

## Кількісна оцінка генетично детермінованої відповіді у листках пшениці на дію хімічних чинників

О.І. Мартиненко<sup>1\*</sup>, Т.К. Кириленко<sup>1</sup>, А.В. Степанюгін<sup>1</sup>,  
Д.П. Плоднік<sup>2</sup>, Д.М. Говорун<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

<sup>2</sup> Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка  
просп. Академіка Глушкова, 2, корп. 5, Київ, 03127, Україна

**Резюме.** За допомогою параметрів «відношення РНК/ДНК» і «швидкість росту» листків проростків пшениці зафіксовано особливості впливу низки хімічних чинників (препарат метисазон, суміш ПЕГ-400+ДМСО та ДМСО) на ці об'єкти. Встановлено найвищу чутливість параметра «відношення РНК/ДНК» до дії хімічних чинників: це є вагомою підставою рекомендувати саме його як кількісний показник впливу екзогенних хімічних чинників на рослинні організми.

**Ключові слова:** співвідношення РНК/ДНК, метисазон, ПЕГ-400, ДМСО, швидкість росту, пшениця.

**Вступ.** Нині розробка засобів захисту рослин від негативного впливу шкідливих факторів довкілля набула особливої актуальності й екологічного значення. Ефективність вирішення цієї непростой, але вельми нагальної проблеми тісно пов'язано з необхідністю вивчення механізмів відповіді рослин на дію екзогенних чинників, зокрема хімічних. Важливим аспектом досліджень такого ґатунку є пошук швидких, надійних і загальнодоступних методів кількісної оцінки відповіді рослин на зовнішні впливи. Відомо, що відповідь рослин на дію екзофакторів формується на різних рівнях організації рослинного організму, ґрунтується на взаємодії молекулярних, біохімічних та фізіологічних процесів і характеризується певним набором числових показників. З-поміж останніх на особливу увагу заслуговують функціональний стан рослинного генома як цілісної високоорганізованої структури та швидкість

росту як генетично детермінований загальноприйнятий інтегральний кінетичний показник відповіді. Останнім часом для дослідження функціональної активності генетичного апарату рослин і його реакції на дію різних чинників застосовують ДНК-РНК-гібридизацію та мікроаргау-технології [1-3]. Водночас експериментально доведена нами можливість використовувати для цього величину відношення РНК/ДНК [4] може значно полегшити і прискорити визначення показника активності генома рослин, зокрема пшениці, вирощених за різних умов.

У нашій роботі як хімічний чинник застосовано комплексний агропрепарат, який починають впроваджувати у фітобіологію. До його складу входять: основна діюча речовина — N-метилізатін-бета-тіосемікарбазон — метисазон (марборан), відомий своєю антивірусною, антибактерійною та протипухлинною дією [5, 6], і розчинники — поліетиленгліколь-400 (ПЕГ-400) та диметилсульфоксид (ДМСО). Вплив цього препарату на розвиток рослин вивчено недостатньо. Нечисленні дані отримано в основному на морфофізіологічному рівні [7]. Крім того, показано здатність препарату викликати про-

\* Corresponding author.

Tel.: +38066-7728771

E-mail address: martynenko.olena@gmail.com

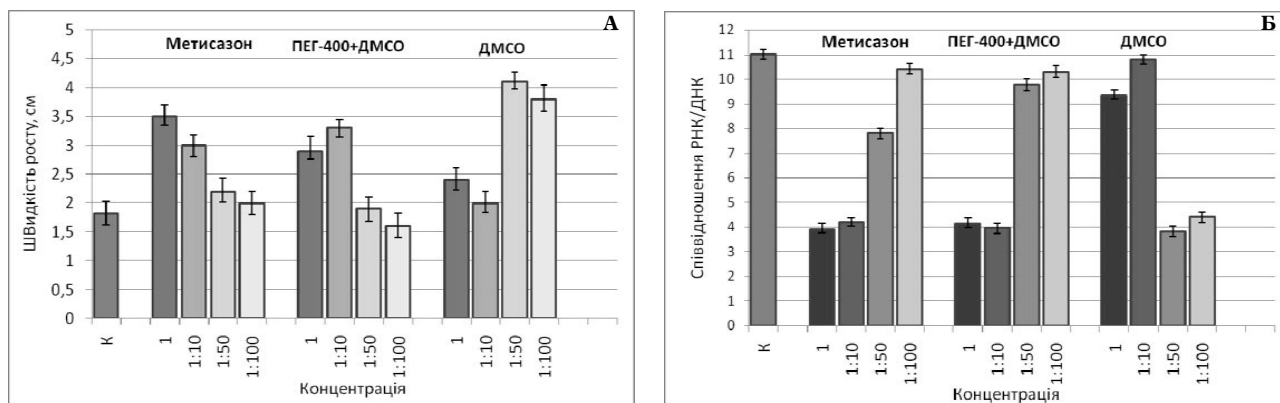


Рис. 1. Вплив різних концентрацій метисазону, суміші ПЕГ:400+ДМСО і ДМСО на швидкість росту листків проростків пшениці на 8-му добу (А) та величину співвідношення РНК/ДНК у них (Б).

лонговані зміни у перебігу процесу нуклеїнового метаболізму в клітинах листків пшениці [8, 9] і посилення експресії певних захисних генів у рослинах тютюну [10]. Водночас лишаються нез'ясованими ще чимало питань щодо механізмів дії цього чинника на рослини.

Мета роботи — дослідити залежність між змінами функціонального стану генома та швидкості росту листків пшениці за різних концентрацій препарату метисазону і його складників.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили на моделі листків 8-мидобових проростків пшениці (*Triticum vulgare* (Will)), вирощених у лабораторних умовах на твердому субстраті (пісок) при 23–25 °С та природному освітленні. Для отримання контрольних зразків рослинного матеріалу використовували попередньо зволене зерно пшениці. Для дослідних варіантів таке насіння додатково обробляли протягом 1 год розчинами різних хімічних чинників: препарату ізатизон, який містить 2 % метисазону, ДМСО і ПЕГ-400+ДМСО. Робочими концентраціями цих чинників були вихідна (1) та розведення 1:10, 1:50, 1:100.

Швидкість росту листків оцінювали згідно з [11] за даними добового приросту надземної частини проростків. Для цього відбирали по 100 рослин (7-ми- та 8-мидобових) контрольного і дослідного варіанта, фотографували й визначали довжину та приріст листків за допомогою програми NIH Image 1.59 Software.

Спектрофотометричну оцінку кількісного вмісту нуклеїнових кислот (НК) безпосередньо в листках проростків пшениці здійснювали за процедурою (Спірін, 1958) з деякими модифікаціями умов послідовного гідролізу од-

ного й того самого рослинного зразка різними хімічними чинниками (0,5 М КОН, 67 °С, 1 год, а потім 0,5 М НСЮ<sub>4</sub>, 90 °С, 20 хв) [12] з подальшим спектрофотометричним аналізом лужних (РНК) і кислотних (ДНК) фракцій стандартним способом. Отримані дані дали змогу обчислити величину відношення РНК/ДНК.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми STATA 11.0.

**Результати та їхнє обговорення.** Отримані експериментальні результати щодо впливу метисазону, суміші ПЕГ-400+ДМСО та ДМСО на ростові процеси листків пшениці представлено на рис. 1(А). Їхній аналіз показав відмінності між зазначеними хімічними чинниками щодо їхнього впливу на швидкість росту листків. Встановлено, що в межах досліджуваних концентрацій за дії препарату метисазону і ПЕГ-400+ДМСО тенденції змін цього параметра в проростках пшениці були подібними. За обробки зерна пшениці вихідними розчинами цих речовин та їхніми розведеннями 1:10 відмічалася порівняно з контролем різке зростання показника швидкості росту в середньому в 1,9 раза для сумарного препарату метисазону та у 1,7 раза для розчину ПЕГ-400+ДМСО. Однак, зі зниженням концентрацій цих чинників прослідковувалося зниження величин швидкості росту листків проростків, при цьому їхні показники залишалися вищими за контрольні. Проте у випадку ДМСО помітна стимуляція ростових процесів листків (у 2,3 раза) була зафіксована лише за дії низьких концентрацій (1:50 і 1:100).

Одночасно з визначенням величин добової швидкості росту листків пшениці досліджува-

Дані регресійного аналізу параметрів «співвідношення РНК/ДНК», «швидкість росту листків» і «хімічний чинник»

Хімічні чинники та їхні концентрації	Формула регресії	
	$y(\text{РНК/ДНК}) = \alpha + \beta(\text{хім.чин.}) + e$	$y(\text{шв.рост.}) = \alpha + \beta(\text{хім.чин.}) + e$
	Коефіцієнт бета ( $\beta$ )	
<b>Метисазон</b>		
вихідний препарат	- 7,10***	1,68***
1:10	- 6,80***	1,18**
1:50	- 3,20***	0,38
1:100	- 0,60	0,18
<b>ПЕГ-400 + ДМСО</b>		
вихідний препарат	- 6,85***	1,08**
1:10	- 7,05***	1,48***
1:50	- 1,22***	0,08
1:100	- 0,70	0,22
<b>ДМСО</b>		
вихідний препарат	- 1,65***	0,58
1:10	- 0,20	0,18
1:50	- 7,19***	2,28***
1:100	- 6,60***	1,98***
Константа ( $\alpha$ )	11,00***	1,82***
$R^2$	0,98 ***	0,53***

Примітки. \*\*\* статистична значимість  $p < 0,001$ ; \*\* статистична значимість  $p < 0,01$ ; \* статистична значимість  $p < 0,05$ .

ли чутливість рослин до зміни концентрацій трьох хімічних чинників на рівні реакції їхнього генома. Користуючись результатами попередніх робіт [4, 13], для характеристики загального функціонального стану рослинного генома ми застосували кількісний показник відношення РНК/ДНК. Результати моніторингу змін величин відношення РНК/ДНК у листках проростків, вирощених за різних концентрацій трьох хімічних екзогенних факторів — препарату метисазону, суміші речовин ПЕГ-400+ДМСО і ДМСО, представлено на рис. 1(Б). Показано, що рівень активності генома листків пшениці під впливом зниження концентрацій (від вихідної до 1:100) сумарного препарату метисазону та ПЕГ-400+ДМСО поступово підвищувався, але не перевищував рівень контрольних значень. За дії ДМСО спостерігалася інша тенденція: зниження концентрації чинника зменшувало і рівень активності геномної ДНК досліджуваних проростків.

Зіставлення показників активності генома («відношення РНК/ДНК») та відповідних значень добового приросту («швидкість росту») листків пшениці виявили різноспрямовані зміни цих параметрів у всіх досліджених рослинах пшениці. Це підтверджується також і даними щодо існування доволі сильної нега-

тивної кореляції ( $r = -0,73$ ,  $p < 0,05$ ). Встановлення того факту, що зазначені параметри належать до скорельованої множини, дає змогу за зміною одного з них прогнозувати характер змін іншого. Проведений регресійний аналіз залежностей досліджуваних показників від параметра «хімічний чинник» виявив суттєві відмінності між ними (табл. 1). Результати порівняння значень коефіцієнта детермінації  $R^2$ , який становить 0,98;  $p < 0,001$  для «відношення РНК/ДНК» та 0,53;  $p < 0,001$  для «швидкості росту», свідчать про суттєво більшу порівняно з «швидкістю росту» чутливість параметра «відношення РНК/ДНК» до дії хімічних чинників. Це є вагомою підставою вважати параметр «відношення РНК/ДНК» цілком придатним для кількісної експрес-оцінки впливу екзогенних хімічних чинників на рослинні організми.

Така спрямованість досліджень відкриває перспективи для кращого розуміння механізмів дії екзогенних чинників на рослини, обґрунтування оптимальних концентрацій не тільки композиційного складу препаратів, але й їхніх окремих компонентів, що дає змогу вдосконалювати існуючі та створювати нові засоби захисту рослин.

**Висновки.** Встановлено особливості впливу низки хімічних чинників (препарат метисазон,

суміш ПЕГ-400+ДМСО і ДМСО) на відношення РНК/ДНК (активність генома) та швидкість росту листків пшениці. Аналізом залежностей цих параметрів від параметра «хімічний чинник» виявлено найвищу чутливість параметра

«відношення РНК/ДНК» до дії хімічних факторів. Це є вагомою підставою рекомендувати його як кількісний показник впливу екзогенних хімічних чинників на рослинні організми.

### Quantitative estimation of genetically determined response in wheat leaves to the impact of chemical factors

O.I. Martynenko<sup>1</sup>, T.K. Kyrylenko<sup>1</sup>, A.V. Stepanyugin<sup>1</sup>, D.P. Plodnik<sup>2</sup>, D.M. Hovorun<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine  
150, Zabolotnoho Str., Kyiv, 03680, Ukraine

<sup>2</sup> Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kyiv  
2, Hlushkova Ave, Kyiv, 03127, Ukraine

**Summary.** By using the parameters «RNA/DNA ratio» and «growth rate» of leaves of wheat seedlings observed features of the impact of a number of chemical factors (drug metysazon, a mixture of PEG-400+DMSO and DMSO) at these objects. Was found the highest sensitivity of parameter «RNA/DNA ratio» to the action of chemical factors: this is serious reason to recommend it is as a quantitative index of impact of exogenous chemical factors on plant organisms.

**Keywords:** RNA/DNA ratio, metysazon, PEG-400, DMSO, growth rate, wheat.

### Перелік літератури

1. Rockman M.V., Kruglyak L. Genetics of global gene expression // *Nature Reviews Genetics*. — 2006. — 7. — P. 862-872.
2. Fleury D., Jefferies S., Kuchel H., Langridge P. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat // *Journal of Experimental Botany*. — 2010. — Vol. 61, No. 12. — P. 3211-3222.
3. Heinrich S., Valentin K., Frickenhaus S., John U., Wiencke C. Transcriptomic analysis of acclimation to temperature and light stress in *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) // *PLoS one*. — 2012. — 7(8). — e44342.
4. Мартиненко О.І., Кириленко Т.К., Степанюгін А.В., Плодник Д.П., Говорун Д.М. Як впливають екзогенні хімічні чинники на активність генома пшениці? Вивчення з використанням співвідношення РНК/ДНК // *Доп. НАНУ*. — 2014. — № 1. — С. 130-136.
5. Kaptsova T.I., Marennikova S.S. On the prophylactic activity on N-methyl isatin beta-thiosemicarbazone against smallpox infection // *Acta Virol.* — 1967. — No. 11(6). — P. 554-556.
6. Quenelle D.C., Keith K.A., Kern E.R. *In vitro* and *in vivo* evaluation of isatin-beta-thiosemicarbazone and marboran against vaccinia and cowpox virus infections // *Antiviral Res.* — 2006. — No. 71(1). — P. 24-30.
7. Lozjuk L.V., Potopalsky A.I., Lozjuk R.M. Medicamentary therapy and prophylaxis of viral diseases. — Lviv: Norma, 2003.
8. Martynenko O., Kyrylenko T., Stepanyugin A., Adamchuk-Chala N., Plodnik D., Potopalsky A. Impact of Izatison on nucleic metabolism of wheat sprouts // Abstract of the 8th conference Parnas. — 2011. — P. 44.
9. Мартиненко О.І., Кириленко Т.К., Степанюгін А.В., Юркевич Л.Н., Плодник Д.П., Адамчук-Чала Н.І., Потопальський А.І. Детермінаційні зміни перебігу процесу нуклеїнового метаболізму у клітинах листків проростків пшениці за дії Ізатізону. Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології (Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology), збірник наук. праць ІХ З'їзду УТГІС. — Київ. — 2012. — Т. 4. — С. 252-256.
10. Kharina A., Zaets I., Ovcharenko L., Podolich O., Budzanivska I., Polischuk V., Potopalsky A., Kozyrovskaya N. Elicitation and protective effect of preventive isatizon treatment of Tobacco Mosaic Virus in *Nicotiana* // *Sepsis*. — 2011. — No. 4(1). — P. 73-78.
11. Levin H.G., Sharek K.M., Johnson K.M., Stryjewski E.C., Martynenko O.I., et al. Growth protocols for etiolated soybeans germinated within BRIC-60 canisters under spaceflight conditions // *Advances in space research*. — 2000. — Vol. 26, No. 2. — P. 311-314.
12. Мартиненко О.І., Кириленко Т.К., Алхімова О.Г. Новий експрес-метод виділення та очищення сумарних препаратів ДНК та РНК з рослин // *Доповіді НАН України*. — 2009. — № 2. — С. 179-183.