — “оптимально праймоване насіння”, 3-го — найвищу (27,5%) — “перепраймоване насіння”. У деяких експериментах досліджували також проміжні варіанти праймування.

Проростання насіння вивчали згідно зі стандартами Міжнародної асоціації тестування насіння (ISTA). Для цього пророщували 100 насінин у 3–5 повторностях при 15 °С і реєстрували схожість, швидкість проростання (час до проростання 50% насінин) та кількість аномального насіння (того, що характеризується накопиченням ушкоджень, які перешкоджають нормальному розвитку проростків).

Вміст ДНК у клітинах зародків визначали у фіксованому матеріалі після гідролізу в 5 М HCl протягом 30 хв як описано нами раніше [11]. Після фарбування забарвлення ядер вимірювали (не менш ніж у 200 ядрах для 5 зародків) за допомогою сканувального мікроденситометра “Vickers M285” при довжині хвилі 550 нм та розміру маски 4. Дані наведені у вигляді відсотка ядер з різним відносним вмістом ДНК.

На базі промислових протоколів праймування, що використовуються в агрофірмах Великобританії, були підібрані три основні та два проміжні режими праймування насіння цукрового буряку. Вивчено вплив цих режимів на схожість, швидкість проростання та кількість аномального насіння. Виявилось, що схожість насіння гібрида “Мадісон” під час обробки підвищується з 92,7 до 98,7%. При цьому час для проростання 50% насіння, тестований згідно з методиками ISTA, зменшується з 104,1 до 29,4 год (табл. 1). Цікаво, що кількість аномального насіння у цього гібрида була дуже низькою (0,3%) і істотно не змінювалася при праймуванні.

Дещо інші результати отримані при застосуванні тих самих обробок для гібрида “Дюк”. Для нього також характерне істотне підвищення швидкості проростання насіння (з 70,2 до 28,9 год). Але при цьому відсоток проростання дещо зменшився, а кількість аномального насіння зросла з 3,0 до 5,3% (див. табл. 1).

Аналіз проростання насіння цукрового буряку показує, що при всіх режимах праймування гібрида “Мадісон” схожість та швидкість проростання насіння зростає при дуже низькій кількості аномального насіння у вибірці. Схоже, що для “Мадісон” обробка, яка анонсува-

лась у насіннєвій промисловості як “перепраймування”, може бути оптимальною. У той же час ця обробка у гібрида “Дюк” призводить до зниження схожості та статистично достовірного зростання кількості аномального насіння.

Щоб зрозуміти цю значну різницю в ефектах праймування між гібридами “Мадісон” та “Дюк”, ми проаналізували у них швидкість проходження ядер клітин зародків по клітинному циклу. Для цього досліджували зміни вмісту ДНК у ядрах корінців зародків після різних режимів праймування насіння з використанням мікроденситометрії. Остання не тільки дає можливість вимірювати вміст ДНК в ядрах зародків, але, на відміну від цитофлюориметрії, вказує в яких саме клітинах відбувається зростання кількості ДНК. Виявилось, що для гібрида “Мадісон” тільки в насінні, що вважалось перепраймованим, у 25% клітин корінців наявні ядра з 4С вмістом ДНК (тобто після завершення процесу реплікації ДНК). У той же час у гібрида “Дюк” ядра з 4С вмістом ДНК спостерігали вже в праймовано-

Таблиця 1. Проростання насіння цукрового буряку гібридів “Мадісон” та “Дюк” після передпосівної обробки різної тривалості

Варіант досліджу; вологість, %	Проростання, %	Аномальне насіння, %	Швидкість проростання, год
Гібрид “Мадісон”			
Контроль; 14,0	92,7 ± 1,4	0,3 ± 0,1	104,1 ± 5,2
Недопраймоване насіння; 22,3; 4 доби	93,0 ± 2,2	0,0	77,3 ± 5,1
Оптимально праймоване насіння; 25,0; 4 доби	98,0 ± 2,4	0,0	51,7 ± 3,9
Перепраймоване насіння; 27,5; 2 доби	98,0 ± 4,2	1,0 ± 0,3	61,7 ± 4,8
Перепраймоване насіння; 27,5; 3 доби	96,7 ± 2,9	2,7 ± 1,3	30,4 ± 2,2
Перепраймоване насіння; 27,5; 4 доби	98,7 ± 1,3	0,3 ± 0,2	29,4 ± 1,8
Гібрид “Дюк”			
Контроль; 14,0	96,3 ± 0,8	3,0 ± 0,6	70,2 ± 5,5
Недопраймоване насіння; 22,3; 4 доби	97,0 ± 1,6	2,0 ± 0,8	57,7 ± 4,6
Оптимально праймоване насіння; 25,0; 4 доби	91,3 ± 5,2	4,3 ± 1,1	44,6 ± 2,8
Перепраймоване насіння; 27,5; 2 доби	96,3 ± 2,3	2,7 ± 0,6	44,6 ± 3,4
Перепраймоване насіння; 27,5; 3 доби	93,7 ± 1,8	4,0 ± 1,2	33,9 ± 2,9
Перепраймоване насіння; 27,5; 4 доби	91,7 ± 1,4	5,3 ± 0,9	28,9 ± 1,9

Таблиця 2. Проростання праймованого насіння гібридів цукрового буряку після зберігання при 25 °С протягом 18 місяців

Варіант досліджу	Гібрид “Мадісон”			Гібрид “Дюк”		
	Проростання, %	Аномальне насіння, %	Швидкість проростання, год	Проростання, %	Аномальне насіння, %	Швидкість проростання, год
Зберігання 6 міс.						
Контроль	92,3 ± 3,1	0,3 ± 0,2	93,6 ± 6,2	96,7 ± 2,7	2,3 ± 0,9	69,1 ± 6,1
Недопраймоване	97,3 ± 4,9	0,7 ± 0,4	64,8 ± 5,8	96,3 ± 3,3	3,3 ± 0,6	55,8 ± 4,9
Оптимально праймоване	98,2 ± 2,7	1,3 ± 0,6	56,5 ± 3,9	90,3 ± 4,1	9,3 ± 1,4	42,6 ± 2,6
Перепраймоване	97,5 ± 1,8	2,0 ± 1,3	37,0 ± 4,8	77,0 ± 2,4	12,3 ± 2,1	32,7 ± 4,3
Зберігання 18 міс.						
Контроль	92,0 ± 4,2	0,4 ± 0,2	87,5 ± 5,9	95,3 ± 5,1	3,8 ± 1,7	64,6 ± 5,2
Недопраймоване	97,3 ± 3,1	0,6 ± 0,3	75,2 ± 5,2	95,7 ± 3,2	3,1 ± 1,4	51,3 ± 3,8
Оптимально праймоване	98,0 ± 1,6	1,9 ± 1,1	55,1 ± 3,9	79,4 ± 4,2	20,7 ± 4,6	45,3 ± 3,2
Перепраймоване	96,7 ± 2,8	3,3 ± 0,8	38,4 ± 4,1	62,3 ± 4,9	33,0 ± 3,6	37,4 ± 2,8

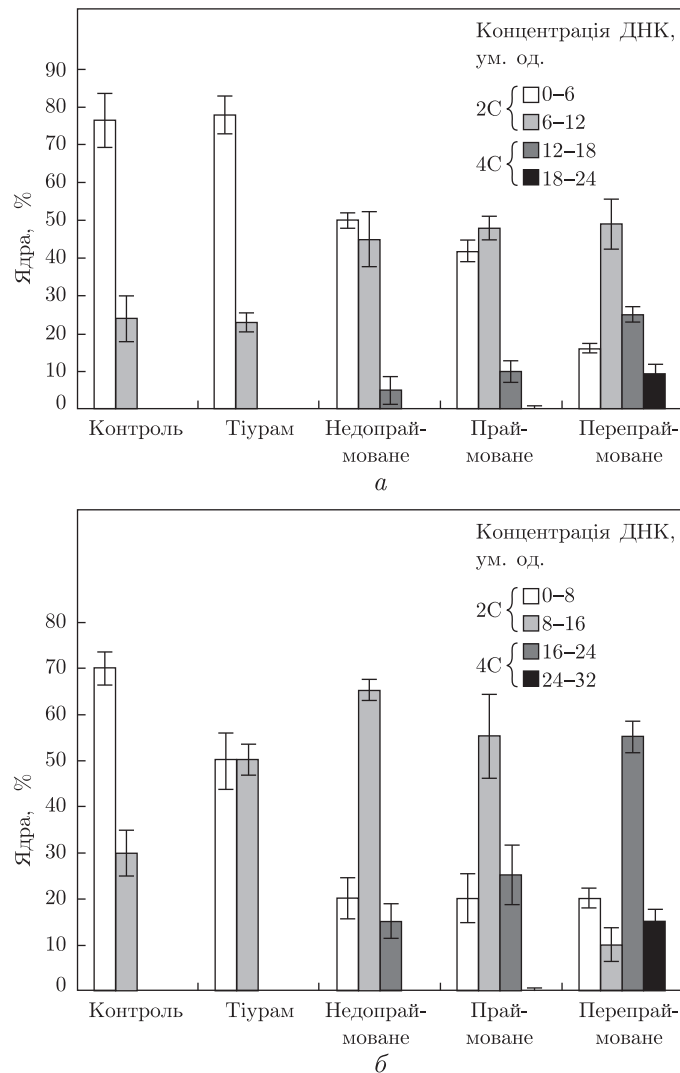


Рис. 1. Вміст ядерної ДНК в праймованому насінні цукрового буряку (24 год проростання, корінці): *а* — гібрид “Мадісон”; *б* — гібрид “Дюк”

му насінні (до 20% клітин). Одержані дані свідчать про те, що для гібрида “Дюк” ефект “праймування” близький до впливу “перепраймування” для гібрида “Мадісон”.

Ще більшою була різниця між гібридами в експериментах, коли аналізували корінці зародків цукрового буряку праймованого насіння через 24 год після проростання (рис. 1). З даних для гібрида “Мадісон” видно, що тільки близько 10% праймованого насіння та близько 35% перепраймованого насіння досягає 4С рівня ДНК і може вступати в мітоз після 24 год проростання насіння в оптимальних умовах (див. рис. 1, *а*). Для гібрида “Дюк” цей показник сягає вже 30% у праймованого матеріалу, а у більшості клітин перепраймованого насіння (70%) у цей час починається мітоз (див. рис. 1, *б*).

Таким чином, показано істотну різницю у впливі однакових режимів праймування насіння для різних гібридів цукрового буряку і підтверджено, що обробка, яка типово використовується в насінневій промисловості як “оптимальне праймування”, може бути неоптимально завищеною та небезпечною для якості насіння деяких гібридів чи партій насіння. Шляхом

аналізу розподілу клітин зародків насіння цукрового буряку з різним вмістом ДНК в сухому насінні (висушеному після різних режимів праймування) ми встановили, що наявність більше ніж 15% клітин зародків з 4С вмістом ДНК може бути показником того, що насіння є перепраймованим і навряд чи придатним для тривалого зберігання.

Для перевірки цього припущення ми заклали експерименти по вивченню впливу різних режимів праймування насіння на його життєздатність при тривалому зберіганні. Аналіз проводили через 6 та 18 міс. після закладки на зберігання (табл. 2). Легко бачити, що за час зберігання показники проростання насіння контрольної групи істотно не змінюються, тоді як динаміка життєздатності у обробленого насіння значно варіює залежно від рівня праймування і генотипу. Для гібрида “Мадісон” навіть в перепраймованому насінні відсоток проростання за час зберігання практично не змінюється і залишається вищим, ніж у контролі. При цьому накопичення аномального насіння при зберіганні є мінімальним — близько 3%. На відміну від “Мадісон”, динаміка змін життєздатності для насіння гібрида “Дюк” характеризується істотним зниженням відсотка проростання перепраймованого насіння вже через 6 міс. зберігання. А після 18 міс. зберігання навіть насіння, що відповідно до технологічного регламенту праймування вважається оптимально праймованим, втрачає схожість більш ніж на 20% і, таким чином, є непридатним для продажу на ринку згідно зі стандартами ISTA.

Відомо, що однією з основних причин втрати життєздатності насіння при зберіганні є накопичення в ДНК клітин зародків одониткових розривів ДНК [12]. Швидкість такого накопичення залежить від фізіологічного стану насіння та умов його зберігання, в першу чергу від температури та вологості зовнішнього середовища [1, 13]. Насіння здатне зберігатись довше, якщо його зародки знаходяться у фазі засухостійкості. Якщо під впливом підвищеної вологи насіння виходить з фази засухостійкості, то можливий запуск механізмів прискореного старіння і накопичення в клітинах зародків ушкоджень ДНК апоптозного типу [14]. Однією з можливих причин виходу насіння з фази засухостійкості є накопичення в корінцях зародків значного відсотка клітин, що закінчили реплікацію ДНК (тобто з 4С вмістом ДНК), і початок мітозів. Таке насіння може ушкоджуватись на заключній фазі праймування — висушуванні, і в ньому можуть швидко накопичуватись значні рівні пошкоджень ДНК. Цілком ймовірно, що для гібрида “Дюк” використані режими “праймування” та “перепраймування” виявились неоптимальними, спричинили вихід насіння з фази засухостійкості, подальше накопичення ушкоджень ДНК зародків та часткову втрату життєздатності насіння при зберіганні.

Одержані результати свідчать про те, що при праймуванні насіння в клітинах корінців зародків ініціюється реплікація ДНК, і вони рухаються по клітинному циклу з накопиченням їх частини в G2 фазі клітинного циклу. Це дало можливість пов'язати різні режими праймування зі швидкістю накопичення клітин з 4С вмістом ДНК. Показано, що за оптимальних режимів праймування цукрового буряку кількість клітин з 4С вмістом ДНК не повинна перевищувати 15%. Таким чином, вміст клітин в G2 фазі клітинного циклу прямо корелює з рівнем праймування і може бути використаний як молекулярний маркер ступеня праймування.

1. Boubriak I., McCready S., Osborne D. DNA structure and seed desiccation tolerance // Plant Desiccation Tolerance. Chapter 7 / Eds. M. Jenks, A. Wood. – New York: Blackwell, 2008. – P. 215–249.
2. Sliwinska E. Nuclear DNA replication and seed quality // Seed Sci. Res. – 2011. – 19. – P. 15–25.
3. Redfearn M., Osborne D. J. Effects of advancement on nucleic acids in sugarbeet (*Beta vulgaris*) seeds // Seed Sci. Res. – 1997. – 7. – P. 261–267.

4. Paterson E., Heyes V. The use of seed priming to improve your sugar beet crop // Int. Sugar J. – 2011. – **113**. – P. 131–133.
5. Ashraf M., Foolad M. Pre-sowing seed treatment – a shotgun approach to improve germination, plant growth, and crop yield under saline and non-saline conditions // Adv. Agron. – 2005. – **88**. – P. 223–271.
6. Mukasa Y., Takahashi H., Taguchi K. et al. Accumulation of soluble sugar in true seeds by priming of sugar beet seeds and the effects of priming on growth and yield of drilled plants // Plant Prod. Sci. – 2003. – **6**. – P. 74–82.
7. Бубряк І., Костюк О., Науменко В., Маторіна А., Гродзинський Д. Опромінення як тест-фактор для виявлення потенціалу темної репарації ДНК насіння // Цитологія і генетика. – 2001. – **35**. – С. 54–59.
8. Yacoubi R., Job C., Belghazi M. et al. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming // J. Proteome Res. – 2011. – **10**. – P. 3891–3903.
9. Barba-Espin G., Diaz-Vivancos P., Job D. et al. Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach // Plant Cell and Environ. – 2011. – **34**. – P. 1907–1919.
10. Catusse J., Meinhard J., Job C. et al. Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet // Proteomics. – 2011. – **11**. – P. 1569–1580.
11. Boubriak I., Dini M., Berjak P., Osborne D. Desiccation and survival in the recalcitrant seeds of *Avicennia marina*: DNA replication, DNA repair and protein synthesis // Seed Sci. Res. – 2000. – **10**. – P. 307–315.
12. Osborne D., Boubriak I. DNA and desiccation tolerance // Ibid. – 1994. – **4**. – P. 175–185.
13. Osborne D., Boubriak I., Leprince O. Rehydration of dried systems: membranes and the nuclear genome // Desiccation and survival in plants: drying without dying. Chapter 12 / Eds. M. Black, H. Pritchard. – Cambridge: CABI, 2002. – P. 343–364.
14. Osborne D., Boubriak I. Life and death in the embryos of seeds // Agron. Soc. New Zealand. – 2002. – **12**. – P. 33–38.

Оксфордський університет, Великобританія
 Університет Оксфорд Брукс, Оксфорд, Великобританія
 Інститут клітинної біології
 і генетичної інженерії НАН України, Київ

Надійшло до редакції 07.03.2012

О. А. Бубряк, Т. В. Акимкина,
 член-корреспондент НАН України **А. П. Дмитриев,**
 академик НАН України **Д. М. Гродзинский, И. И. Бубряк**

Содержание ДНК в ядрах корешков зародышей семян — как молекулярный маркер праймирования семян сахарной свеклы

Стимулирующие обработки семян осмотиками (праймирование) приводят к активации в них биохимических процессов, позволяют клеткам зародышей восстановиться от поврежденных и завершить необходимые этапы подготовки семян к прорастанию. Показано, что праймирование индуцирует начало клеточного цикла в зародышах сахарной свеклы. Проанализированы изменения содержания ДНК в ядрах клеток зародышей при разных обработках. Выявлены значительные отличия в количестве клеток, достигших G2 фазы к концу обработки, что приводит к существенному варьированию жизнеспособности праймированных семян при хранении. Установлено, что при оптимальных уровнях праймирования сахарной свеклы количество клеток в G2 фазе с 4С содержанием ДНК не должно превышать 15%. Предложено использовать содержание клеток в G2 фазе клеточного цикла в качестве молекулярного маркера уровня праймирования семян сахарной свеклы.

O. A. Boubriak, T. V. Akimkina,

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **O. P. Dmitriev,**

Academician of the NAS of Ukraine **D. M. Grodzinsky, I. I. Boubriak**

DNA content in nuclei of seed root embryos — as a molecular marker for the priming of sugar beet seeds

Advancing treatments of seeds by osmotics (priming) cause the activation of biochemical processes in seeds allowing the repair of damages in embryo cells and result in the completion of all essential pre-germination processes. It is shown that the priming induces the cell cycling in embryos of sugar beet. The changes in the DNA content in nuclei at various levels of priming are analyzed. Effect of the same priming conditions is not identical for various sugar beet hybrids, and the number of cells accumulated in G2 phase at the end of a treatment varies. This also leads to the different viability of treated hybrid seeds after storage. It is shown that, at the optimal level of priming, the number of cells in G2 with 4C DNA content should not exceed 15%. The number of the cells in G2 phase of the cell cycle can be used as a molecular marker for the testing priming levels in sugar beet.