



УДК 633.16:581.142

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

Ефективність репараційних систем ДНК в оптимізації процесу праймування насіння цукрового та кормового буряку

Осмопраймування широко використовується для підвищення якості посівного матеріалу сільськогосподарських культур. Цей процес може бути значно вдосконалено, якщо вдасться визначити ризики, пов'язані з перепраймуванням насіння, і знайти надійні молекулярні маркери оптимізації передпосівних обробок. Проаналізовано ефекти різних режимів праймування цукрового та кормового буряку на стан ДНК у зародках насіння. Встановлено, що стимулюючі обробки призводять до підвищення вмісту високомолекулярної ДНК у клітинах за рахунок репарації ДНК. Однак під час висушування праймованого насіння відбувається накопичення деградованої (низькомолекулярної) ДНК, вміст якої пропорційний інтенсивності праймування. За співвідношенням високомолекулярної та низькомолекулярної ДНК у зародках обробленого насіння можна оцінювати якість праймування і передбачати (в певних межах) ризики перепраймування. Виявлено, що репаративний синтез ДНК у перші години проростання насіння відображає інтенсивність репарації пошкоджень ДНК, накопичених під час праймування. Ефективність репарації в обробленого насіння буряку можна тестувати внесенням додаткових пошкоджень у ДНК клітин зародків шляхом гамма-опромінення. Потенційна здатність репараційних систем до відновлення від таких додаткових ушкоджень ДНК разом із рівнем індукції ферменту ДНК-лігази I може бути надійним маркером оптимальності праймування насіння цукрового та кормового буряку.

Процес праймування насіння широко використовують насамперед для підвищення життєздатності зародків, а також щоб забезпечити формування рослинного покриву за несприятливих погодних умов [1, 2]. Такі передпосівні обробки зазвичай не тільки підвищують процент проростання насіння, але й прискорюють та синхронізують становлення сільськогосподарських культур, внаслідок чого підвищується їх врожайність. Найбільш поширеною технологією є осмопраймування, тобто обробка насіння розчинами з низьким водним потенціалом, що дає можливість контролювати кількість доступної для зародків води. Це досягається за рахунок використання різних розчинних солей (наприклад, калійної селітри) або

© І. І. Бубряк, О. П. Дмитрієв, О. А. Бубряк, Д. М. Гродзинський, Т. В. Акімкіна, 2014

поліетиленгліколю [3]. Процес праймування поки що недостатньо вивчений з молекулярної точки зору. Проте накопичується все більше інформації про біохімічні та клітинні процеси, викликані праймуванням. Встановлено, що праймування індукує початок клітинного циклу в клітинах зародків [4] і спричиняє підвищення синтезу білків під час проростання насіння, оскільки уможливорює заміщення пошкоджених рибосомальних рРНК. Показано, що праймування насіння томатів приводить до індукції генів, відповідальних за біосинтез гіберелінів (GA2ox1, GA3ox1 та GA3ox2), а також групи генів, що викликають модифікації клітинної стінки [5]. Виявлено вплив праймування на індукцію захисних реакцій проти окиснювального стресу. Так, під час праймування насіння соняшника відбувається синтез *de novo* мРНК каталази, а інгібітор цього ферменту — аміотріазол здатний пригнічувати позитивні ефекти праймування [6]. Праймування може підвищувати стійкість рослин до абіотичних стресів за рахунок так званої стресової пам'яті, що виникає внаслідок осмопраймування [7].

Але найбільш важливим процесом, що відбувається під час праймування, є індукція деяких репараційних ферментів та репарація ДНК, тобто звільнення генетичного матеріалу від ушкоджень, накопичених під час формування та зберігання насіння [8, 9]. Саме ефективність різних систем репарації ДНК у перші години проростання значною мірою визначає рівень життєздатності насіннєвих зародків і, як наслідок, якість посівного матеріалу.

Системи репарації ДНК, що функціонують у рослин та в насінні при праймуванні та проростанні, були нещодавно детально описані [9, 10]. До їх числа належать репарація окремих нуклеотидних основ ДНК (BER), ексцизійна репарація (NER), гомологічна рекомбінація (HR), негомологічне лігування кінців ДНК (NHEJ) та репарація ДНК, індукована короткими некодуючими РНК. Оскільки основними пошкодженнями ДНК під час зберігання насіння є її одониткові розриви та оксидативні пошкодження основ [11, 12], головна увага в наших дослідженнях приділялася саме цим процесам репарації ДНК — BER та NER. Найбільш критичним ферментом, необхідним для репарації одно- та двониткових пошкоджень ДНК, є ДНК-лігаза I. Саме цей фермент швидко втрачає активність при зберіганні сухого насіння, тому його індукція в зародках надзвичайно важлива при праймуванні чи проростанні зародків насіння [13].

Питання потенційних можливостей репаративних систем, на нашу думку, є критичним при дослідженні ефектів передпосівних обробок насіння. Дійсно, під час праймування насіння спостерігається активна репарація накопичених пошкоджень ДНК. Водночас при праймуванні відбувається індукція оксидативних пошкоджень ДНК, а на етапі висушування можливе привнесення одониткових розривів ДНК в клітини зародків. Тому важливо знати потенційну здатність репаративних систем праймованого насіння ліквідувати такі додаткові пошкодження ДНК.

Зручним методом внесення дозованого пошкодження ДНК клітин зародка є гамма-опромінення насіння. Відомо, що дозова залежність репарації ДНК має зазвичай певний оптимум — дозу, при якій інтенсивність репарації найвища. Логічно припустити, що рівень репарації пошкоджень ДНК після опромінення такою дозою відображає максимальні можливості репаративних систем. Гамма-опромінення вже використовували як тест-фактор для визначення потенціалу репарації ДНК у праймованому насінні [14]. Цей потенціал можна також визначати за рівнем індукції репараційних ферментів у різних умовах праймування.

Ми ставили за мету: а) виявити пошкодження ДНК, що накопичуються під час праймування насіння; б) дослідити активність репарації цих пошкоджень у праймованому насінні;

в) визначити зміни в індукції ферменту ДНК лігази I та оцінити потенціальну ефективність репараційних систем після різних режимів праймування.

Об'єктом досліджень були гібриди цукрового буряку “Мадісон” та кормового буряку “Монако”. Праймування проводили шляхом витримування насіння в герметичній камері з обертанням при 20 °С протягом 2–4 діб. Ступінь обробки варіював таким чином, що насіння 1-го варіанта на кінець обробки мало найнижчу вологість зародка (22%) — “недопраймоване насіння”, 2-го — проміжну (25%) — “оптимально праймоване насіння”, а 3-го — найвищу (29%) — “перепраймоване насіння”. Як контроль використовували необроблене насіння або насіння, оброблене фунгіцидом тіурамом (30 мкг/г), який промислово використовується при праймуванні буряку.

Пошкодження ДНК зародків визначали за допомогою нейтрального та лужного електрофорезу після екстракції ДНК з праймованого насіння цукрового та кормового буряку, з подальшим імідж-аналізом гелів на аналізаторі UVP за програмою “Gel Works”.

Репарацію ДНК вивчали, реєструючи позаплановий синтез ДНК у перші години проростання насіння, як описано раніше [14]. Гостре опромінення насіння здійснювали γ -променями ^{134}Cs на пристрої “Gravatron RX 30/55” (“Gravatom”, Великобританія) у дозах 200, 500, 800 та 1200 Гр (потужність дози 0,14 Гр/с).

Зміни вмісту репараційних білків під час праймування та опромінення вивчали на прикладі ДНК-лігази I за допомогою вестерн-блотингу. Для цього 30 мкг білка зародків цукрового буряку кожного зразка розділяли на білковому електрофорезі на 12% Bis-Tris готовому гелі (“Invitrogen”, Великобританія). Білки переносили на мембрану PVDF (Immobilon-P, “Millipore”, США) на приладі Mini Protean II Cell (2,5 год, 200 мА, 4 °С). Мембрани блокували у фосфатному буфері з 5% знежиреного молока та 0,02% азиду натрію протягом 3 год. Далі мембрани інкубували з антитілами до ДНК лігази (розведення 1 : 1000) протягом 12 год при 4 °С. Після інкубації з вторинними антитілами, кон'югованими до пероксидази (“Sigma”) (розведення 1 : 3000), мембрани тестували, використовуючи високочутливу хемілюмінесцентну систему ECL-Plus (“Amersham”). Іміджі мембран також аналізували на імідж-аналізаторі UVP за програмою “Gel Works”.

Пошкодження ДНК під час процесу праймування. Відомо, що процес праймування в промисловості складається з двох етапів: 1) інкубування насіння (з перемішуванням) при вибраному осмотичному тиску протягом встановленого часу; 2) висушування насіння після закінчення процесу праймування. Нами встановлено, що при цьому відбуваються два протилежні процеси, а саме: збільшення вмісту високомолекулярної ДНК на першому етапі праймування насіння і деградація ДНК з накопиченням низькомолекулярної фракції ДНК під час його висушування. Збільшення вмісту високомолекулярної ДНК у праймованому насінні можна пояснити активним процесом репарації ДНК у присутності обмеженої вологи, тоді як деградація ДНК при висушуванні здійснюється в основному в клітинах зародків, що вийшли з фази посухостійкості під час праймування.

Накопичення високо- та низькомолекулярної фракції ДНК залежить від режимів праймування насіння цукрового буряку (табл. 1). Легко бачити, що кількість високомолекулярної ДНК під час праймування зростає в усіх зразках насіння. Причому різниця в співвідношенні високо- та низькомолекулярної (В/Н) ДНК більш виражена на лужних гелях, що свідчить про наявність не тільки дwonиткових, але й одnonиткових розривів ДНК. Зі зростанням інтенсивності праймування зростає також кількість деградованої ДНК у зразках. Найбільшу кількість низькомолекулярної ДНК знайдено в перепраймованому насінні цукрового буряку. За співвідношенням В/Н ми намагалися дати оцінку якості праймуван-

ня. Так, для цукрового буряку (на лужних гелях) співвідношення В/Н коливається від 0,11 до 0,24 ум. од., причому найвищий показник (0,24) зафіксовано в оптимально праймованого насіння. Тобто ефект репарації ДНК є домінуючим порівняно з деградацією ДНК при висушуванні насіння. Цікаво, що для перепраймованого насіння гібрида “Мадісон” цей показник тільки незначно нижчий, причому власне кількість високомолекулярної ДНК у перепраймованому насінні досягає максимуму. Це дає підставу зробити висновок, що в дійсності насіння цього гібрида можна праймувати більш інтенсивно.

Дещо інші дані отримані для кормового буряку (див. табл. 1). Цікаво, що і в цьому випадку значно менша різниця виявлена між недопраймованим та оптимально праймованим насінням, тоді як перепраймоване має дуже низьке співвідношення В/Н — 0,14. Такий низький показник співвідношення В/Н ДНК може виступати маркером перепраймування насіннєвого матеріалу, яке спостерігається для гібрида “Монако”.

Репарація ДНК під час процесу праймування. Для з’ясування впливу стимулюючих обробок на репарацію ДНК зародків насіння цукрового буряку вивчали включення ^3H -тимідину в ДНК у перші години їх проростання. Раніше встановлено, що вже на 2-гу год проростання включення ^3H -тимідину в ДНК недопраймованого, оптимально праймованого та перепраймованого насіння зростає на 19, 55 та 166% відповідно [14]. Схожі дані були отримані і для кормового буряку, у якого включення ^3H -тимідину в ДНК становить 13, 42 та 101% у різних варіантах обробки порівняно з контролем. Отже, всі режими праймування насіння призводять до істотного позапланового синтезу ДНК у цукрового та кормового буряку. Експерименти із специфічним інгібітором α -полімерази — афідіколіном (АФ) показали, що його інгібуючий вплив виявляється тільки в насінні цукрового буряку з найвищою

Таблиця 1. Рівень фрагментації ДНК зародків цукрового та кормового буряку після передпосівної обробки насіння різної тривалості

Варіант досліджу	Вміст ДНК, нейтральний гель (ум. од.)			Вміст ДНК, лужний гель (ум. од.)		
	Високомолекулярна ДНК	Низькомолекулярна ДНК	Співвідношення В/Н	Високомолекулярна ДНК	Низькомолекулярна ДНК	Співвідношення В/Н
Цукровий буряк “Мадісон”						
Контроль	—	—	—	1,18	9,34	0,13
Тіурам	—	—	—	1,23	11,37	0,11
Недопраймоване насіння	2,07	16,14	0,13	2,36	12,56	0,19
Оптимально праймоване насіння	2,57	29,17	0,09	5,48	22,37	0,24
Перепраймоване насіння	2,94	32,67	0,09	5,69	24,76	0,23
Кормовий буряк “Монако”						
Контроль	—	—	—	1,12	7,26	0,15
Тіурам	—	—	—	1,24	8,37	0,15
Недопраймоване насіння	2,21	19,38	0,11	2,99	14,36	0,21
Оптимально праймоване насіння	2,68	24,22	0,11	4,98	21,37	0,23
Перепраймоване насіння	2,92	42,17	0,07	5,22	38,16	0,14

вологістю зародків (перепраймування) на 6-ту год проростання [14]. У кормового буряку на цей же час близько 18% включення ^3H -тимідину відбувається за рахунок функціонування α -полімерази в оптимально праймованого насіння, а в зародках перепраймованого насіння цей показник становить 40% (табл. 2). Таким чином, схожі рівні праймування викликають початок реплікації (та вихід зародків з фази засухостійкості) значно швидше у кормового, ніж у цукрового буряку. Одержані дані по включенню міченого тимідину в ДНК та вмісту ДНК на клітину свідчать про те, що зародки праймованого насіння частково виходять зі стану спокою протягом стимулюючих обробок і в них активізуються процеси репарації ДНК. При цьому в перепраймованого насіння (з найвищою вологістю зародків) ці процеси виражені сильніше. Тобто умови праймування насіння є сприятливими для проходження темної репарації ДНК, найвища інтенсивність якої і була зафіксована у перепраймованого насіння. Очевидно, що підвищений рівень репаративного синтезу ДНК при проростанні праймованого насіння також відображає необхідність репарації ДНК пошкоджень, що накопичились під час праймування.

Ефективність та потенціал репараційних процесів у праймованому насінні. Підвищений рівень репараційного синтезу ДНК при проростанні праймованого насіння може не стільки відображати ефективність репарації ДНК, скільки бути відображенням репарації ДНК накопичених при праймуванні пошкоджень ДНК. Тому становило інтерес з'ясувати — якою мірою попередня обробка насіння здатна реалізувати потенціал репарації ДНК. Використовуючи гамма-опромінення як джерело додаткових пошкоджень ДНК, ми встановили різну форму дозових кривих для оптимально праймованого і перепраймованого насіння цукрового буряку. Якщо для оптимально праймованого насіння була зафіксована класична дозова залежність репарації ДНК з максимумом при дозі опромінення 200 Гр, то для перепраймування форму дозової залежності інтенсивності репарації ДНК можна назвати монотонно спадною з максимумом в області дуже низьких доз. При цьому треба наголосити, що в нормі (тобто без додаткових пошкоджень ДНК від гамма-опромінення) саме цей варіант обробки мав найвищий рівень репаративного синтезу ДНК (у 8 разів вищий за контроль). На нашу думку, відсутність зростання інтенсивності репарації ДНК при опроміненні в перепраймованого насіння свідчить про свого роду виснаження його репаративних систем і, як наслідок, неспроможність репарувати додаткові пошкодження ДНК. Таким чином, застосування гострого гамма-опромінення є зручним підходом для з'ясування потенціалу репарації ДНК у зародків насіння, а за цим показником і якості праймування. Дійсно, для

Таблиця 2. Позаплановий синтез ДНК у перші години проростання зародків кормового буряку ("Монако") після передпосівної обробки насіння різної тривалості

Варіант досліджу	Радіоактивність, розпад $\cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мкг}^{-1}$ ДНК				
	1 год	2 год		6 год	
	–АФ	–АФ	+АФ	–АФ	+АФ
Контроль	218 $\pm$ 18	769 $\pm$ 68	681 $\pm$ 50	1775 $\pm$ 120	1576 $\pm$ 160
Тіурам	229 $\pm$ 34	668 $\pm$ 48	581 $\pm$ 30	1541 $\pm$ 210	1642 $\pm$ 124
Недопраймоване насіння	337 $\pm$ 56	840 $\pm$ 108	853 $\pm$ 112	3122 $\pm$ 340	3015 $\pm$ 196
Оптимально праймоване насіння	411 $\pm$ 38	1033 $\pm$ 89	972 $\pm$ 84	3651 $\pm$ 210	3008 $\pm$ 364
Перепраймоване насіння	756 $\pm$ 44	1164 $\pm$ 101	1034 $\pm$ 88	7025 $\pm$ 227	4265 $\pm$ 627

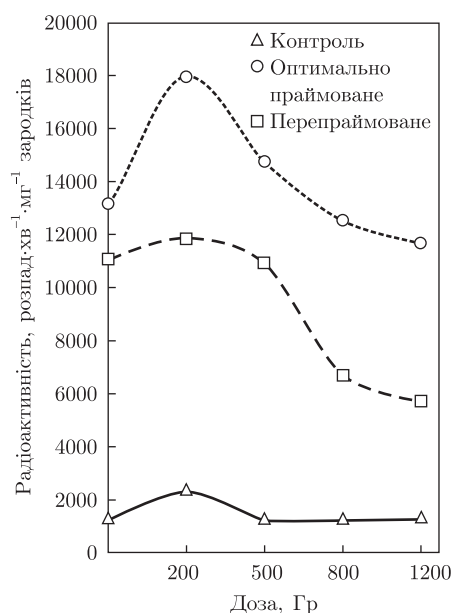


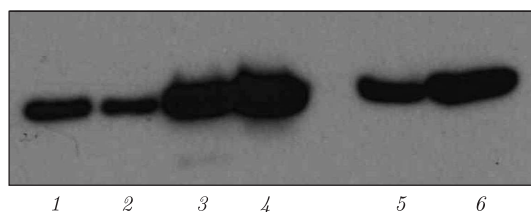
Рис. 1. Ефективність репарації ДНК при проростанні опромінених зародків праймованого насіння кормового буряку “Монако”

цукрового буряку гібрида “Мадісон” режим перепраймування не є критичним в оптимальних умовах. У цього насіння рівень репарації ДНК при проростанні є найвищим і таким, що здатний справлятися з потоком пошкоджень ДНК від власне праймування. Але якщо таке насіння попаде в субоптимальні умови проростання, тобто під додатковий стрес, то його життєздатність може значно зменшитися. Звідси найбільш надійним режимом праймування буде не той, що показує найвищу репаративну активність при проростанні, а той, що має найбільшу потенційну здатність реагувати посиленням репарації ДНК на додатковий стрес.

Таке припущення було перевірене та знайшло підтвердження на праймованому насінні кормового буряку (рис. 1), у якого також спостерігається типова дозова крива для необробленого насіння з максимумом репарації при дозі 200 Гр. Але в цьому випадку найвищий рівень репарації ДНК зафіксовано в праймованого (а не перепраймованого) насіння. Більш того, і потенційна здатність репарувати додатковий потік пошкоджень ДНК від опромінення зафіксована в праймованого матеріалу, що підтверджує раніше встановлений нами факт шкідливості використаного в експериментах режиму перепраймування для кормового буряку “Монако”.

Індукція репараційних білків у зародках цукрового буряку після різних рівнів праймування та опромінення. Ексцизійна репарація ДНК, як відомо, складається з чотирьох етапів: знаходження пошкодження ендонуклеазами, розчищення ДНК у місці пошкодження екзонуклеазами, відбудови ДНК ДНК-полімеразами і заключного — зшивання ДНК (лігування) ДНК-лігазами. Останній етап може бути критичним, оскільки відомо, що один із перших ферментів, який втрачає активність у насінні, є ДНК-лігаза I [15]. Саме за відсутності лігуючої активності в клітинах зародків відбувається накопичення як одониткових, так і двониткових пошкоджень ДНК і спостерігається втрата життєздатності насіння.

Тому ми вирішили дослідити зв'язок ефективності репараційного процесу в насінні з рівнями вмісту ДНК-лігази I. Встановлено, що, незважаючи на достатньо високий конституційний вміст цього ферменту в насінні, його рівень зростає як при опроміненні насіння



Лінія	Варіант досліджу	Відносна кількість ДНК-лігази I
1	Контроль насіння	201
2	Недопраймоване насіння	177
3	Оптимально праймоване насіння	480
4	Перепраймоване насіння	534
5	Необроблене насіння, 100 Гр	262
6	Необроблене насіння, 200 Гр	436

Рис. 2. Вміст ДНК-лігази I у зародках праймованого та опроміненого насіння цукрового буряку “Мадісон”

в різних дозах, так і внаслідок праймування (рис. 2). При цьому кількість ДНК-лігази I у насінні цукрового буряку зростає при опроміненні в дозах до 200 Гр, що узгоджується з дозовою кривою репарації ДНК у насінні. Але зростання є ще більш значним у праймованого насіння буряку, причому як оптимально праймоване, так і перепраймоване насіння мають близькі (та підвищені) значення вмісту ДНК-лігази I. Отже, вміст ДНК-лігази I корелює з інтенсивністю репарації ДНК у насінні цукрового буряку і підвищений вміст цього ферменту вказує на інтенсивний процес репарації ДНК, який, у свою чергу, корелює з життєздатністю насіння після праймування. В той же час показники рівня ДНК-лігази I не корелюють з потенціалом репараційних систем, а є відображенням інтенсивності процесу репарації ДНК, що відбувається в клітинах.

Аналіз впливу різних режимів праймування насіння цукрового та кормового буряку на стан ДНК показує, що стимулюючі обробки призводять до підвищення вмісту високомолекулярної ДНК у клітинах зародків. Однак під час висушування праймованого насіння відбувається накопичення деградованої, низькомолекулярної ДНК, вміст якої пропорційний інтенсивності праймування. За співвідношенням В/Н ДНК у зародках обробленого насіння можна оцінювати якість праймування, але такий маркер можна використовувати тільки по закінченні процесу праймування і він не є достатньо чутливим.

Одержані дані свідчать про те, що позаплановий синтез ДНК, який відбувається під час проростання праймованого насіння буряку в перші 2 год, є саме репаративним синтезом і його рівень відображає інтенсивність репарації пошкоджень ДНК, накопичених під час праймування. Ефективність репарації в обробленого насіння цукрового буряку можна тестувати внесенням додаткових пошкоджень ДНК у зародки насіння шляхом гамма-опромінення. Потенційна здатність репараційних систем до відновлення від додаткових ушкоджень ДНК разом з рівнем індукції ферменту ДНК-лігази I може бути надійним маркером оптимальності праймування насіння цукрового та кормового буряку.

1. Bradford K. J. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions // Hort. Sci. – 1986. – 21. – P. 1105–1112.

2. Paterson E., Heyes V. The use of seed priming to improve your sugar beet crop // Int. Sugar J. – 2011. – **113**. – P. 131–133.
3. 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.
4. Бубряк О. А., Акімкіна Т. В., Дмитрієв О. П., Гродзинський Д. М., Бубряк І. І. Вміст ДНК в ядрах корінців зародків насіння – як молекулярний маркер праймування насіння цукрового буряку // Доп. НАН України. – 2012. – № 11. – С. 150–156.
5. Nakamune M., Hanada A., Yin Y. et al. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short term low concentration salt-seed priming in tomato // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – **52**. – P. 28–37.
6. Kibinza S., Bazin J., Bailly C. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from aging during priming // Plant Sci. – 2011. – **181**. – P. 309–315.
7. Chen K., Arora R. Priming memory invokes seed stress-tolerance // Env. Exp. Bot. – 2013. – **94**. – P. 33–45.
8. Redfearn M., Osborne D. J. Effects of advancement on nucleic acids in sugarbeet (*Beta vulgaris*) seeds // Seed Sci. Res. – 1997. – **7**. – P. 261–267.
9. Ventura L., Dona M., Macovei A. et al. Understanding the molecular pathways associated with seed vigor // Plant Physiol. Biochem. – 2012. – **60**. – P. 196–206.
10. Waterworth W., Drury G., Bray C., West C. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together // New Phytologist. – 2011. – **192**. – P. 805–822.
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. Macovei A., Balestrazzi A., Confalonieri M., Carbonera D. The Tdp1 (tyrosyl-DNA phosphodiesterase) gene family in *Medicago truncatula* Gaertn.: bioinformatic investigation and expression profiles in response to copper-and PEG-mediated stress // Planta. – 2010. – **232**. – P. 393–407.
13. Andreuzza S., Li J., Guitton A. et al. DNA ligase I exerts a maternal effect on seed development in *Arabidopsis thaliana* // Development. – 2010. – **137**. – P. 73–81.
14. 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. – **35**. – С. 54–59.
15. Elder R. H., Dellaquila A., Mezzina M. et al. DNA-ligase in repair and replication in the embryos of rye, *Secale-Cereale* // Mutat. Res. – 1987. – **161**. – P. 61–71.

Оксфордський університет, Великобританія
 Інститут клітинної біології
 та генетичної інженерії НАН України, Київ
 Фармстор, Москва, Росія

Надійшло до редакції 01.11.2013

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

Эффективность репарационных систем ДНК в оптимизации процесса праймирования семян сахарной и кормовой свеклы

Осмораймирование широко используют в мире для повышения качества семенного материала сельскохозяйственных культур. Этот процесс можно существенно улучшить, если удастся определить риски, связанные с перепраймированием семян, и найти надежные молекулярные маркеры оптимизации предпосевных обработок. Проанализированы эффекты разных режимов праймирования сахарной и кормовой свеклы на состояние ДНК в зародышах

семян. Установлено, что стимулирующие обработки приводят к повышению содержания высокомолекулярной ДНК в клетках за счет репарации ДНК. Однако во время высушивания праймированных семян происходит накопление деградированной (низкомолекулярной) ДНК, содержание которой пропорционально интенсивности праймирования. По соотношению высокомолекулярной и низкомолекулярной ДНК в зародышах обработанных семян можно оценить качество праймирования и предсказать (в определенных рамках) риски перепраймирования. Выявлено, что репаративный синтез ДНК в первые часы прорастания семян отражает интенсивность репарации повреждений ДНК, накопленных в процессе праймирования. Эффективность репарации у обработанных семян свеклы можно тестировать внесением дополнительных повреждений в ДНК клеток зародышей с помощью гамма-облучения. Потенциальная способность репарационных систем восстанавливать ДНК от таких дополнительных повреждений вместе с определением уровня индукции фермента ДНК-лигазы I может служить надежным маркером оптимальности праймирования семян сахарной и кормовой свеклы.

I. I. Boubriak, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **O. P. Dmitriev**,
O. A. Boubriak, Academician of the NAS of Ukraine **D. M. Grodzinsky**,
T. V. Akimkina

Efficiency of DNA repair systems in the optimization of the seed priming process in sugar and red beet

Osmopriming is widely used in the world to improve the seed material quality of agricultural and horticultural species. This process can be further tuned, if we can identify risks from overpriming and find reliable molecular markers for the priming optimization. We analyzed an integrity of DNA after different regimes of priming for sugar and red beet. It turned out that all treatments lead to an increased level of high molecular weight DNA in cells because of the DNA repair function. However, during the drying of primed seed, we also see the accumulation of degraded (low molecular weight) DNA, whose concentration is proportional to the priming intensity. Using the ratio content values of high to low molecular weight DNA in the embryos of treated seeds, it is possible to estimate the priming quality and predict (to a certain extent) the risk of overpriming. It is also shown that the reparative DNA synthesis in the first hours of germination reflects the DNA repair intensity for the damage accumulated during priming. Efficiency of repair in primed beet seed can be tested by the introduction of an additional DNA damage into embryo cells via gamma-irradiation. Potential capability of repair systems to recover from such additional DNA damage together with measurements of DNA-ligase I induction can be used as a reliable molecular marker for the priming optimization of sugar and red beet.