

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 633.16:581.142

ПОШУК МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ОБРОБКИ (ПРАЙМУВАННЯ) НАСІННЯ

© 2013 р. О. А. Бубряк¹, Т. В. Акімкіна², О. П. Дмитрієв³,
Д. М. Гродзинський³, І. І. Бубряк^{1,3}

¹Оксфордський Університет
(Оксфорд, Велика Британія)

²Університет Оксфорд Брукс
(Оксфорд, Велика Британія)

³Інститут клітинної біології і генетичної інженерії
Національної академії наук України
(Київ, Україна)

Найбільш ефективною технологією підвищення життєздатності насіння є його передпосівна обробка осмотиками – праймування. Показано, що праймування індукує репараційні процеси в клітинах зародків, після завершення яких відбувається запуск клітинного циклу. Проаналізовано зміни вмісту ДНК в ядрах клітин зародків цукрового, кормового буряку та цибулі при різних обробках. Виявлено значні відмінності в кількості клітин, які досягли G₂ фази наприкінці обробки, що призводить до істотного варіювання життєздатності праймованого насіння при зберіганні. Встановлено, що за оптимальних рівнів праймування цукрового та кормового буряку кількість клітин в G₂ фазі з 4С вмістом ДНК не повинна перевищувати 10% у кормового та 15% у цукрового буряку. Відсоток клітин в G₂ фазі, хоча і корелює з рівнем праймування, не є зручним як молекулярний маркер праймування, оскільки його «оптимальні» значення істотно відрізняються навіть для різних гібридів одного виду.

Ключові слова: *Beta vulgaris*, *Allium cepa*, насіння, режими праймування, клітинний цикл, мікроденситометрія, ДНК, молекулярні маркери

Висока якість посівного матеріалу є важливою передумовою одержання стабільного врожаю сільськогосподарських культур. Насіння повинне мати високу схожість і відповідати стандартам Міжнародної асоціації тестування насіння (ISTA). Але навіть насіння високої якості може значно відрізнятися за ступенем зрілості, що призводить до асинхронності його проростання і неоднорідності в розвитку проростків. Недостатньо визріле насіння накопичує при

формуванні більшу кількість ушкоджень в ДНК зародків, а тому потребує при проростанні тривалішого періоду для репарації (Redfearn, Osborne, 1997; Ventura et al., 2012). Як наслідок, таке насіння проростає повільніше (Boubriak et al., 2008; Sliwinska, 2011). Одне з найважливіших завдань стимулюючих обробок насіння (праймування) і полягає в синхронізації насінневого матеріалу за темпами проростання і формування рослинного покриву. Це досягається, зокрема, за рахунок обмеження доступної вологи для зародків шляхом обробки розчинами солей або поліетиленгліколю (осмопраймування), внаслідок чого відбувається репарація ДНК, але затримується її реплікація та вхо-

Адреса для кореспонденції: Дмитрієв Олександр Петрович, Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, вул. Акад. Заболотного 148, Київ, 03680, Україна;
e-mail: dmyt@voliacable.com

дження клітин у мітоз (Refearn, Osborne, 1997; Paterson, Heyes, 2011).

Складність широкого використання технології праймування пов'язана з тим, що для різних сортів, ліній і гібридів рослин оптимальні умови передпосівних обробок можуть значно варіювати (Ashraf, Fooland, 2005; Paterson, Heyes, 2011). Більше того, підбір оптимальних режимів праймування може бути необхідним навіть для окремих партій генетично спорідненого матеріалу. Дійсно, зараз перед промисловим масштабним праймуванням отриманих партій насіння проводять тестові праймування в різних режимах, що значно підвищує вартість технології праймування для сільського господарства. Тому очевидною є необхідність проведення досліджень з оптимізації передпосівних обробок та пошуку універсального молекулярного маркера праймування на різноманітному генетичному матеріалі. В нашому випадку – на різних гібридах цукрового і кормового буряку та цибулі.

Клітинні та молекулярні процеси, що можуть відповідати за підвищення життєздатності насіння під час процесу праймування поки що вивчені недостатньо, хоча в багатьох лабораторіях світу комплексно досліджують генетичні, біохімічні та молекулярні показники життєздатності. Так, процес праймування пов'язують з активацією специфічних для проростання насіння ферментів (амілази, α -глюкозидази, β -мананази) (Mukasa et al., 2003), індукцією генів, що відповідають за біосинтез гіберелінів (*GA2ox1*, *GA3ox1* та *GA3ox2*) (Nakamune et al., 2012), за репарацію оксидативних пошкоджень ДНК (*MtOGG1*, *MtFPG* та *AtOGG1*) (Masovei et al., 2011; Chen et al., 2012) та за ефективність репараційних систем ДНК в цілому (Бубряк та ін., 2001; Huang et al., 2008). Розпочато пошук специфічних для осмопраймування білків (Yacoubi et al., 2011), встановлені зміни в гормональному статусі насіння (Barba-Espin et al., 2011). Найбільш перспективними для пошуку молекулярного маркера праймування є дослідження протеому. Встановлено, що у деяких бобових (люцерна) індуються 63 білки, специфічні для осмопраймування (Yacoubi et al., 2011). У цукрового буряку з 18 білків, що індуються при праймуванні, деякі можуть бути пов'язані з енергією проростання насіння (Catusse et al., 2011). Проте ці дослідження мають певні обмеження, оскільки не дають змоги точно дискримінувати різні рівні праймування насіння та визначати його оптимальні режими.

Мета даної роботи – пов'язати різні рівні передпосівної обробки насіння зі швидкістю входження зародкових клітин в перший клітинний цикл і запропонувати показник оптимального праймування насіння.

МЕТОДИКА

Об'єктом досліджень було насіння цукрового буряку (гібриди “Мадісон” і “Дюк”), кормового буряку (гібриди “Монако” і “Бікорес”) та цибулі (гібрид “Вайт Лісбон”).

Праймування проводили витриманням насіння у герметичній камері з обертанням в розчинах з різними концентраціями поліетиленгліколю при температурі 20°C протягом 2-4 днів. Ступінь обробки варіювала таким чином, що насіння 1-го варіанта на кінець обробки мало найнижчу вологість зародку (22 %) – «недопраймоване насіння», 2-го – проміжну (25 %) – «оптимально праймоване насіння», 3-го – найвищу вологість (29 %) – «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 в 3-5 повтореннях при 15°C і реєстрували схожість, швидкість проростання (час до проростання 50% насінин) та кількість аномального насіння (того, що характеризується накопиченням ушкоджень, які перешкоджають нормальному розвитку проростків) (Бубряк та ін., 2012).

Вміст ДНК в клітинах зародків визначали у фіксованому матеріалі після гідролізу в 5 М HCl протягом 30 хв, як описано нами раніше (Boubriak et al., 2000). Після фарбування забарвлення ядер вимірювали (не менш ніж у 200 ядрах для п'яти зародків) за допомогою скануючого мікроденситометра “Vickers M285” при довжині хвилі 550 нм та розмірі маски 4. Дані наведені у вигляді відсотка ядер з різним відносним вмістом ДНК.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

На базі промислових протоколів праймування, що використовуються в багатьох агрофірмах, 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 обробок підвищується з 92,7 до 98,7%. При цьому час для

ПОШУК МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Таблиця 1. Проростання насіння цукрового буряку гібрида “Мадісон” після передпосівної обробки різної тривалості

| Варіант дослід, вологість (%), тривалість праймування | Проростання, % | Аномальне насіння, % | Час проростання 50% насіння, год |
|---|----------------|----------------------|----------------------------------|
| Контроль (14,0%) | 92,7±1,4 | 0,3±0,1 | 104,1±5,2 |
| Недопраймоване (22,3%, 4 доби) | 93,0±2,2 | 0,0 | 77,3±5,1 |
| Праймоване (25,0%, 4 доби) | 98,0±2,4 | 0,0 | 51,7±3,9 |
| Перепраймоване (27,5%, 2 доби) | 98,0±4,2 | 1,0±0,3 | 61,7±4,8 |
| Перепраймоване (27,5%, 3 доби) | 96,7±2,9 | 2,7±1,3 | 30,4±2,2 |
| Перепраймоване (27,5%, 4 доби) | 98,7±1,3 | 0,3±0,2 | 29,4±1,8 |

Таблиця 2. Проростання насіння цукрового буряку гібриду “Дюк” після передпосівної обробки різної тривалості

| Варіант дослід, вологість (%), тривалість праймування | Проростання, % | Аномальне насіння, % | Час проростання 50% насіння, год |
|---|----------------|----------------------|----------------------------------|
| Контроль (14,0%) | 96,3±0,8 | 3,0±0,6 | 70,2±5,5 |
| Недопраймоване (22,3 %, 4 доби) | 97,0±1,6 | 2,0±0,8 | 57,7±4,6 |
| Праймоване (25,0%, 4 доби) | 91,3±5,2 | 4,3±1,1 | 44,6±2,8 |
| Перепраймоване (27,5%, 2 доби) | 96,3±2,3 | 2,7±0,6 | 44,6±3,4 |
| Перепраймоване (27,5%, 3 доби) | 93,7±1,8 | 4,0±1,2 | 33,9±2,9 |
| Перепраймоване (27,5%, 4 доби) | 91,7±1,4 | 5,3±0,9 | 28,9±1,9 |

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 суттєво не змінювалась при праймуванні.

Деякі інші результати отримані при використанні 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 зростає з 3,0 до 5,3% (табл. 2).

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

Для з’ясування причин відмінності 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. Отримання 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, близько 20% клітин корінців містять ядра з 4С вмістом ДНК (тобто після завершення процесу реплікації).

У той же час у гібрида “Дюк” аналогічну кількість ядер (20%) з 4С вмістом ДНК спостерігали вже в праймованому насінні. Одержані дані свідчать, що для гібрида “Дюк” ефект "праймування" близький до впливу "перепраймування" для гібрида “Мадісон”.

Ще більшою була різниця між гібридами в досліді, коли аналізували клітини зародків праймованого насіння цукрового буряку через 24 год після проростання (рис. 1). Легко бачити, що для гібрида “Мадісон” 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. Для гібрида “Дюк” цей показник сягає вже 30% у праймованого матеріалу, а у більшості клітин перепраймованого насіння (70%) у цей час починається мітоз (рис. 2).

Таким чином, показано істотну різницю у впливі однакових режимів праймування насіння для різних гібридів цукрового буряку. Встановлено, що обробка, яка типово використовується у насіннєвій промисловості як «оптимальне праймування», може бути неоптимально

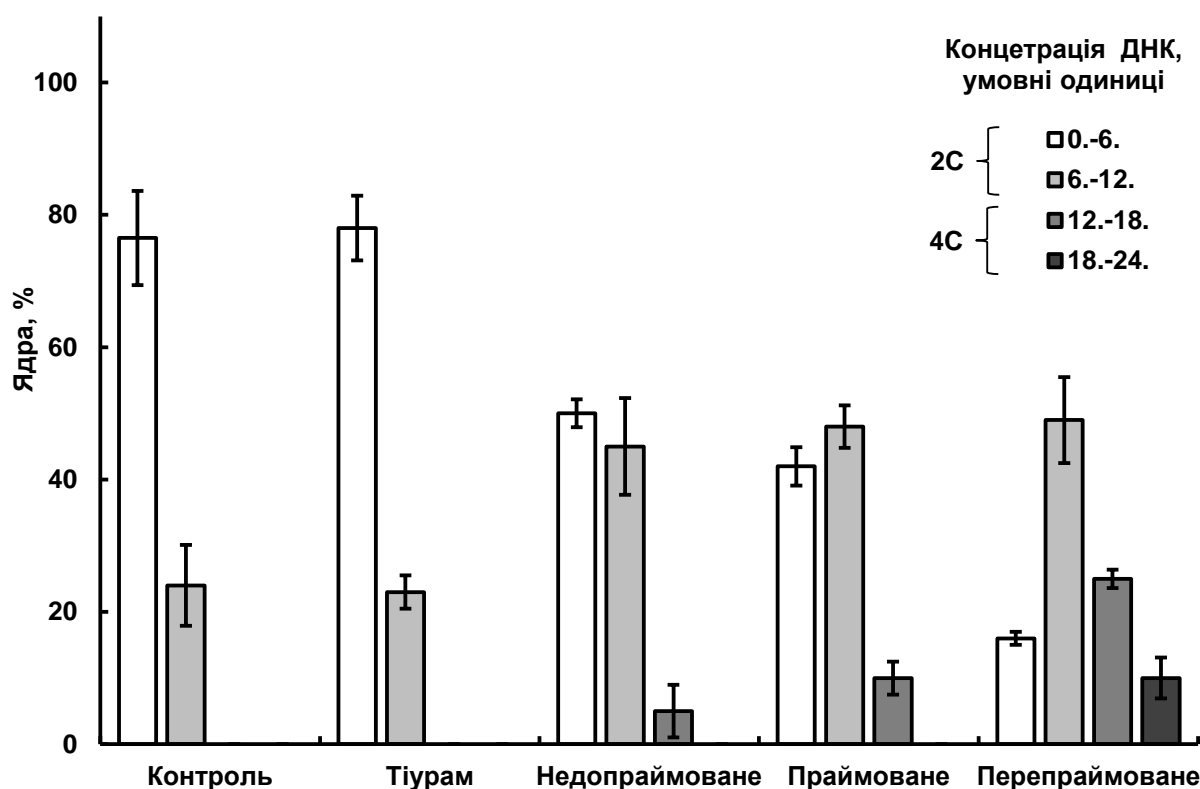


Рис. 1. Вміст ядерної ДНК в праймованому насінні цукрового буряку гібрида Мадісон (24 год проростання, корінці).

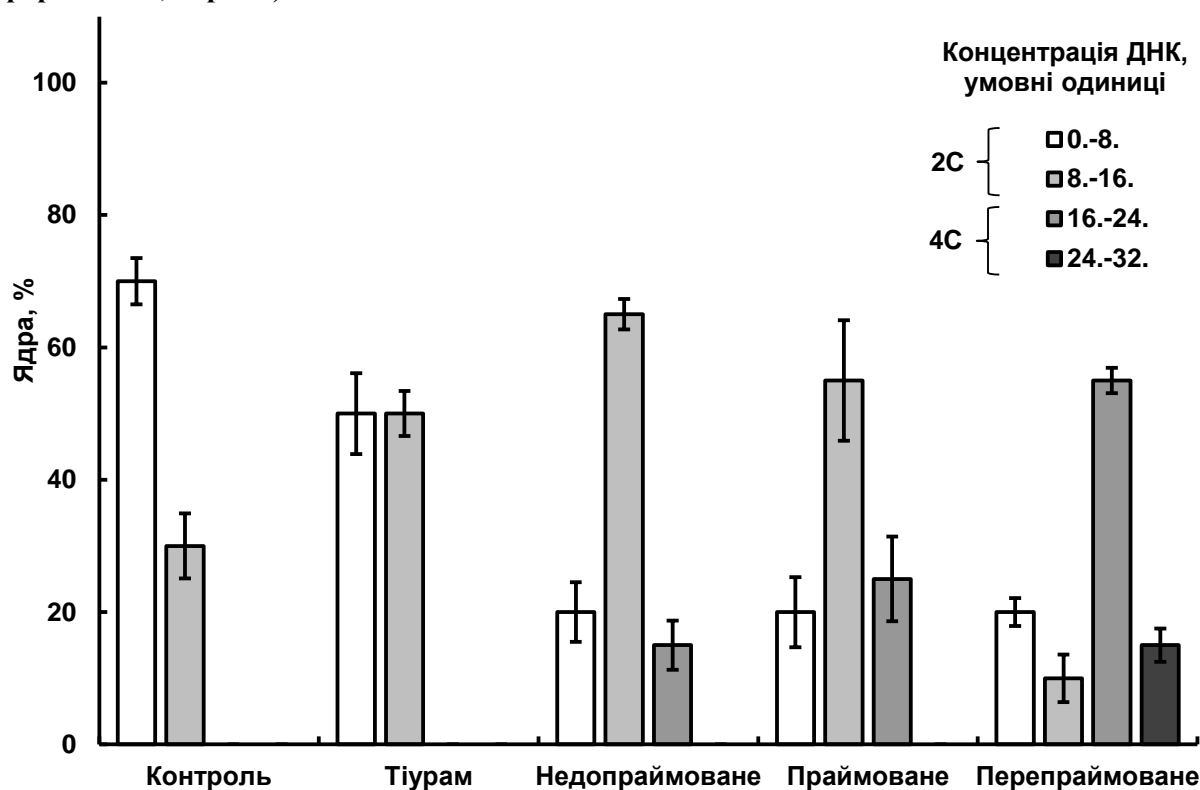


Рис. 2. Вміст ядерної ДНК в праймованому насінні цукрового буряку гібрида Дюк (24 год проростання, корінці).

ПОШУК МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Таблиця 3. Проростання насіння кормового буряку гібрида “Монако” після передпосівної обробки протягом 4 діб

| Варіант дослід, вологість % | Проростання, % | Аномальне насіння, % | Час проростання 50% насіння, год |
|-----------------------------|----------------|----------------------|----------------------------------|
| Контроль (14,0 %) | 79,3 | 8,0 | 134,9 |
| Недопраймоване (21,3 %) | 89,0 | 4,7 | 92,1 |
| Праймоване (25,0 %) | 84,0 | 8,3 | 77,2 |
| Перепраймоване (26,8%) | 87,0 | 12,0 | 60,1 |

Таблиця 4. Проростання насіння кормового буряку гібрида “Бікорес” після передпосівної обробки протягом 4 діб

| Варіант дослід, вологість % | Проростання, % | Аномальне насіння, % | Час проростання 50% насіння, год |
|-----------------------------|----------------|----------------------|----------------------------------|
| Контроль (14,0%) | 93,0 | 3,0 | 90,7 |
| Недопраймоване (22,5%) | 92,7 | 2,7 | 87,3 |
| Недопраймоване (23,7%) | 93,0 | 2,0 | 69,5 |
| Праймоване (25,0%) | 93,7 | 1,7 | 63,9 |
| Перепраймоване (26,3%) | 94,7 | 1,7 | 57,7 |
| Перепраймоване (27,5%) | 94,0 | 1,3 | 50,2 |

заниженою чи навпаки завищеною та небезпечною для якості деяких гібридів чи партій насіння. Це підтверджує необхідність знаходження універсального молекулярного маркера для оптимізації праймування насіння.

Були підібрані умови промислового праймування для насіння двох гібридів кормового буряку “Монако” та “Бікорес” та порівняно вплив недо- та перепраймування на схожість, швидкість проростання та кількість аномального насіння. Схожість праймованого насіння гібрида “Монако” підвищувалась з 79,3 до 87%, а час проростання 50% насіння скорочувався з 134,9 до 60,1 год (табл. 3). Для насіння гібрида “Бікорес” схожість насіння була стабільно високою – близько 94% а час проростання 50% насіння скоротився з 90,7 до 50,2 год (табл. 4).

Відсоток аномального насіння у гібрида “Монако” був значно вищим, ніж у гібрида “Бікорес” (8,0% порівняно із 3,0%). Причому у “Монако” внаслідок обробок він зростав до 12%. Цікаво відзначити, що під впливом однакових режимів праймування кількість аномального насіння у кормового буряку була вище, ніж у цукрового буряку.

Ми вивчили розподіл клітин зародків з різним вмістом ДНК у сухому насінні кормового буряку (висушеному після різних режимів праймування). Виявилось, що наявність більше 10% клітин зародків з 4С вмістом ДНК може бути показником того, що насіння є перепраймованим та навряд чи придатним для тривалого

зберігання. Дійсно, аналіз динаміки клітинного циклу при проростанні "перепраймованого" насіння гібрида “Монако” показав, що через 24 год після проростання більше 50% клітин закінчують реплікацію та вступають в мітоз (рис. 3), що збігається з динамікою, встановленою для перепраймованого насіння цукрового буряку.

Для перевірки цього припущення ми заклали експерименти з визначення впливу різних режимів праймування насіння на його життєздатність при тривалому зберіганні протягом року. Аналіз проводили кожні три місяці після закладання на зберігання (табл. 5). Під час зберігання показники проростання для контрольного насіння суттєво не змінювались (72-75%), тоді як динаміка життєздатності у обробленого насіння значно варіювала залежно від рівня праймування. Виявилось, що для "перепраймованого" насіння характерне накопичення аномального насіння при зберіганні і, що більш важливо – зниження життєздатності вже через три місяці зберігання. Суттєве зниження проростання встановлено також для насіння, обробленого в оптимальному (згідно з технологічним регламентом) режимі праймування. Таким чином, для кормового буряку гібрида “Монако” насіння зберігається без істотного зниження життєздатності тільки у варіанті «недопраймоване» насіння. Цей режим для гібрида “Монако” треба вважати оптимальним, особливо якщо насіння буде направлено на зберігання, а не висіяне одразу після передпосівної обробки.

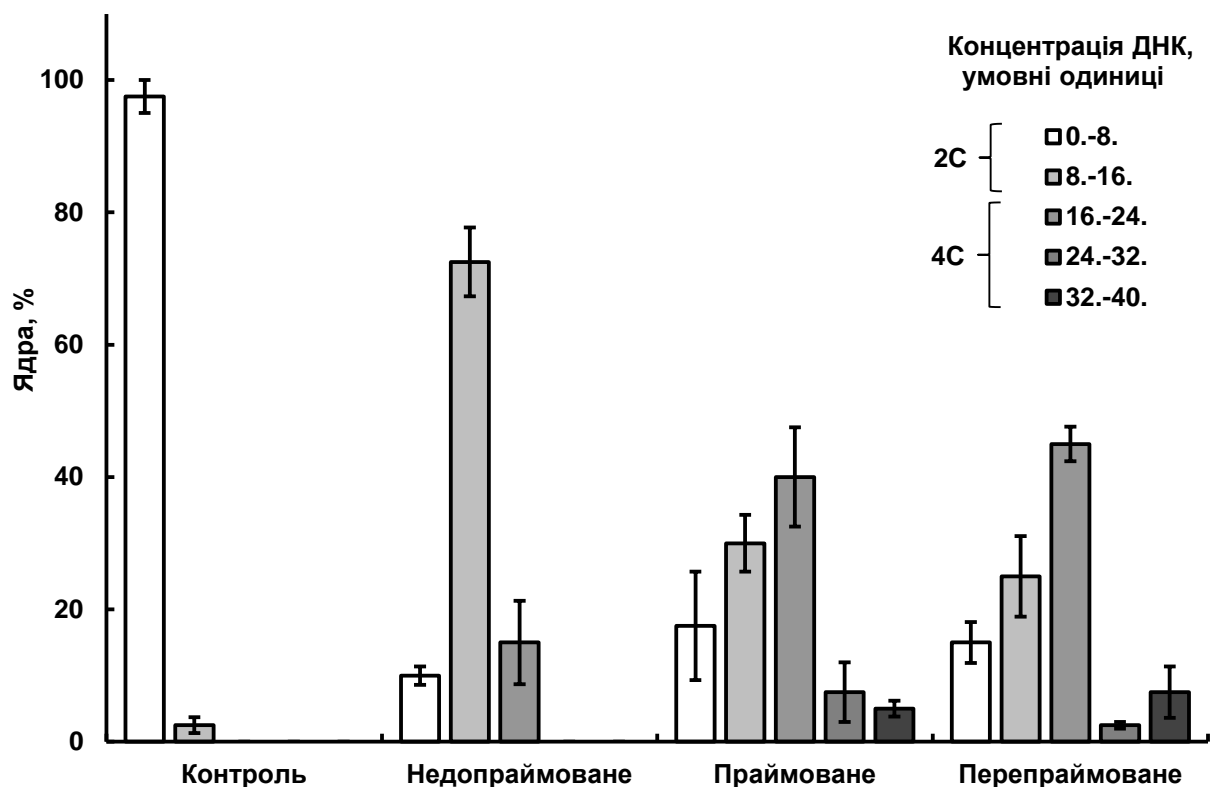


Рис. 3. Вміст ядерної ДНК в праймованому насінні кормового буряку гібрида "Монако" (корінці, 24 год проростання).

Нами також були розроблені протоколи для оптимізації праймування цибулі гібрида "Вайт Лісбон" та порівняно вплив недо- та перепраймування на його схожість, швидкість проростання та кількість аномального насіння. Встановлено, що схожість суттєво підвищувалась (з 83,7 до 90,0%) тільки у «перепраймованого» насіння. При цьому час для проростання 50% насіння (при 20°C) скорочувався з 72,0 до 34,6 год, а кількість аномального насіння зменшувалась з 9,7-10,3 до 5,3% (табл. 6).

За даними табл. 6 можна вважати, що протоколи для оптимального праймування цибулі можуть бути субоптимальними для гібрида "Вайт Лісбон", різноманітні показники життєздатності якого найвищі при «перепраймуванні». Щоб перевірити це припущення ми проаналізували темпи входження в S фазу зародків насіння цибулі після різних режимів праймування насіння і встановили розподіл клітин з різним вмістом ДНК в корінцях сухих зародків (рис. 4).

Отримані результати свідчать, що навіть у перепраймованого насіння цибулі кількість клітин, що перебувають в G₂ фазі клітинного циклу і містять подвоєну 4C ДНК, не перевищує 10%, тоді як цей відсоток є суттєво ниж-

чим у праймованого насіння. За аналогією з результатами досліджень з гібридами буряку наявність такого обмеженого числа клітин, що готові вступати в мітоз, не приводить до виходу зародків насіння з фази посухостійкості, і таке оброблене насіння має зберігатись тривалий час.

Відомо, що однією з основних причин втрати життєздатності насіння при зберіганні є накопичення в ДНК клітинах зародків одноткових розривів (Osborne, Boubriak, 1994; Гродзинский, 2012). Швидкість такого накопичення залежить від фізіологічного стану насіння та умов його зберігання, в першу чергу від температури та вологості зовнішнього середовища (Ventura et al., 2012; Boubriak et al., 2008). Насіння здатне зберігатись довше, якщо його зародки перебувають у фазі посухостійкості. Якщо під впливом підвищеної вологи насіння виходить з фази посухостійкості, то можливий запуск механізмів прискореного старіння і накопичення в клітинах зародків ушкоджень ДНК апоптозного типу (Osborne, Boubriak, 2002; Osborne et al., 2002). Однією з можливих причин виходу насіння з фази посухостійкості є накопичення в корінцях зародків значного відсотка клітин, що закінчили реплікацію ДНК (тобто з 4C вмістом

ПОШУК МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Таблиця 5. Проростання праймованого насіння кормового буряку гібрида “Монако” після зберігання при 25°C протягом 12 місяців

| Варіант досліджу | Проростання, % | Аномальне насіння, % | Час проростання 50% насіння, год |
|------------------|----------------|----------------------|----------------------------------|
| 3 міс | | | |
| Контроль | 75,3 | 5,3 | 96,3 |
| Недопраймоване | 81,3 | 3,3 | 91,5 |
| Праймоване | 78,3 | 9,3 | 80,0 |
| Перепраймоване | 68,0 | 25,0 | 66,4 |
| 6 міс | | | |
| Контроль | 72,8 | 5,4 | 98,7 |
| Недопраймоване | 83,0 | 3,6 | 92,5 |
| Праймоване | 81,3 | 5,7 | 81,0 |
| Перепраймоване | 64,7 | 22,7 | 69,7 |
| 9 міс | | | |
| Контроль | 73,6 | 5,9 | 101,9 |
| Недопраймоване | 79,0 | 3,0 | 98,3 |
| Праймоване | 68,0 | 11,7 | 83,8 |
| Перепраймоване | 53,0 | 27,7 | 72,6 |
| 12 міс | | | |
| Контроль | 72,3 | 6,2 | 109,3 |
| Недопраймоване | 81,7 | 4,0 | 105,6 |
| Праймоване | 63,4 | 12,7 | 82,6 |
| Перепраймоване | 50,3 | 33,0 | 72,0 |

Таблиця 6. Проростання насіння цибулі гібрида “Вайт Лісбон” після передпосівної обробки протягом 4 діб

| Варіант досліджу, вологість % | Проростання, % | Аномальне насіння, % | Час проростання 50% насіння, год |
|-------------------------------|----------------|----------------------|----------------------------------|
| Контроль (12,0%) | 83,7±2,7 | 9,7±1,9 | 72,0±4,6 |
| Недопраймоване (22,0%) | 86,0±1,9 | 10,3±1,2 | 51,2±3,1 |
| Праймоване (25,0%) | 83,7±3,1 | 9,7±0,8 | 41,9±2,2 |
| Перепраймоване (27,0%) | 90,0±2,2 | 5,3±0,9 | 34,6±1,6 |

ДНК), і початок мітозів. Таке насіння може ушкоджуватися на заключній фазі праймування – висушуванні, і в ньому можуть швидко накопичуватися значні рівні ушкоджень ДНК. Цілком ймовірно, що для гібрида цукрового буряку “Дюк” використаний режим “праймування”, а для гібрида кормового буряку “Монако” режим “перепраймування” виявились неоптимальними. Вони спричинили вихід насіння з фази посухостійкості, подальше накопичення пошкоджень ДНК зародків при висушуванні та часткову втрату життєздатності насіння при зберіганні. У той же час усі обробки для насіння цибулі “Вайт Лісбон” були субоптимально заниженими і тому не призвели до максимальної оптимізації його життєздатності.

Отримані результати свідчать, що при праймуванні насіння в клітинах корінців зародків ініціюється реплікація ДНК і вони рухаються по клітинному циклу з накопиченням частини клітин в G2 фазі. Це дало можливість вирішити поставлене завдання – пов’язати різні

режими праймування зі швидкістю накопичення клітин з 4С вмістом ДНК. Показано, що за оптимальних режимів праймування кількість клітин з 4С вмістом ДНК не повинна перевищувати 10% у кормового та 15% у цукрового буряку.

Таким чином, технологічні регламенти, що пропонуються у агропромисловому комплексі, в ряді випадків не досягають мети – максимальної оптимізації життєздатності насіння. І навіть в екстремальних випадках можуть призводити до погіршення якості насіння, що зберігається. Для різних видів і різновидів рослин оптимальні режими осмопраймування треба встановлювати емпірично (Beckers, Conrath, 2007). Проте попередні експерименти з оптимізації режимів праймування займають багато часу і потребують значних фінансових витрат (Доронін, 2009; Роїк та ін., 2010). Тому знаходження універсального молекулярного маркера, який би вказував на досягнення опти-

БУБРЯК та ін.

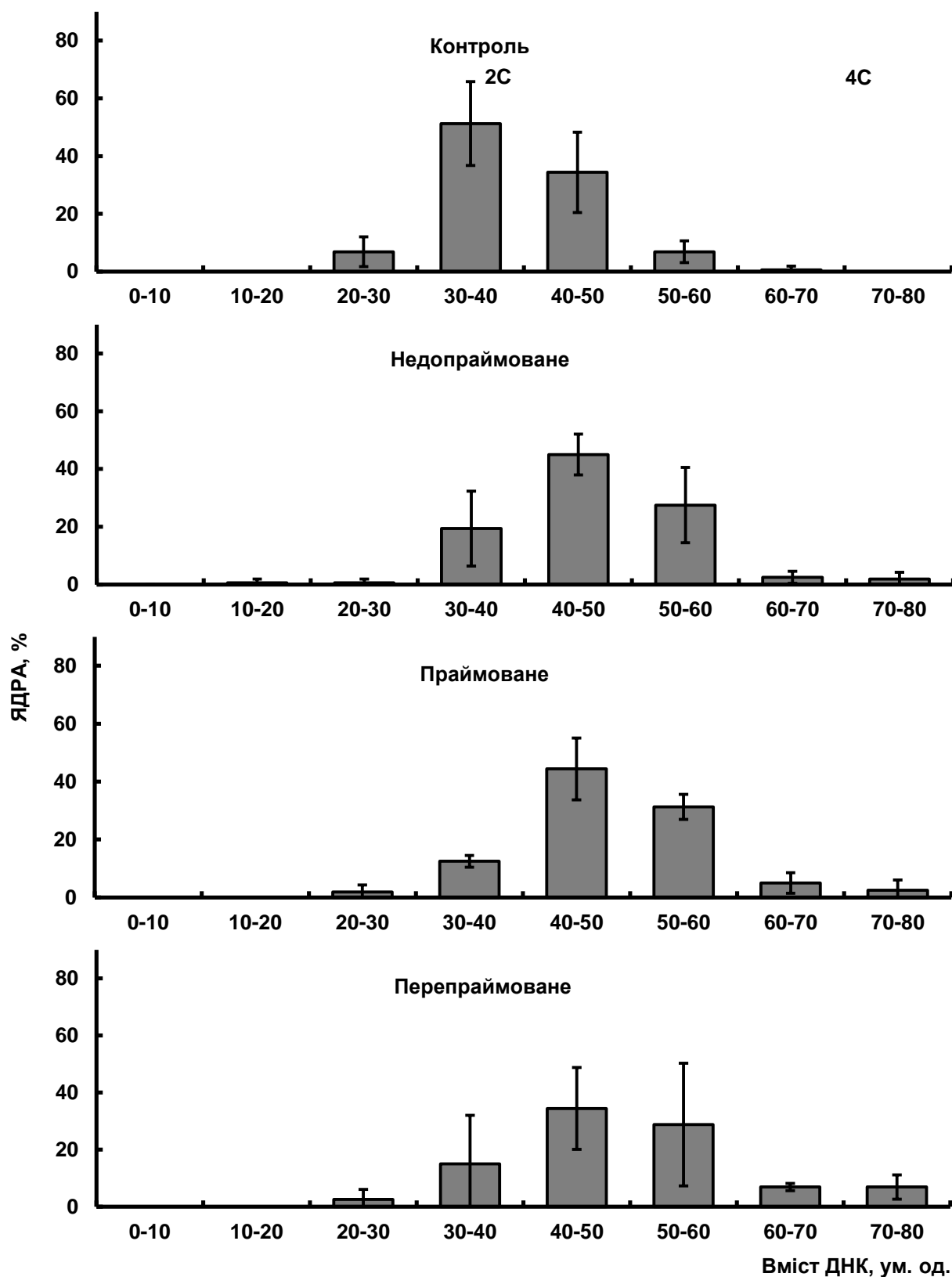


Рис. 4. Вміст ядерної ДНК в праймованому насінні цибулі гібрида “Вайт Лісбон” (корінці).

мального рівня обробки насіння під час праймування у

різних видів сільськогосподарських культур буде, без сумніву, значним досягненням для на-

сінневої промисловості (Beckers, Conrath, 2007; Vruse et al., 2007). Однак, відсоток клітин в G2 фазі, хоча і прямо корелює з рівнем праймування, навряд чи підходить як молекулярний маркер, оскільки його «оптимальні» значення іс-

точно відрізняються для різних гібридів рослин і не можуть гарантовано вказувати на момент втрати посухостійкості зародків. Тому ми плануємо продовжити пошуки молекулярного маркера і, зокрема, дослідити ефективність процесів репарації ДНК і експресії репараційних генів у насіння в нормі та під час праймування.

ЛІТЕРАТУРА

- Бубряк І., Костюк О., Науменко В., Маторіна А., Гродзинський Д. Опромінення як тест-фактор для виявлення потенціалу темної репарації ДНК насіння // Цитология и генетика. – 2001. – Т. 35, № 2. – С. 54-59.
- Бубряк О., Акімкіна Т., Дмитрієв О., Гродзинський Д., Бубряк І. Вміст ДНК в ядрах коріньків зародків насіння – як молекулярний маркер праймування насіння цукрового буряку // Доповіді НАН України. – 2012. – № 11. – С. 150-156.
- Гродзинский Д.М. Адаптивная стратегия физиологических процессов у растений (47-е Тимирязевское чтение 25 лет спустя). – Киев: Наук. думка. – 2013. – 303 с.
- Доронін В.А. Біологічні особливості формування гібридного насіння цукрових буряків та способи підвищення його врожайності і якості. – К.: Поліпром, 2009. – 299 с.
- Роїк М.В., Балан В.М., Бусол М.В. Технологія вирощування насіння цукрових буряків пересадним методом (методичні рекомендації). – К., 2010. – 27 с.
- 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 // Advances in Agronomy. – 2005. – V. 88. – P. 223-271.
- Barba-Espin G., Diaz-Vivancos P., Job D., Belghazi M., Job C., Hernández J.A. Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach // Plant Cell Environ. – 2011. – V. 34. – P. 1907-1919.
- Beckers G.J., Conrath U. Priming for stress resistance: From the lab to the field // Curr. Opin. Plant Biol. – 2007. – V. 10. – P. 425-431.
- 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. – V. 10. – P. 307-315.
- Boubriak I., McCready S., Osborne D. DNA structure and seed desiccation tolerance // Plant Desiccation Tolerance. Chapter 7 (Eds M. Jenks and A. Wood). N.Y.: Blackwell Publishing, 2008. – P. 215-249.
- Bruce T.J., Matthes M.C., Napier J.A., Pickett J.A. Stressful memories of plants: evidence and possible mechanisms // Plant Sci. – 2007. – V. 173. – P. 603-608.
- Catusse J., Meinhard J., Job C., Strub J.M., Fischer U., Pestsova E., Westhoff P., Van Dorsselaer A., Job D. Proteomics reveals potential biomarkers of seed vigor in sugarbeet // Proteomics. – 2011. – V. 11. – P. 1569-1580.
- Chen H., Chu P., Zhou Y., Li Y., Liu J., Ding Y., Tsang E., Jiang L., Wu K., Huang S. Overexpression of AtOOG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis* // Env. Exp. Bot. – 2012. – <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ers093>
- Huang Z., Boubriak I., Osborne D.J., Dong M., Gutterman Y. Possible role of pectin-containing mucilage and dew in repairing embryo DNA of seeds adapted to desert conditions // Ann. Bot. – 2008. – V. 101. – C. 277-283.
- Macovei A., Balestrazzi A., Confalonieri M., Fae M., Carbonera D. New insights on the barrel medic *MtOOG1* and *MtFPG* functions in relation to oxidative stress response in planta and during seed imbibition // Plant Physiol. Biochem. – 2011. – V. 49. – P. 1040-1050.
- Mukasa Y., Takahashi H., Taguchi K., Ogata N., Okazaki K., Tanaka M. 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 Product. Sci. – 2003. – № 6. – P. 74-82.
- Nakamune M., Hanada A., Yin Y., Matsukura C., Yamaguchi S., Ezura H. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short term low concentration salt-seed priming in tomato // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – V. 52. – P. 28-37.
- Osborne D., Boubriak I. DNA and desiccation tolerance // Seed Sci. Res. – 1994. – V. 4. – P. 175-185.
- Osborne D., Boubriak I. Life and death in the embryos of seeds // Agronomy Society New Zealand. – 2002. – № 12. – P. 33-38.
- 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 and H.Pritchard). – Cambridge: CABI Publishing, 2002. – P. 343-364.
- Paterson E., Heyes V. The use of seed priming to improve your sugar beet crop // Int. Sugar J. – 2011. – V. 113. – P. 131-133.
- Redfearn M., Osborne D.J. Effects of advancement on nucleic acids in sugarbeet (*Beta vulgaris*) seeds // Seed Sci. Res. – 1997. – V. 7. – P. 261-267.

БУБРЯК та ін.

Sliwinska E. Nuclear DNA replication and seed quality // *Seed Sci. Res.* – 2011. – V. 19. – P. 15-25.

Ventura L., Dona M., Macovei A., Carbonera D., Buttafava A., Mondoni A., Rossi G., Balestrazzi A. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor // *Plant Physiol. Biochem.* – 2012. – V. 60. – P. 196-206.

Yacoubi R., Job C., Belghazi M., Chaibi W., Job D. Toward characterizing seed vigor in alfalfa through proteomic analysis of germination and priming. // *J. Proteome Res.* – 2011. – № 10. – P. 3891-3903.

Надійшла до редакції
16.05.2013 р.

SEARCH FOR MOLECULAR MARKERS FOR OPTIMIZATION PRESOWING PROCESSING (PRIMING) OF SEEDS

O. A. Boubriak¹, T. V. Akimkina², O. P. Dmitriev³, D. M. Grodzinsky³, I. I. Boubriak^{1,3}

¹*Oxford University
(Oxford Great Britain)*

²*Oxford Brooks University
(Oxford, Great Britain)*

³*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering
National Academy of Science of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

The most effective technology known to improve seed vigor is a pre-sowing osmotic treatment - priming. It has been demonstrated that priming induces repair processes in seed embryo cells and at the end of these repair processes cell cycle is started. Changes in the content of DNA after different priming treatments were analyzed in embryo cell nuclei for sugar beet, red beet and onion. Significant differences in the number of cells that have reached G₂ phase at the end of treatment have been found, that lead to a substantial variations of primed seed viability during storage. It was established that under optimal levels of priming number of root cells in G₂ phase with 4C DNA content should not exceed 10% in the red beet and 15% in the sugar beet embryos. Despite the fact that percentage of embryo cells in G₂ phase correlates with the priming levels, this value cannot be used as a proper molecular marker for priming, because of significant variations of numbers even between different hybrids of the same species.

Key words: *Beta vulgaris, Allium cepa, seeds, priming levels, cell cycle, microdensitometry, DNA, molecular markers*

ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПРЕПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ (ПРАЙМИРОВАНИЯ) СЕМЯН

O. A. Бубряк¹, Т. В. Акимкина², А. П. Дмитриев³, Д. М. Гродзинский³, И. И. Бубряк^{1,3}

¹*Оксфордский Университет
(Оксфорд, Великобритания)*

²*Университет Оксфорд Брукс
(Оксфорд, Великобритания)*

³*Институт клеточной биологии и генетической инженерии
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Наиболее эффективной технологией повышения жизнеспособности семян является его предпосевная обработка осмотиками – праймирование. Показано, что праймирование индуцирует репарационные процессы в клетках зародышей, по завершении которых происходит запуск клеточного цикла. Проанализированы изменения содержания ДНК в ядрах клеток зародышей

ПОШУК МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

сахарной, кормовой свеклы и лука при различных обработках. Обнаружены значительные различия в количестве клеток, которые достигли G₂ фазы в конце обработки, что ведет к существенному варьированию жизнеспособности праймированных семян при хранении. Установлено, что при оптимальных уровнях праймирования сахарной и кормовой свеклы количество клеток в G₂ фазе с 4С содержанием ДНК не должно превышать 10% у кормовой и 15% у сахарной свеклы. Процент клеток в G₂ фазе, хотя и коррелирует с уровнем праймирования, неудобен в качестве молекулярного маркера праймирования, поскольку его «оптимальные» значения существенно отличаются даже для различных гибридов одного вида.

Ключевые слова: *Beta vulgaris*, *Allium cepa*, семена, режимы праймирования, клеточный цикл, микроденситометрия, ДНК, молекулярные маркеры