

Національна академія наук України
Національна академія аграрних наук України
Національна академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ДОСЯГНЕННЯ І ПРОБЛЕМИ ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОСТИЖЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ
ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ

ACHIEVEMENTS AND PROBLEMS
OF GENETICS, BREEDING
AND BIOTECHNOLOGY

*Збірник наукових праць
IX з'їзду УТГіС*

ТОМ 4

***Присвячено:
125- річчю від дня народження М.І.Вавилова***

Київ
ЛОГОС – 2012

ББК 28.04я43

Д70

УДК 578.08+631.52

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Кунах В.А. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ (головний редактор); Дубровна О.В. – д-р біол. наук (заст.головного редактора); Блюм Я.Б. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Вагіна І.М. – канд. біол. наук; Єльська Г.В., д-р біол. наук, академік НАНУ; Кучук М.В. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Лялько І.І. – канд. біол. наук; Лукаш Л.Л. – д-р біол. наук; Малюта С.С. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Михайлов В.Г. – д-р с.-г. наук, чл.-кор. НААНУ; Моргун В.В. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Сиволап Ю.М. – д-р біол. наук, академік НААНУ; Созінов О.О. – д-р біол. наук, академік НАНУ

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол № 2 від 10 травня 2012 р.)

Д70 **Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології:**
зб. наук. пр. / НАН України, НААН України, НАМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Логос, 2012.

Т. 4: Присвячено 125-річчю від дня народження М.І.Вавилова.– 2012.– 660 с.: іл.– укр., рос.– бібліогр. В кінці ст.

ISBN 978-966-171-543-0 (Т. 4).

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 125-річчю від дня народження М.І.Вавилова. В оглядових, теоретичних і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямів генетики, селекції та біотехнології різних організмів (рослин, тварин, мікроорганізмів); загальної, молекулярної, біохімічної, медичної, екологічної генетики; результати аналізу та оцінки генетичних ресурсів. Висвітлено також актуальні питання використання ДНК-технологій і молекулярних маркерів у селекції рослин і тварин, генетики людини та медичної генетики.

Для спеціалістів у галузі генетики, селекції, біотехнології, екології, а також викладачів і студентів вищих навчальних закладів III-IV рівнів акредитації.

ББК 28.04я43+41.3я43

ISBN 978-966-171-543-0

© Українське товариство генетиків
і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2012

АДАМОВСКАЯ В.Г.¹, МОЛОДЧЕНКОВА О.О.¹, СИЧКАРЬ В.И.¹,
САГАЙДАК Т.В.¹, ЛАВРОВА Г.Д.¹, ХОРСУН И.А.¹, ТИХОНОВ П.С.²

¹ Селекционно-генетический институт-Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААНУ Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дорога 3, e-mail: olgatomod@ukr.net

² Одесский государственный аграрный университет
Украина, 65012, Одесса, ул. Пантелеймоновская, 13

ПОЛИМОРФИЗМ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА 7S И 11S ГЛОБУЛИНОВ СЕМЯН СОИ

Основным биохимическим компонентом семян сои является белок. По данным литературы и нашим данным [1-3], в семенах сои может накапливаться в среднем от 30 до 50 % белка. Исходя из этого, сои отводится исключительная роль в решении проблемы белка во всех странах мира, в том числе и на Украине. Соевые белки неоднородны по структуре и функциональным свойствам.

Сорта сои различаются не только по суммарному содержанию белка, но и по содержанию конкретных фракций белка, а именно 7S и 11S глобулинов. Большую часть соевого белка (около 70%) составляют запасные белки 7S глобулины (β -конглицинины) и 11S глобулины (глицинины). Показано, что они различаются по аминокислотному составу, а также характеризуются неодинаковыми функциональными свойствами [4-6]. Поэтому не из каждого сорта можно получить продукты с заданными технологическими характеристиками.

Глобулины семян сои характеризуются как стабильностью, так и значительной вариабельностью [7]. Стабильными они являются по тому, что фенотипическое их выражение (электрофоретические спектры 7 S и 11S глобулинов) практически не зависят от условий выращивания. Изменчивость же на генетическом уровне в эволюционном смысле заключается в том, что частота нелетальных точечных мутаций у них может достигать значительно большего уровня, чем у функциональных белков. Благодаря этому их можно использовать в качестве генетических маркеров [8].

Методом электрофореза в полиакриламидном геле нами ранее был изучен компонентный состав 7S и 11S глобулинов, что позволило выявить сортовые различия по компонентному составу этих белков [9]. По всей видимости, выявление межсортового полиморфизма 7S и 11S глобулиновых белков совместно с изучением их функциональных свойств, даст воз-

возможность селекционерам вести целенаправленную селекцию по созданию сортов с заданными технологическими параметрами. Исходя из этого, целью настоящей работы было изучение полиморфизма компонентного состава

7S и 11S глобулинов семян сои и характера их наследования у гибридов, созданных с использованием родительских форм разного генетического происхождения.

Исследования проводились на 9 сортах сои (*Glycine max*, L.) (Аметист, Ольса, Куйбышевская 77, Аполлон, Паркер, Устя, Вилана, Степовичка 4, Юрьевка и Изумрудная) разного генетического происхождения и 5 гибридных комбинаций, созданных на их основе (растениях F_1 , семена F_2). Материал был предоставлен отделом селекции, генетики и семеноводства зернобобовых культур СГИ-ИЦНС.

В лабораторных исследованиях использовались стандартные для Украины и модифицированные в нашей лаборатории методы биохимического анализа. Содержание белка определяли методом Къельдаля на анализаторе Kejltec Auto 1030, фракционный состав белков семян сои определялся по методу Осборна [10] в нашей модификации, выделение, очистку и идентификацию 7S и 11S глобулинов сои проводили методом, разработанным в лаборатории [11]. В связи с недостаточным количеством исходного материала количественное содержание 7S и 11S глобулиновых белков у гибридов и их родительских форм не определялось. Поэтому в основу отбора гибридных популяций было положено количественное содержание белка у родительских форм, а именно: высокое, среднее и сравнительно низкое для сои содержание белка. Электрофорез белков проводили в 15% ПААГ, содержащем 1% SDS, с использованием прибора фирмы Нем-Hoff. В качестве маркеров использовали следующую белковую смесь: 97 кДа – фосфорилаза В, 67 кДа – бычий сывороточный альбумин, 43 кДа – альбумин яичный, 30 кД – карбоангидраза, 20 кДа – ингибитор трипсина, 14,4 кДа – лактальбумин. В таблицах представлены результаты средних арифметических из трех аналитических повторностей. Статистическая обработка проведена по общепринятым методам с использованием стандартных программ математического обеспечения.

Как видно из таблицы 1, взятые в изучение родительские формы значительно различались по содержанию белка. Проведенный анализ содержания белка семян гибридов позволил отметить следующее: из пяти гибридных популяций, только у одной (Аметист×Ольса) содержание белка было выше, чем у обоих родителей, а в других гибридных комбинациях содержание белка было ниже (Куйбышевская77×Аполлон) или характеризовалось промежуточным типом наследования с отклонением в сторону более низкobelкового родителя. Аналогичные результаты были получены и другими авторами [2].

Таблица 1.

Содержание белка в семенах гибридов и их родительских форм сои

№	Родительские формы	Белок, %	Гибриды	Белок, %
1	Аметист	38,67	Аметист х Ольса	39,65
2	Ольса	38,86		
3	Куйбышевская 77	42,11	Куйбышевская 77 х Аполлон	40,10
4	Аполлон	41,13		
5	Паркер	35,72	Паркер х Устя	36,40
6	Устя	38,34		
7	Вилана	36,10	Вилана х Степовичка 4	36,87
8	Степовичка 4	38,00		
9	Юрьевка х Изумрудная	39,20	Вилана х Юрьевка х Степовичка 4	38,34
	Среднее	38,68 ± 0,68		38,27 ± 0,73
	max	42,11		40,10
	min	35,72		36,40

Определение полиморфизма запасных белков методом электрофореза, показало, что генетические особенности взятых в изучение сортов сои оказывают влияние на уровень гетерогенности и интенсивности полос компонентного состава 7S и 11S глобулиновых белков сортов и гибридных популяций, созданных на их основе. По данным электрофоретического анализа, спектр 7S глобулинов, в зависимости от сорта, состоит из 12-19 белковых компонентов, а в электрофоретическом спектре 11S глобулинов их количество находится в интервале 14-17 компонентов (табл.2). В то же время у гибридных популяций по данным электрофореза, уровень гетерогенности компонентного состава 7S и 11S глобулинов был несколько иной. Так, у гибридной комбинации Вилана × Степовичка 4, компонентный состав 7S глобулинов на электрофоретическом спектре представлен 9 белковыми компонентами, а у родительских форм их количество соответствовало 18 – у материнской формы (Вилана) и 12 – у отцовской формы (Степовичка 4). В то же время компонентный состав 11S глобулинов по количеству белковых компонентов у этой гибридной комбинации занимал промежуточное положение относительно его количества у родительских форм (15; 17 и 14 соответственно). У других гибридных комбинаций (Аметист × Ольса, Куйбышевская 77 × Аполлон, Паркер × Устя) количество белковых компонентов в электрофоретических спектрах 7S и 11S глобулинов занимало промежуточное положение или отклонялось в сторону одного из родителей. Только одна из 5 изученных гибридных комбинаций Вилана × (Юрьевка×Изумрудная) сохранила спектр компонентного состава 7S и 11S глобулиновых белков исходных родительских форм. При этом основная часть запасных белков 11S глобулинов имела молекулярную массу 100 000 Д, 45000 Д и 20000 Д, а 7S глобулины – 116000 Д, 97000 Д и 45000 Д.

Таблица 2.

Количество белковых компонентов 7S та 11S глобулинов у гибридов и их родительских форм

Родительские формы	7S	11S	Гибриды	7S	11S
Аметист	15	16	Аметист х Ольса	16	14
Ольса	16	15			
Куйбышевская 77	13	14	Куйбышевская 77 х Аполлон	11	15
Аполлон	15	15			
Паркер	13	14	Паркер х Устя	12	14
Устя	12	15			
Вилана	18	17	Вилана х Степовичка 4	9	15
Степовичка 4	12	14			
Юрьевка х Изумрудная	19	17	Вилана х Юрьевка х Степовичка 4	19	17

Таким образом, результаты анализа электрофоретических спектров компонентного состава 7S и 11S глобулиновых белков семян сортов сои и их гибридных популяций показал, что спектры этих белков характеризуются неодинаковой интенсивностью и полиморфизмом, уровень которых определяется генетическими особенностями сортов, взятых в скрещивание.

Литература

1. Клименко В.Г. Белки семян бобовых растений.: Кишинев, 1978.- Штиица.
2. Сичкарь В.И. Варьирование количества белка и аминокислотного состава у сои//Физиология и биохимия культ. растений. – 1992. – Т. 24. – С. 153-158.
3. Адамовська В.Г., Молодченкова О.О., Сичкар В.І., Цисельська Л.Й. Біохімічні особливості білкового комплексу насіння сої та використання його у виробництві// Тематичний науковий збірник «Селекція і насінництво». Харків. – 2005. – Вип. 90. – С. 162-175.
4. Kashiyoma I, Fukushima D. Physico-chemical studies on the 11S globulin in soybean seed: size and shape determination of the molecule// Int Peptide Protein Res 8. – 1976. – P. 283-289.
5. Badley R.A., Atkinson D., Hauser H. The structure, physical and chemical properties of soybean protein glycinin//Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – V. 412. – P.214-228.
6. Catimpoalas N., Campbell T.J, Meyer A. Immunochemical study of changes in reserve protein of germinating soybean seed// Plant Physiol. – 1968 – V. 76. – P.799-805.
7. Алексеенко А.Ю., Николаев И.В., Винецкий Ю.П. Характер вариабельности запасного белка 11S глобулина сои // Сельскохозяйственная биология. – 1987. – № 2. – С.13-18.
8. Конарев В.Г. Принципы маркеров в генетическом анализе исходного и селекционного материала. – Физиология растений в помощь селекции.- М.: Наука, 1974. – 242 с.
9. Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Сичкарь В.И., Цисельская Л.Й., Сагайдак Т.В., Безкровная Л.Я. Сравнительная характеристика белково-ферментативного комплекса семян сои и гороха //Труды международной конференции «Факторы экспериментальной эволюции организмов». – 2009. – Т. 6. – С.106-107.

10. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. – Л.:Агропромиздат, 1987. – С. 342-343.

11. Адамовська В.Г., Молодченкова О.О., Січкач В.І., Цісельська Л.Й., Сагайдак Т.В. Патент на корисну модель № 42181. Спосіб добору сої. 25.06.2009 р.

Резюме

Методом електрофореза в ПААГ з SDS изучен поліморфізм компонентного складу 7S і 11S глобулінових білків насіння генетически різних сортів сої та гібридів, створених на їх основі. Установлено, що рівень поліморфізму компонентного складу 7S і 11S глобулінових білків насіння у гібридів залежить від походження використовуваних в скрещуваннях сортів сої.

Методом електрофорезу в ПААГ з SDS вивчений поліморфізм компонентного складу 7S та 11S глобулінових білків насіння різних сортів сої та гібридів, створених на їх основі. Встановлено, що рівень поліморфізму компонентного складу 7S та 11S глобулінів насіння у гібридів залежить від походження сортів сої, які використовувалися в скрещуваннях.

The polymorphism of component composition of 7S and 11S seed globulins of genetic different soybean varieties and hybrids created on their basis is studied by method of electrophoresis in PAAG with SDS. It was established, that level of polymorphism of component composition of 7S and 11S seed globulins of hybrids depends from origin of soybean varieties which using in the crossing.

АНДРЕЕВ И.О.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина, 03143, Киев, ул. Акад. Заболотного 150, e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ КАК МОДЕЛЬ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ

Культивирование растительных клеток и тканей *in vitro* во многих случаях сопровождается изменениями их морфологических, биохимических и генетических признаков, а также физиологических параметров. Изменчивость, индуцированная культивированием тканей *in vitro*, которая наблюдается среди клеточных линий или растений-регенерантов, получила название «соматоклональной изменчивости», а измененные растения были названы соматклонами или соматоклональными вариантами.

Перенос клеток растений в культуру *in vitro* связан с прекращением их существования в составе целостного организма и соответствующим нарушением механизмов организменного контроля, регулирующих процессы роста и развития целостного организма. Существенным изменением подвергаются также условия и характер питания клеток. Предполагается, что клетки приобретают качества самостоятельных организмов, способных к автономному существованию, а их совокупность можно рассматривать как клоновую клеточную популяцию, в которой изменение и сохранение наследственного материала зависит от двух факторов – наследственной (некомбинативной) изменчивости и отбора (Кунах, 2005, разд.8).

Выживание в условиях изолированного роста и формирование перевиваемой культуры требует адаптации клеток. Этот процесс условно делят на три периода: первичная популяция изолированных клеток, периоды становления и сформированного штамма. На протяжении нескольких первых пассажей, когда происходит постепенная утрата механизмов организменного контроля, генетическая изменчивость сохраняется на относительно низком уровне, поскольку адаптация клеток происходит за счет физиологических изменений. В дальнейшем, после исчерпания этого адаптационного ресурса, наблюдается всплеск геномной изменчивости и рост гетерогенности популяции культивируемых клеток. Изменчивость, возникающая на данном этапе, служит материалом для отбора и основой для адаптации к изолированному росту *in vitro*. В конечном итоге происходит формирование клеточных популяций, характеризующихся относительной стабильностью признаков, наличием физиологического и генетического гомеостаза (Кунах, 2005, разд.8).

На сегодня накоплено значительное количество данных об изменчивости морфологических признаков, а также числа и структуры хромосом в культивируемых тканях и у растений-регенерантов, которые позволили начать разработку генетических основ клеточных технологий растений. Вместе с тем сведения о соматклональной изменчивости на молекулярно-генетическом уровне на момент начала этого исследования оставались разрозненными и часто довольно противоречивыми. Тогда как в одних работах сообщалось о высокой изменчивости, размах которой достигал уровня межвидовых отличий, в других – изменений не удавалось обнаружить вовсе. Неясным оставалось и влияние на генетическую стабильность культивируемых тканей разнообразных повреждений хромосом, наблюдаемых на цитологическом уровне, частота которых может достигать в отдельных случаях 50 % и более от всех митозов (Кунах, 2005, разд. 8).

В этой статье мы обобщили данные многолетних исследований культивируемых тканей нескольких видов растений с использованием молекулярно-генетического анализа, которые свидетельствуют, что размах и скорость возникновения изменений, наблюдаемых в культуре тканей, в значительной мере зависят от внешних условий.

Для оценки генетической изменчивости в культивируемых тканях в период становления проведено исследование каллусных культур возрастом от 2-х месяцев до 3-х лет растений *Ungernia victoris* и *Zea mays*. Следует отметить, что во многих случаях завышенные оценки изменчивости в первых работах по молекулярно-генетическому анализу культивируемых тканей растений были связаны с использованием в качестве исходного материала для эксплантов генетически неоднородных растений. В своей работе мы также столкнулись с наличием генетической гетерогенности даже в чистых линиях растений. Учитывая все это, в данной работе мы рассматриваем исключительно результаты, полученные при сравнении индивидуаль-

ных культур и исходных растений, или же культур, полученных от одного растения-донора эксплантов.

Для кукурузы был проведен RAPD-анализ 19 каллусных культур возрастом от двух до семи месяцев, полученных из тканей проростков четырех инбредных линий. В каллусных культурах всех линий в сумме после культивирования в течение 4-6 месяцев генетические изменения наблюдали в 32 % случаев, при этом генетические дистанции отдельных культур от исходного генотипа не превышали 1,3 % [2,3]. Для унгернии были проанализированы морфогенные и неморфогенные каллусные культуры, полученные от двух разных растений, возрастом от 1 до 3 лет. В случае морфогенной каллусной культуры возрастом около двух лет (18 пассажей) первого растения генетическая дистанция от исходного растения составила 1,2 %. В культуре тканей другого растения уровень изменений в морфогенной культуре после 3-х лет культивирования достигал 1,9 %, а в неморфогенной каллусной культуре – 2,3 %. Отличия от исходного растения наблюдались уже после года культивирования и при дальнейшем выращивании *in vitro* они постепенно возростали [4].

Полученные данные свидетельствуют, что адаптация растительных клеток к условиям изолированного роста *in vitro* в период становления культуры сопровождается накоплением генетических изменений, выявляемых молекулярно-генетическим анализом. Их уровень зависит от типа роста культуры, а именно: каллусные ткани с неорганизованным типом роста характеризуются повышенным уровнем изменчивости по сравнению с морфогенным каллусом. В целом исследованные каллусные культуры характеризовались низким уровнем изменчивости, в некоторых случаях изменений не удавалось обнаружить вообще.

Молекулярно-генетический анализ культивируемых тканей позволяет оценить лишь общие тенденции генетических изменений в составляющих их клеточных популяциях или, можно сказать, тенденции изменений их генофонда, но практически не дают представления о гетерогенности клеточной популяции, которая собственно и является непосредственным проявлением соматоклональной изменчивости. Для оценки генетической гетерогенности клеточной популяции был проведен молекулярно-генетический анализ растений-регенерантов унгернии Виктора. Регенерация растений может происходить путем органогенеза и соматического эмбриогенеза, при этом регенерируемые растения образуются из небольших клеточных агрегатов или отдельных клеток, соответственно. Таким образом, разнообразие регенерантов отражает гетерогенность исходной клеточной популяции, хотя, вероятно, и не в полном объеме, поскольку клетки с существенными перестройками могут терять способность к формированию целостного организма.

RAPD-анализ 22-х растений, полученных путем прямого органогенеза *in vitro*, показал следующее. Генетические расстояния по Жаккарду меж-

ду растением-донором эксплантов и регенерантами колебались в пределах от 0 до 2,7 % со средним значением 0,5%, а между отдельными регенерантами достигали 4 % со средним значением 0,7 %. Количество регенерантов, для которых не выявлены генетические отличия от материнского растения, составило больше 68 %. Растения, полученные непрямым органогенезом из каллусной культуры возрастом около 7 лет (n=11), имели более высокие значения этих показателей. Так генетические расстояния между растениями-регенерантами и материнской линией каллусных тканей составили от 1,4 до 7,0 % (в среднем – 4,2 %), а расстояния между отдельными регенерантами – от 0 до 6,2 % (в среднем – 2,5 %). Для сравнения, генетические дистанции между отдельными линиями каллусных тканей унгернии Виктора родственных с линией, использованной для регенерации, варьировали в диапазоне от 1,4 до 4,9 % (в среднем – 2,9%) [5]. Рост гетерогенности растительного материала, полученного путем не прямой регенерации из каллусных тканей, по сравнению с регенерантами, полученными прямым органогенезом, свидетельствует об увеличении генетического разнообразия клеточных популяций культивируемых тканей при длительном выращивании *in vitro*.

Были также изучены длительно культивируемые ткани, в частности несколько линий каллусных тканей унгернии Виктора возрастом 9 лет и штаммов культивируемых тканей раувольфии змеиной *Rauwolfia serpentina* Benth., возрастом около 40 лет. В обоих случаях отсутствовала возможность сравнения с исходным генотипом, однако общее происхождение этих культур позволило определить их дивергенцию и оценить изменчивость косвенным путем. Кроме того, для штаммов тканей раувольфии змеиной имелись образцы ДНК, отобранные с интервалом более 10 лет. По данным RAPD- и ISSR-анализа генетические дистанции между девятилетними линиями каллусных тканей унгернии Виктора, выращивавшихся на разных по содержанию фитогормонов средах, варьировали в диапазоне от 0,8 до 3 %. Какой-либо специфичности генетических изменений в зависимости от состава среды обнаружено не было [6]. Генетические расстояния между штаммами тканей *R.serpentina* и исходной для них клеточной линией А, варьировали в пределах от 4 до 12 %. Наиболее близкой к исходной линии А была линия М, самым отдаленным – суспензионный штамм R-31. Уровень отличий между отдельными штаммами колебался в более узком диапазоне от 5 до 9 % [7].

Дивергенция штаммов культивируемых тканей унгернии Виктора и раувольфии змеиной указывает на накопление у них случайных изменений вследствие культивирования *in vitro*. Вместе с тем, уровень генетических отличий между штаммами оказался ниже того, который следовало бы ожидать при накоплении изменений с темпами, характерными для периода становления.

С использованием двух высокопродуктивных штаммов *R.serpentina* – К-20 и К-27, созданных более 30 лет назад и на протяжении этого времени сохраняющих стабильно высокий уровень накопления индолиновых алкалоидов, был проведен сравнительный анализ генетической изменчивости при выращивании тканей в стандартных условиях, а также на среде другого состава на протяжении несколько пассажей и нескольких лет [8].

При выращивании в стандартных условиях генетические дистанции между образцами тканей, отобранных с интервалом 14 лет, составили 0,4 и 0,8 %. Субкультивирование тканей, адаптированных к условиям поверхностного роста, в жидкой среде того же или измененного состава в течение 4 пассажей сопровождалось появлением генетических отличий от исходного штамма, уровень которых колебался в пределах 0,8-2,9 % и увеличивался в зависимости от величины различий в составе стандартной и новой среды. При продолжительном культивировании тканей штамма К-20 на среде 5С (на протяжении 30 пассажей или около 3-х лет) отличий от стандартного штамма не наблюдали, тогда как генетическая дистанция между аналогичными вариантами штамма К-27 составила 1,9 %. Мы считаем, что выявленное различие в реакции двух штаммов с общим происхождением связано с более существенной разницей в составе сред 5С и 10С по сравнению со средами 5С и 6С [8].

Результаты молекулярно-генетического анализа показывают, что в период становления в культуре тканей растений происходит накопление генетических изменений, скорость которого зависит от типа роста и ниже в культуре тканей с организованным типом роста по сравнению с неорганизованно растущей культурой. Накопление изменений помимо увеличения отличий от исходного генотипа проявляется в увеличении гетерогенности популяции культивируемых клеток, подтверждением чего является соматоклональная изменчивость растений-регенерантов. Возникающие на этом этапе изменения обеспечивают основу для адаптации клеток к конкретным условиям роста. Продолжительное выращивание культивируемых тканей в постоянных условиях сопровождается снижением скорости накопления изменений. Снижение генетической изменчивости, вероятнее всего обусловлено тем, что постоянные условия существования обеспечивают в клеточной популяции, адаптированной к росту *in vitro*, преобладающее действие стабилизирующего отбора. При этом в клеточных популяциях сохраняется определенный уровень генетической гетерогенности, о чем свидетельствуют генетические изменения, возникающие на протяжении относительно небольшого времени даже в тканях сформированных штаммов при изменении условий выращивания. Столь быстрые изменения очевидно являются результатом изменения направленности отбора, который обеспечивает преимущественную селекцию определенного генотипа из уже гетерогенной клеточной популяции.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что скорость и размах генетических изменений в культуре тканей растений на молекулярно-генетическом уровне оказались значительно ниже ожидаемых и подтверждают положение о том, что геномная изменчивость *in vitro* в значительной степени определяется условиями выращивания клеток.

Література

1. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос. – 2005. – 724 с.

2. Майданюк Д.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Геномна мінливість в культурі *in vitro* кукурудзи лінії Р346 і отриманих від неї соматоклональних ліній // *Biopol. and Cell.* – 2007. – **23**, №5. – С. 416-424.

3. Майданюк Д.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Низька геномна мінливість в культурі *in vitro* лінії кукурудзи Black Mexican Sweet Corn C456 // Доп. НАН України. – 2008. – №1. – С.161-164.

4. Бублик О.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Мінливість морфогенної та неморфогенної культури тканин *Ungernia victoris* за результатами RAPD-аналізу // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2008. – Т. 6, № 1. – С. 44-51.

5. Bubyk O.M., Andreev I.O., Spiridonova K.V. Kunakh V.A. Genetic variability in regenerated plants of *Ungernia victoris* // *Biologia Plantarum.* – V. 56, N2. – P. 395-400.

6. Бублик О.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Соматоклональна мінливість *U. victoris*: необхідність комплексного генетичного аналізу // *Biopol. and Cell.* – 2008. – № 6. – С. 487-493.

7. Андреев І.О., Адноф Д.М., Спіридонова Е.В., Кунах В.А. Стабільність генома високопродуктивних клітинних ліній раувольфії змеиною при довготривалому вирощуванні *in vitro* // Доп. НАН України. – 2007. – №10. – С. 147-152.

8. Спіридонова Е.В., Адноф Д.М., Андреев І.О., Кунах В.А. Стабільність генома високопродуктивної клітинної лінії К-27 *Rauwolfia serpentina* Benth. при зміні умов вирощування // *Biopol. and Cell.* – 2007. – Т.23, №2. – С. 86-92.

Резюме

Обобщаются данные исследований генетической изменчивости в культивируемых тканях растений на разных этапах формирования перевиваемой культуры и у растений-регенерантов, свидетельствующие о значительном влиянии условий выращивания на скорость и размах наблюдаемых изменений.

Узагальнено дані досліджень генетичної мінливості в культивованих тканинах рослин на різних етапах формування пересадної культури і у рослин-регенерантів, що свідчать про значний вплив умов вирощування на швидкість і розмах спостережуваних змін.

The paper summarizes the data on genetic variation in cultured plant tissues at different stages of passaged tissue culture formation as well as in regenerated plants, suggesting a significant effect of growth conditions on the rate and magnitude of the observed changes.

АНТОНЮК М.З., МИХАЙЛИК С.С., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,
Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: tern@ukma.kiev.ua

МІНЛИВІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИМИ СПЕКТРАМИ ГЛІАДИНІВ

Досліджувані інтрогресивні лінії походять від схрещування генотипу м'якої пшениці Аврора (AABBDD) з геномно-заміщеними формами пшениці AABBXX, де AABB є тетраплоїдним компонентом генотипу Аврора, а XX – геномом *Aegilops speltoides* у Авродесу (AABBSS), *Ae. sharonensis* у Аврозису (AABBS^{sh}S^{sh}) та *Ae. umbellulata* у Авролати (AABBUU). [1]. Дослідження ліній за електрофоретичними спектрами низькі білків, виконане раніше, показало, що різні лінії містять незначну кількість генетичного матеріалу геному егілопса, замість цілих хромосом переважно геному D або їхніх фрагментів [2]. Тривале спостереження за ними свідчить, що частина ліній виявляє перманентну мінливість за ознаками морфології колосу. Проте ознаки морфології частіше за все характеризуються як такі з різним ступенем експресивності і не є дуже надійними свідками змін на генетичному рівні при деяких змінах на рівні фенотипу. Більш придатними ознаками є продукти експресії генів, що кодують білки, які надійно та безпомилково візуалізуються на треках електрофоретичних спектрів. Тому лінії було вивчено за мінливістю їхніх гліадинових спектрів. Гліадини кодуються двома серіями ортологічних генних кластерів, *Gli-1* та *Gli-2*, розташованих на коротких плечах хромосом 1-ої та шостої гомеологічних груп, відповідно, та характеризуються надзвичайно високим генетичним поліморфізмом [3]. Гліадини складаються з мономерних протеїнів, які в залежності від молекулярної маси діляться на декілька груп. На електрофоретичних спектрах у напрямку збільшення електрофоретичної рухливості вони складають зони ω , γ , β та α . Рекомбінація усередині генних кластерів відбувається вкрай рідко [3].

Матеріал та методика

Рослинний матеріал: генотип Аврора, геномно-заміщені форми Авродес, Аврозис, Авролата, 167 інтрогресивних ліній – похідних Авродесу, Аврозису та Авролати. Гліадини вивчали у 50 ліній, які виявили нестабільність за окремими ознаками морфології колосу. Кількості хромосом встановлювали на тимчасових чавлених препаратах первинних корінців паростків. Для електрофорезу гліадинів використовували поліакриламідний гель (ПААГ). Білки екстрагували з сухої зернівки. Зернівку подрібнювали, потім заливали 150 – 200 мкл 70% етанолу. Через 1,5 години екстракції відбирали 60 мкл супернатанту і випаровували. Сухий осад розчиняли у 50 мкл розчину 5,5 М сечовини. Витримували близько 30 хв. Електрофорез гліадинів проводили в модифікованій системі Бжезинського. Тривалість електрофорезу 6–6,5 годин. Наносили 20 мкл екстракту в одну слоту. Ме-

тоди статистичної обробки стандартні. Відсотки приводяться з біноміальною похибкою.

Результати та обговорення

Серед вивчених ліній спостерігали мінливість за такими ознаками морфології колосу: остистість, форма, забарвлення зрілого колосу, опушення колоскової луски, вдавленість у основі колоскової луски, жорсткість колоскової луски, розподіл пігменту на колосковій лусці (табл. 1). Серед 72 ліній – похідних Авродесу, 42 ліній – похідних Аврозису та 53 ліній – похідних Авролати нестабільність хоча б за однією із перелічених ознак було зареєстровано, відповідно, в 40, 19 та 16 ліній, що склало у відсотках $55,6 \pm 5,87$, $45,2 \pm 7,68$ та $30,2 \pm 6,31$. У всіх випадках нестабільність у прояві морфологічної ознаки виявлялася в тому, що серед нащадків лінії поряд з рослинами, повністю схожими з батьківською за морфологічним фенотипом, з'являлися рослини, в яких чужинна градація певної ознаки замінювалась градацією ознаки, притаманної генотипу Аврора, отже властивої м'якій пшениці. Різні лінії виявляють нестабільність за різною кількістю ознак, що оцінювалися, від однієї до п'яти. Перманентна мінливість за ознаками морфології колосу у інтрогресивних ліній відбувається на тлі повної цитологічної стабільності. Лінії, що характеризувались постійною мінливістю за ознаками морфології, було вивчено за спектрами гліадинових компонентів. Для кожної лінії було вивчено кілька генерацій, від 2 до 7. Всі генерації вирощувалися у 2009 році з насіння від 2002 до 2008 року.

Таблиця 1

Стабільність інтрогресивних ліній за морфологічними ознаками

Ознаки морфології колосу, за якими реєструються зміни	Кількість ліній, що пішли від		
	Авродесу	Аврозису	Авролати
Остистість	25	9	7
Колір стиглого колосу	12	5	7
Опушення колоскової луски		1	3
Вдавленість на колосковій лусці	16	17	5
Жорсткість колоскової луски	15	13	6
Розподіл пігменту на колосковій лусці	5	10	3
Форма колосу	7	6	4
Лінії ges, які не розщеплюються	32	24	35

Порівнюючи спектри гліадинів інтрогресивних ліній, вивчали питання: чи характеризується лінія міжгенераційною або внутрішньогенераційною мінливістю; якщо мінливість не спостерігається, чи подібний спектр лінії спектру Аврори; якщо спектри лінії та Аврори відрізняються, чи можна пояснити появу нових компонентів походженням лінії від відповідного виду егілопу.

Стабільність інтрогресивних ліній за спектром гліадинів

Характеристика лінії	Кількість ліній, що пішли від		
	Авродесу	Аврозису	Авролати
Лінія стабільна у всіх генераціях	6	8	14
Лінія мінлива між генераціями	9	4	4
Лінія мінлива усередині окремих генерацій	4		

Відсоток нестабільних ліній серед похідних Авродесу, Аврозису та Авролати склав, відповідно, $68,4 \pm 10,67$, $33,3 \pm 13,61$ та $22,2 \pm 9,80$. За результатами точного критерію Фішера ($P_{\text{інц.}} = 0,2$, $P_{\text{заг.}} = 0,676$), похідні Аврозису та Авролати не відрізняються за співвідношенням стабільних та нестабільних ліній. Якщо об'єднати ці дві групи, підвищеною кількістю нестабільних ліній від них відрізняється група похідні Авродесу (за чотирьохпольним критерієм, $\chi^2 = 8,78$ при $\chi^2_{0,01} = 6,63$ для $df = 1$).

19 проаналізованих ліній-похідних Авродесу були представлені у 63 генераціях, 32 генерації ($50,8 \pm 6,30\%$) мали внутрішньогенераційну мінливість за компонентами гліадинового спектру. З 33 генерацій ліній-похідних Аврозису лише 5 ($15,2 \pm 6,24\%$) мали внутрішньогенераційну мінливість. У Авролати з 34 генерацій 6 ($17,6 \pm 6,54\%$) мали внутрішньогенераційну мінливість за компонентами гліадинового спектру. При порівнянні кількості нестабільних генерацій групи похідні Аврозису та Авролати як і раніше не відрізняються одна від одної та кожна з них значуще відрізнялась від групи похідних Авродесу: $\chi^2 = 10,16$ та $8,83$, відповідно, $\chi^2_{0,05} = 5,92$ при кількості порівнянь 3. Отже, найчастіше внутрішньогенераційна мінливість спостерігалася серед похідних Авродесу.

Із 130 вивчених генерацій таких, що повністю повторювали спектр Аврори, було лише 8. 122 генерації мали у гліадиновому спектрі зернівок компоненти, які відрізняються від компонентів спектру Аврори. Це зовсім не збігається з результатами оцінки гліадинових спектрів, отриманих на тих самих лініях 18 років тому.

Лінії, різні генерації яких вивчаються у даній роботі, було створено як 42-хромосомні цитологічно стабільні нащадки від схрещувань геномно-заміщених форм з генотипом Аврора. В їхньому геномі могли бути будь-які вставки інтрогресивного хроматину, частину з яких нами було ідентифіковано через застосування біохімічних хромосомних маркерів та вивчення мейозу у рослин F_1 між лінією та генотипом Аврора [2]. Як цитологічно сталі, лінії було зареєстровано у 1990-91 роках, за гліадинами їх вивчали у 1993-94 роках. Вивчалася тільки одна генерація, вирощена у 1993 році, по чотири зернівки на лінію. Ми не спостерігали жодного поліморфізму гліадинових компонентів усередині лінії. Якщо констатувалась поява компонентів спектру, не властивих реципієнтному генотипу, Аврори, як правило, це був блок компонентів ω -зони, властивий спектру геномно-заміщеної

форми, або окремі компоненти у інших зонах, також властиві саме цій формі [2]. На той період лінії можна було б характеризувати новостворені, «молоді», які ще не пройшли помітної кількості генерацій після свого виділення серед розмаїття рослин гібридного походження, кількість хромосом серед яких коливалась від 38 до 44 [4]. У період з 1990 по 2008 рік лінії пройшли як мінімум 15 генерацій у польових умовах під ізоляторами, проте ми не контролювали їхню цитологічну стабільність.

За кілька років (генерацій) після завершення роботи з ідентифікації чужинного хроматину у інтрогресивних ліній стало очевидно, що частина з них характеризується перманентною мінливістю за ознаками колосу, за якими ми маємо можливість спостерігати, тобто такими, що характеризуються різними градаціями в генотипах Аврора та геномно-заміщені форми. Крім того, вивчаючи популяції, що розщеплюються від схрещування інтрогресивних ліній Аврозису, ми констатували факт появи серед гібридних нащадків таких алелів генів бета-амілази, яких не було у компонентів схрещування [5]. Сукупність цих спостережень свідчила, що принаймні частина гексаплоїдних інтрогресивних ліній, цитологічно стабільних, є нестабільними генетично. А це означає, що в їхніх геномах відбуваються якісь процеси, які є джерелом генетичної мінливості в межах інтрогресивного генома, хоча на цитологічному рівні вони не відбиваються. Гліадинові спектри, як надзвичайно поліморфна ознака, являють собою ідеальну модель для кількісного вивчення хоча б тієї частини такої мінливості, яка відбувається з гліадиновими генами.

Найчастіше нові компоненти зустрічалися у ω -зоні, рідше у γ - та β -зонах. В α -зоні гліадинового спектру лише декілька генерацій демонстрували нові компоненти. Таке розділення по зонах можна частково пояснити розмірами та роздільною здатністю електрофоретичних спектрів цих зон. Так ω -зона містить близько половини усього спектру, в той час, як γ -, β - та α -зони займають решту. На α -зону, у середньому, припадає від трьох до п'яти компонентів. Гліадини є спирторозчинною фракцією клейковини зерна пшениці та представлені мономерними білками. Кожен компонент гліадинового спектру, білок, кодується окремим геном. Таких генів у геномі багато і розташовані вони кластерами. Гліадинові гени кодують запасні білки, надзвичайно збагачені на залишки амінокислот проліну та глютаміну, чим пояснюється їхня висока цінність як запасних білків, придатних для розвитку зародку зернівки [3]. Гени локусів *Gli* характеризуються певною структурою, яка може бути залучена для пояснення як великої кількості генів у кластерах, так і того, що серед них переважають псевдогени. До складу генів, що кодують гліадини, входить повторювальний домен, консенсусна послідовність якого подібна в різних генів та містить велику кількість тринуклеотидів, що кодують глютамін, САА. Повтори САА відомі як елементи мікросетелітних локусів. Довжина послідовності, що кодує Pro-Phe-Pro-Gln-Gln-(Gln)-Pro-Gln-Gln-(Pro-Gln-Gln) впливає на масу поліпептидів

[6]. Наявність у складі гена повторів таких нуклеотидів підвищують їхню поліморфність, яка може виникати за двома механізмами: через помилки при рекомбіногенезі, які спричинюються численими повторами та через відомий механізм утворення нових алелів мікросателітних локусів при проковзуванні полімерази при реплікації ДНК [7]. В обох випадках це забезпечує загальновідомий поліморфізм кластерів, у які зібрані численні гени різних гліадинів. За нашими даними, мінливістю характеризуються саме кластери генів, що свідчить про активізацію у гібридному геномі інтрогресивних ліній якихось механізмів, які ініціюють внутрішньокластерну мінливість.

Гени кластерів *Gli* різних субгеномів пшениці демонструють високу подібність у своїй структурі. Виходить, що гени можуть мутувати тільки у межах кількості повторів, що кодують глютамінові залишки, але не в інших елементах своєї будови. Вивчення структури гліадинових кластерів дало змогу припустити, що зростання кількості генів усередині кластера є наслідком нерівного кросинговеру між гомологічними хромосомами, гетерозиготними за певним гліадиновим кластером [8]. Щодо міжгенних проміжків, для них показана значна різниця для хромосом різних субгеномів. Міжгенні регіони, розташовані між окремими генами, що складають кластер гліадинових генів, утворені із повторів та надзвичайно насичені транспозонами, які можуть сприяти підвищенню внутрішньогеномної мінливості, якщо переходять до активного стану [8]. Причиною активації транспозонів може стати інтрогресивна природа геному ліній, які ми вивчаємо та які демонструють відсутність стабільності електрофоретичних спектрів за продуктами гліадинових генів.

Література

1. *Жиров Е.Г., Терновская Т.К.* Геномная инженерия у пшеницы // Вестник с.-х. науки. – 1984. – N 10. – С. 58–66.
2. *Антонюк М.З., Терновська Т.К.* Створення чужинно-заміщених ліній м'якої пшениці методом «змішування» хромосом у межах одного субгеному // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. Том 2. – Київ: Логос, 2001. – С. 368–375.
3. *Shewry P.R., Holford N.G., Lafandra D.* Genetics of wheat gluten proteins // Advanced in Genetics. – 2003. – V. 49. – P. 111–171.
4. *Жиров Е.Г.* Геномы пшеницы: исследование и перестройка: Дис. ... док. биол. наук: 03.00.15. – Краснодар. – 1989. – 366 с.
5. *Маньковська О.С., Терновська Т.К., Антонюк М.З.* Цитологічна стабільність та життєздатність інтрогресивних ліній з гаметоцидною хромосомою 4S¹ та їх гібридів // Наукові записки НАУКМА. – 2009. – Т. 93. Біологія та екологія. – С. 23–26.
6. *Ang S., Kogulanathan J., Gordon A. M. et al.* Structure and heterogeneity of gliadin: a hydrodynamic evaluation // Eur Biophys J. – 2010. – Vol. 39. – P. 255–261.
7. *Anderson O.D., Hsia C.C., Torres V.* The wheat γ -gliadin genes: characterization of ten new sequences and further understanding of γ -gliadin gene family structure // Theor. Appl. Genet. – 2001. – Vol. 103. – P. 323–330.
8. *Gao S., Gu Y. Q., Wu J.* Rapid evolution and complex structural organization in genomic regions harboring multiple prolamin genes in the polyploid wheat genome // Plant Mol Biol. – 2007. – Vol. 65. – P. 189–203.

Резюме

Охарактеризована изменчивость интрогрессивных линий мягкой пшеницы по признакам морфологии колоса и электрофоретичным спектрам продуктов генов *Gli-1* и *Gli-2*. Судя по характеру изменчивости глиадиновых спектров у цитологично стабильных линий выдвинуто предположение о наличии внутригеномной нестабильности в этих линиях, источником которой является их интрогрессивная природа.

The variability of the introgressive common wheat lines for the characters of spike morphology and electrophoretical spectra of products of the *Gli-1* and *Gli-2* genes are described. Judging by pattern of variability of gliadine spectra in cytologically stable lines the availability of intragenome instability in these lines was supposed. The variability is caused by introgressive origination of these lines.

БАРАНОВ Ю.О., СЛІЩУК Г.І., ВОЛКОВА Н.Е., СИВОЛАП Ю.М.

Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,

Україна, 65036, Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: natavolk@rambler.ru

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНА *SHRUNKEN1* КУКУРУДЗИ

Доместикація злаків являє собою еволюційний процес, контрольований людиною. В першу чергу суттєвих змін в процесі доместикації зазнали гени сільськогосподарсько важливих ознак, за якими відбір відбувався найбільш інтенсивно. Характерним в процесі доместикації злаків був ефект пляшкової шийки [1]. Аналіз нуклеотидних послідовностей може показати, які самі гени зазнали найбільших змін під час доместикації, детектувати ефект пляшкової шийки та інтенсивність селекції за рівнем варіабельності, що відрізняється від нейтрального еквілібріуму. Однак, встановлення впливу селекційного процесу на фоні ефекту пляшкової шийки зазнає труднощів [2].

Кукурудза (*Zea mays* L.) є класичним модельним організмом генетики, зокрема, для вивчення процесу доместикації. Геном кукурудзи зазнав суттєвих змін під час доместикації – так, вивчення фізичної та генетичної структури геному показало недавнє поліплоїдне походження кукурудзи та наступну диплоїдизацію [3]. Внаслідок тетраплоїдизації та наступної диплоїдизації відбувалась селективна елімінація одного з двох гомологів деяких генів [4].

Ген *shrunken1* кодує ізозим цукрозосинтазу [5], хоча продукт його експресії не є необхідним для синтезу цукрози у кукурудзи [6]. Відомо, що ген *shrunken1* впливає на процес синтезу ензимів біосинтезу крохмалю [7], також є дані щодо його транс-активуючої активності [8]. Філогенетичний аналіз гена *shrunken1* кукурудзи є важливим для молекулярно-генетичного дослідження генів, пов'язаних з ознаками якості ендосперму, що і є метою даної роботи.

Матеріали і методи

Матеріалом слугували 100 нуклеотидних послідовностей регіону промотора гена *shrunkен1* кукурудзи, отриманих з бази даних Національного центру біотехнологічної інформації [9]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали за алгоритмом MUSCLE [10]. Реконструкцію філогенетичної дендрограми проводили за методом UPGMA [11], достовірність побудованої дендрограми оцінювали bootstrap-тестом з 500 ітераціями [12]. Еволюційні дистанції побудовані за методом Maximum Composite Likelihood [13]. Філогенетичний аналіз проводили за моделлю Тамура-Ней [14] за методом Maximum Likelihood. Тест нейтральності проводили за критерієм Тадзими [15]. Аналіз проводили у програмі MEGA5 [16].

Результати та обговорення

Проведено вирівнювання 100 нуклеотидних послідовностей гена *shrunkен1* кукурудзи, за результатами якого побудовано філогенетичну дендрограму з сумарною довжиною гілок 0,04553198 (рис. 1). Нуклеотидні послідовності розподілилися на три кластери; кластер I, в свою чергу, розподілився на два субкластери, кластер III зайняв сестринське положення до кластерів I та II на дендрограмі. Середній рівень гомології складав 95 %. Відмічено одноступеневі заміни у проксимальній частині вивчених нуклеотидних послідовностей, для дистальної частини характерна мала кількість нуклеотидних замін, що можливо пояснити більшою важливістю її для функціонування гена. Для кластерів I та II відмічений низький рівень варіабельності в порівнянні з кластером III.

Проведено аналіз нейтральності за тестом Тадзими (табл. 1) з метою встановлення характеру еволюції гена *shrunkен1*. В цілому проаналізовано 165 позицій, знайдено шість сегрегаційних сайтів. Значення Tajima *D* було від'ємним та дорівнювало -0,627306.

Відмінне від 0 та від нейтрального еквілібріуму значення Tajima *D* свідчить про те, що еволюція цього гена проходить не випадковим чином. Від'ємність значення Tajima *D*, спричинена низькою варіабельністю даного гена, свідчить про наявність ефекту пляшкової шийки та наявність селекційного пресу.

Таблиця 1

Результати теста Тадзими на нейтральність для гена *shrunkен1* кукурудзи

m	S	p_s	Θ	π	D
165	6	0,036364	0,007024	0,005063	-0,627306

Скорочення: *m* – число проаналізованих позицій, *S* – число сегрегаційних сайтів, $p_s = S/m$, $\Theta = p_s/a_1$, π – варіабельність, *D* – значення тесту Тадзими

Таким чином, проведений філогенетичний аналіз гена *shrunkен1* підтверджує той факт, що його еволюція не носила нейтрального характеру. Характер змін гена *shrunkен1* в процесі доместикації не можливо назвати випадковим. Ген *shrunkен1* зазнав значних змін під час доместикації у ви-

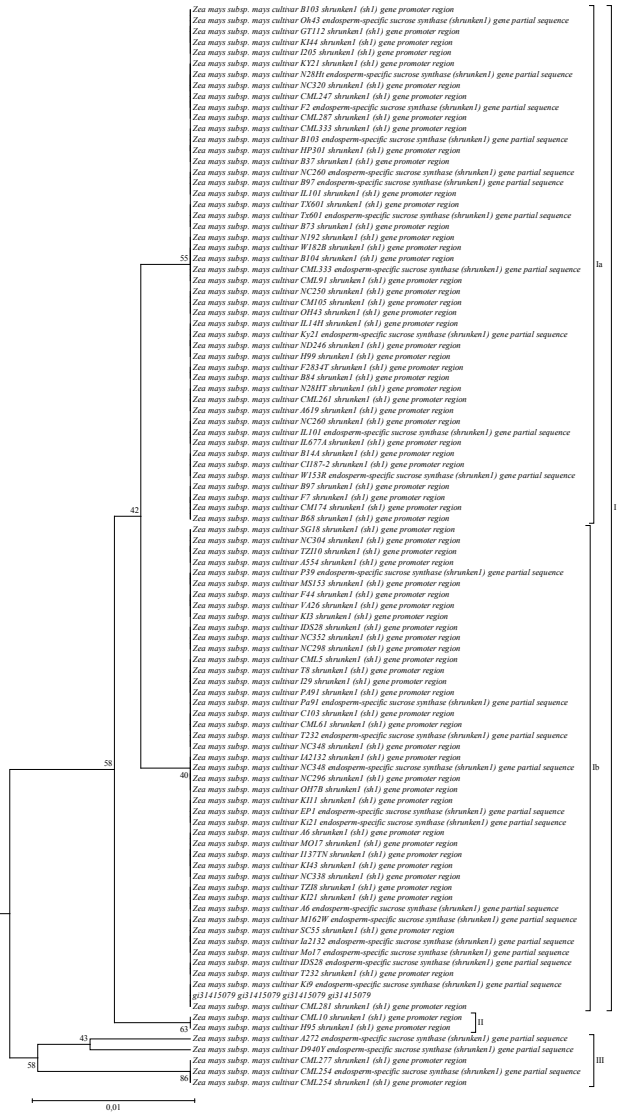


Рис 1. Філогенетична дендрограма, що побудована за результатами вирівнювання 100 нуклеотидних послідовностей гена *snrken1* кукурудзи. I-III – кластери та субкластери. Значення *bootstprap* (500 ітерацій) показано рядом з гілками. Розміри гілок згідно шкали, відстані показують кількість нуклеотидних замін на сайт

гляді ефекту пляшкової шийки, що підтверджено статистичним аналізом філогенетичних даних.

Висновки. Проведено філогенетичний аналіз гена *shrunkен1*, вирівнено 100 нуклеотидних послідовностей промоторного регіону гену *shrunkен1* кукурудзи. Детектовано одонуклеотидні заміни, делеції 1-2 нуклеотидів, в проксимальній частині кількість замін була більшою, ніж в дистальній. Побудовано філогенетичну дендрограму, де нуклеотидні послідовності розподілились в три кластери, рівень варіабельності був низьким за виключенням кластеру III. Проведений тест на нейтральність Тадзими, за результатами якого показано ненейтральний характер еволюції гена *shrunkен1*, давній ефект пляшкової шийки та дію штучного добору в процесі domestикації, що спричинило зниження варіабельності гена *shrunkен1*.

Література

1. *Caicedo A., Williamson S., Hernandez R., Boyko A., Fledel-Alon A., York T., Polato N., Olsen K., Nielsen R., McCouch S., Bustamante C., Purugganan M.* Genome-Wide Patterns of Nucleotide Polymorphism in Domesticated Rice // *PLoS Genetics*. – 2007. – Vol. 3. – № 9. – P. e163.
2. *Hamblin M., Casa A., Sun H., Murray S., Paterson A., Aquadro C., Kresovich S.* Challenges of Detecting Directional Selection After a Bottleneck: Lessons From Sorghum bicolor // *Genetics*. – 2006. – Vol. 173. – № 2. – P. 953–964.
3. *Wei F., Coe E., Nelson W., Bharti A., Engler F., Butler E., Kim H., Goicoechea J., Chen M., Lee S., Fuks G., Sanchez-Villeda H., Schroeder S., Fang Z.* Physical and Genetic Structure of the Maize Genome Reflects Its Complex Evolutionary History // *PLoS Genetics*. – 2007. – Vol. 3. – № 7. – P. e123.
4. *Woodhouse M., Schnable J., Pedersen B., Lyons E., Lisch D., Subramaniam S., Freeling M.* Following Tetraploidy in Maize, a Short Deletion Mechanism Removed Genes Preferentially from One of the Two Homeologs // *PLoS Biology*. – 2010. – Vol. 8. – № 6. – P. e1000409.
5. *Echt C., Chourey P.* Comparison of Two Sucrose Synthetase Isozymes from Normal and *shrunkен-1* Maize // *Plant Physiology*. – 1985. – Vol. 79. – № 2. – P. 530–536.
6. *Cobb B., Hannah L.* *Shrunkен-1* Encoded Sucrose Synthase Is Not Required for Sucrose Synthesis in the Maize Endosperm // *Plant Physiology*. – 1988. – Vol. 88. – № 4. – P. 1219–1221.
7. *Cervantes-Cervantes M., Gallagher C., Zhu C., Wurtzel E.* Maize cDNAs Expressed in Endosperm Encode Functional Farnesyl Diphosphate Synthase with Geranylgeranyl Diphosphate Synthase Activity // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141. – № 1. – P. 220–231.
8. *Vasil V., Clancy M., Ferl R., Vasil I., Hannah L.* Increased Gene Expression by the First Intron of Maize *Shrunkен-1* Locus in Grass Species // *Plant Physiology*. – 1989. – Vol. 91. – № 4. – P. 1575–1579.
9. The National Center for Biotechnology Information. The Nucleotide database. NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
10. *Edgar R.* MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucleic Acids Research*. – 2004. – Vol. 32. – № 5. – P. 1792–1797.
11. *Sneath P., Sokal R.* Numerical taxonomy: The principles and practices of numerical classification // San-Francisco: Freeman, 1973. – P. 573.

12. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. – 1985. – № 39. – P. 783-791.

13. *Tamura K., Nei M., Kumar S.* Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – P. 11030-11035.

14. *Tamura K., Nei M.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution*. – 1993. – № 10. – P. 512-526.

15. *Tajima F.* Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. – 1989. – № 123. – P. 585-595.

16. *Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. – 2011. – Vol. 28 (10). – P. 2731–2739.

Резюме

Проведено філогенетичний аналіз гена *shrunkен1* кукурудзи. Детектовано однунуклеотидні заміни, делеції 1-2 нуклеотидів. За результатами тесту на нейтральність Тадзими показано ненейтральний характер еволюції гена *shrunkен1*, давній ефект пляшкової шийки та дію штучного добору в процесі доместикації, що спричинило зниження варіабельності гена *shrunkен1*.

Проведен філогенетический аналіз гена *shrunkен1* кукурузы. Детектированы однунуклеотидные замены, делеции 1-2 нуклеотидов. По результатам теста на нейтральность Тадзими показаны ненейтральный характер эволюции гена *shrunkен1*, давний эффект бутылочного горлышка и действие искусственного отбора в процессе доместикации, что привело к снижению вариабельности гена *shrunkен1*.

Maize *shrunkен1* gene phylogenetic analysis is conducted. Single nucleotide substitutions and 1-2 nucleotides deletions were detected. Tajima test for neutrality showed non-neutral character of *shrunkен1* gene evolution, ancient bottleneck effect and artificial selection while domestication, resulting in *shrunkен1* gene variability loss

БАСКЕВИЧ М.И.

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН России
Россия, 119071, Москва, Ленинский пр. 33, корп. 1, e-mail: mbaskevich@mail.ru*

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ В ЭВОЛЮЦИИ БЛИЗКИХ ВИДОВ *SICISTA* (RODENTIA, DIPODOIDEA)

Использование усовершенствованного метода окраски хромосомных препаратов азотнокислым серебром [1] позволило выявлять на хромосомах ядрышкообразующие районы (ЯОР), являющиеся местом расположения функционально активных кластеров рДНК, ответственных за синтез 18S и 28S рДНК. И хотя более точным является определение числа ЯОР методом флуоресцентной гибридизации *in situ*, использование аргентофильных свойств ЯОР до сих пор не утратило своей актуальности.

Особый интерес представляют исследования, связанные с применением метода AgNOR-окраски хромосом на группах близко родственных видов, позволяющие судить о связи изменений генов рДНК с теми перестройками, которые претерпевают виды в ходе кариотипической эволюции. В частности, среди грызунов особенности локализации ЯОР были изучены у кариологически дискретных видов полевков рода *Microtus* [2] и у кариологически сходных видов мышей р. *Apodemus* [3], а также у ряда других видов Rodentia. На примере изученных представителей близких видов грызунов было показано, что характер распределения ЯОР по хромосомам может стабильно проявляться внутри одного вида, и в ряде случаев этот показатель может быть использован как диагностический признак. С другой стороны, выявленные случаи внутривидовой изменчивости по числу и локализации ЯОР, указывают на вариативность этих хромосомных признаков и их возможную зависимость от факторов изоляции и каких-то других до конца не ясных причин [4]. Противоречивость имеющейся информации по закономерностям формирования ЯОР у грызунов привлекает внимание к изучению числа и особенностей локализации ЯОР у представителей других таксонов.

Для кариологически дискретного рода *Sicista* фауны FSU, в составе которого в соответствии с современными взглядами, признается 12 видов [5], по особенностям локализации ЯОР имеются лишь фрагментарные данные [6,7].

В настоящем сообщении представлены сведения о локализации ЯОР у 8, представленных 12-ю хромосомными формами, видов мышовок (р. *Sicista*) фауны России и сопредельных территорий, принадлежащих трем группам близких видов *Sicista*: *betulina* (*S. betulina*, *S. strandi*, *S. pseudonapaea*), *subtilis* (*S. subtilis*, *S. severtzovi*), одноцветные мышовки Кавказа (*S. caucasica*, *kluchorica*, *S. kazbegica*).

Материалы и методы

Использованный в работе материал включал выборки следующих видов *Sicista*, представителей групп *betulina*: *S. betulina*, *S. strandi*, *S. pseudonapaea*, *subtilis*: *S. subtilis*, *S. severtzovi* и группы одноцветных мышовок Кавказа: *S. caucasica*, *kluchorica*, *S. kazbegica*. Были изучены сборы *S. strandi* (2n=44, NF=52) из окрестностей пос. Тарское в Северной Осетии, 1 экз., пос. Саблинское Ставропольского края, 2 экз., Стрелецкой степи в Курской обл., 1 экз., вблизи пос. Тарханы Саратовской обл., 1 экз.; *S. betulina* (2n=32, NF=64) из окрестностей г. Звенигород Московской обл., 3 экз., окрестностей метеостанции «Пожигевская» в Ивано-Франковской обл. на Украине, 2 экз.; *S. pseudonapaea* (2n=44, NF=52) из Маркакольского заповедника в Восточно-Казахстанской обл. Казахстана, 2 экз.; *S. subtilis* из окрестностей пос. Дьяковка, 2 экз., Октябрьское, 2 экз. в Заволжье (2n=24, NF=40, 41) и из окрестностей с. Афанасьевка в Правобережье (2n=23, NF=42, 43) Саратовской обл., 2 экз., *S. subtilis nordmanni* с территории заповедника «Хомутов-

ская степь» в Донецкой обл. на Украине ($2n=26$, $NF=48$), 2 экз.; *S. severtzovi* из Стрелецкой степи, 1 экз. и окр. Баркаловки, 1 экз. ($2n=20$, $NF=30$), из Букреевых Барм, 1 экз. ($2n=20$, $NF=29$) в Курской обл.; *S. caucasica* ($2n=32$, $NF=48$) из окр. с. Верхний Архыз, 2 экз.; *S. kluchorica* ($2n=24$, $NF=44$) из долины р. Кизгич, 2 экз. и с Северного Приюта в Карачаево-Черкессии, 1 экз.; *S. kazbegica* из долины р. Цей в Северной Осетии, 2 экз. ($2n=40$, $NF=50$) и *S. kazbegica* из ущ. Суатиси в Южной Осетии, 1 экз. ($2n=42$, $NF=52$).

Все использованные в работе выборки мышовок были кариологически датированы. Препараты митотических хромосом получали в соответствии со стандартной методикой воздушно-высушенных препаратов. ЯОР выявляли с помощью AgNOR-окраски хромосом [1].

Результаты и обсуждение

Кариологические исследования близких видов мышовок группы betulina.

Нами показано, что число ЯОР в кариотипах мышовок группы *betulina* варьирует от 2-х до 4-х, внутривидовая изменчивость по числу и особенностям локализации ЯОР не выявлена. Установлено, что по особенностям AgNOR-окраски хромосом *S. strandi* и *S. betulina* сходны, а *S. pseudonapaea* отличается. Так, в кариотипах видов-двойников *S. strandi* и *S. betulina* отмечена одна пара ЯОР-несущих хромосом. Это самая крупная среди четырех пар двуплечих элементов аутосома (№ 1 у *S. strandi* и № 4 у *S. betulina*). Ядрышкообразующие районы (ЯОР) локализованы в теломерных районах коротких плеч этих пар гомеологичных у обоих видов аутосом. Тогда как в кариотипе *S. pseudonapaea* помимо пары аутосом со сходной локализацией ЯОР (№ 1), обнаруживается пара акроцентрических хромосом (№ 18) с центромерной локализацией ЯОР. Анализируя данные AgNOR-окраски хромосом у близких видов мышовок группы *betulina*, следует отметить, что кариотипы двух 44-хромосомных видов *S. strandi* и *S. pseudonapaea*, сходные на уровне рутинной окраски хромосом, по данному хромосомному признаку видоспецифичны. Напротив, 32-хромосомный кариотип *S. betulina* по особенностям локализации ЯОР оказался идентичным 44-хромосомному набору у вида-двойника *S. strandi*. Известно, что кариотипы видов-двойников мышовок группы *betulina* различаются 6-ю перестройками транслокационного типа и 6-ю перестройками типа изменения положения центромеры [8]. Однако ЯОР-несущие хромосомы у видов-двойников мышовок группы *betulina* в ходе хромосомной эволюции группы остались неизменными.

AgNOR-окрашенные кариотипы у видов-двойников мышовок группы subtilis

Мышовки группы *subtilis* в Восточной Европе, откуда представлен анализируемый в настоящем сообщении материал, характеризуются мозаичными ареалами, фрагментация которых связана с глобальными изменениями климата в плейстоцене и антропогенными воздействиями в голоцене. В целом, для мышовок этой группы показан значительный размах хромо-

сомной изменчивости, сведения о которой суммированы в сводке [9]. Находит ли отражение влияние исторических причин и современных факторов изоляции в этой группе грызунов на вариабельность ЯОР? Нами были изучены особенности локализации ЯОР в кариотипах *S. subtilis* и *S. severtzovi* в выборках из нескольких географических пунктов, что дает возможность исследовать изменчивость этого хромосомного признака и проследить за его ролью в анализе проблем эволюции группы. ЯОР изучены в кариотипах *S. subtilis* из нескольких популяций: это Заволжская ($2n=24$, $NF=40,41 - n=4$) и Правобережная ($2n=23$, $NF=42,43 - n=2$) популяции вида в Саратовской обл. и принадлежащая подвиду *S. s. nordmanni* 26-хромосомная популяция ($NF=48 - n=2$) из Донецкой обл. на Украине. Для каждой из изученных нами выборок *S. subtilis* показано своеобразие в особенностях локализации ЯОР. Так, в 26-хромосомном кариотипе *S. s. nordmanni* из Донецкой обл. на Украине, ЯОР выявляются в терминальных участках коротких плеч пары субметацентрических аутосом малого размера (9-е место в наборе). У 23-хромосомных мышовок из Правобережья Саратовской обл. выявлена специфическая локализация ЯОР: в интеркалярных районах длинного плеча субметацентрической пары № 5. Такая локализация ЯОР в кариотипах мышовок группы *subtilis* обнаружена впервые. Известно, что популяция *S. subtilis* с Правобережья Волги в Саратовской обл., полиморфна по двум структурным хромосомным перестройкам: тандемной (№ 4,10) транслокации и перичентрической (№ 6) инверсии [9]. Очевидно, что ЯОР-несущая пара хромосом (№5) не участвует в формировании и поддержании обнаруженного хромосомного полиморфизма. Напротив, в AgNOR-окрашенном 24-хромосомном кариотипе *S. subtilis* из Заволжья Саратовской обл. обнаружены две пары акроцентрических аутосом (№ 8, 9) с ЯОР в районе вторичных перетяжек. Напомним, что ранее локализация ЯОР в районе вторичной перетяжки одной из акроцентрических пар аутосом была обнаружена нами у особи *S. severtzovi* ($2n=20$, $NF=30$) из Стрелецкой степи в Курской обл. [8]. В настоящем сообщении эти данные подтверждены. Сходная локализация ЯОР показана для особи *S. severtzovi* с аналогичным кариотипом ($2n=20$, $NF=30$) из Баркаловки. Для особи *S. severtzovi* из Букреевых Барм ($2n=20$, $NF=29$), гетерозиготной по двум структурным хромосомным перестройкам: тандемной (№ 3,8) и Робертсоновской транслокациям, ЯОР выявлены в районах вторичных перетяжек крупнейшей в наборе пары (№6) акроцентрических аутосом. AgNOR-несущая пара аутосом у *S. severtzovi* из Курской обл. гомеологична паре № 8 у 24-хромосомной *S. subtilis* из Заволжья Саратовской обл. Т. обр., по особенностям локализации ЯОР исследованный нами 24-хромосомный кариотип *S. subtilis* из Заволжья оказался ближе к таковому *S. severtzovi*, чем к *S. subtilis* ($2n=23$) из Правобережья Саратовской обл. и *S. s. nordmanni* ($2n=26$, $NF=48$) из Донецкой обл. на Украине. Т. обр., сравнение изученных нами кариотипов *S. subtilis* в изолированных руслом Волги популяциях из Заволжья ($2n=24$, $NF=40,41$) и Правобережья

бережья ($2n=23$, $NF=42,43$) Саратовской обл., а также таковых из Донецкой обл. ($2n=26$, $NF=48$) указывает на их существенные различия по количеству и особенностям локализации ЯОР. Полученные на примере данного вида *Sicista* результаты свидетельствуют о вариабельности данного хромосомного признака на внутривидовом уровне, демонстрируя важную роль факторов изоляции в формообразовании мышовок группы *subtilis* в Восточной

Вариабельность ЯОР в кариотипах одноцветных мышовок Кавказа

По характеру AgNOR-окраски хромосом наблюдается дифференциация между 40- и 42-хромосомными формами *S. kazbegica*, с одной стороны, и 32-хромосомной *S. caucasica* ($NF=48$) и *S. kluchorica* ($2n=24$) – с другой. Так, в кариотипах исследованных выборок двух кариоморф *S. kazbegica* ($2n=40$, 42) ЯОР локализуются в теломерных районах коротких плеч первой и второй пар двуплечих аутосом (крупнейшие в наборе субметацентрики). В кариотипах сходных по этому хромосомному признаку представителей группы: *S. caucasica* ($2n=32$) и *S. kluchorica* ($2n=24$) ЯОР локализованы в гомологичных районах гомеологичных аутосом: крупнейшей субметацентрической с теломерной на коротких плечах локализацией ЯОР и акроцентрической с перичентромерной локализацией ЯОР. Присутствие в кариотипах изученных представителей группы одноцветных мышовок Кавказа пары гомеологичных хромосом со сходной локализацией ЯОР подтверждает близость сравниваемых видов, а наличие пар аутосом, различающихся по особенностям локализации ЯОР, дифференцирует одноцветных мышовок Кавказа на две группы.

Выводы

В ходе изучения вариабельности ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом в популяциях 8-ми видов (12 хромосомных форм) *Sicista*, представителей групп *betulina* (*S. betulina*, *S. strandi*, *S. pseudonapaea*), *subtilis* (*S. subtilis*, *S. severtzovi*) и одноцветных мышовок Кавказа (*S. kazbegica*, *S. caucasica*, *S. kluchorica*):

– Показано, что число ЯОР в кариотипах изученных видов и кариоморф мышовок варьирует от 2-х до 4-х.

– Для большинства изученных видов установлена видоспецифичность локализации ЯОР, внутривидовая изменчивость ЯОР отмечена только для *S. subtilis*.

– На примере *S. subtilis* выявлено влияние факторов изоляции на внутривидовую вариабельность ЯОР у *Sicista*.

– В группах близких видов *Sicista* выявлены как гомеологичные-, так и специфические для конкретного вида ЯОР-несущие хромосомы, что позволяет на новом уровне рассматривать изменчивость кариотипов и эволюцию близких видов *Sicista*.

Исследование поддержано РФФИ (№ 12-04-01139a) и Программой Президиума РАН «Живая природа»

Литература

1. *Howell W.M., Black D.A.* Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1 step method. – *Experientia*. – Vol. 36. – P. 1014-1015.
2. *Загороднюк И.В.* Кариотипическая изменчивость и систематика серых полевков (Rodentia, Arvicolinae) I. Видовой состав и хромосомные числа. – *Вестн. Зоол.* – 1990. – № 2. – С. 26-36.
3. *Боесков Г.Г., Картавец И.В., Загороднюк И.В., Белянин А.Н., Ляпунова Е.А.* Ядрышкообразующие районы и В-хромосомы лесных мышей (Mammalia, Rodentia, *Apodemus*). – *Генетика*. -1995. – Т. 31, – № 2. – С. 185-192.
4. *Козловский А.И., Булатова Н.Ш., Новиков А.Д.* - Двойной эффект инверсии в кариотипе обыкновенной полевки. – *ДАН СССР*. – 1988. – Т. 298, – № 4. – С. 994-997.
5. *Шенброт Г.И., Соколов В.Е., Гентнер В.Г., Ковальская Ю.М.* Млекопитающие России и сопредельных регионов. Тушканчиковобразные. – М.: Наука. -1995.- 573 с.
6. *Соколов В.Е., Баскевич М.И.*- Новая хромосомная форма одноцветных мышовок Кавказа (Rodentia, Dipodoidea, Sicista) из Северной Осетии. – *Зоол. Журн.* – 1992. – Т. 71, – вып. 8. – С. 94-103
7. *Baskevich M.I.* – About morphologically similar species in the genus *Sicista*. – *Bonner Zool. Beitr.* – 1996. – Bd. 46, № (1-2). – S. 133-140.
8. *Баскевич М.И., Окулова Н.М.* – Сравнительные кариология и краниология мышовок (*Sicista*, Dipodoidea, Rodentia) группы «betulina». – *Зоол. журн.* – 2003. – Т. 82, – вып. 8. – С. 996-1009.
9. *Баскевич М.И., Опарин М.Л., Черепанова Е.В., Авилова Е.А.* – Хромосомная дифференциация степной мышовки, *Sicista subtilis* (Rodentia, Dipodoidea) в Саратовском Поволжье. – *Зоол. Журн.* – 2010. – Т. 89, – вып. 6. – С. 749-757.

Резюме

Изучена вариабельность ядрышкообразующих районов (ЯОР) хромосом в популяциях близких видов *Sicista* групп *betulina* (*S. betulina*, *S. strandi*, *S. pseudonapaea*), *subtilis* (*S. subtilis*, *S. severtzovi*) и одноцветных мышовок Кавказа (*S. caucasica*, *S. kazbegica*, *S. kluchorica*) фауны России и сопредельных территорий. Выявлены различия в количестве и локализации ЯОР на межвидовом и внутривидовом уровнях. Показана роль ЯОР в дивергентной эволюции рода.

Studied the variability of nucleolus organizer regions (NORs) in populations of closely related *Sicista* species from the groups *betulina* (*S. betulina*, *S. strandi*, *S. pseudonapaea*), *subtilis* (*S. subtilis*, *S. severtzovi*) and unstriped birch mice of the Caucasus (*S. caucasica*, *S. kluchorica*, *S. kazbegica*) of Russia and adjacent territories. Found the differences in the number and localization of NORs on the interspecific and intraspecific levels. Demonstrated the role of NORs in the divergent evolution of the genus *Sicista*. Demonstrated the role of HC in the divergent evolution of the genus and considered its possible adaptive significance.

БІЛОУСОВ О.О.^{1,2,4}, КОЗЕРЕЦЬКА І.А.⁴, КАТАНАЄВ В.Л.^{1,2,3}

¹*Department of biology, University of Konstanz, D-78457 Konstanz, Germany*

²*Department of Pharmacology and Toxicology, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland*

³*Институт белка РАН, Пуцзино, Россия*

⁴*Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Навчально-Науковий Центр «Інститут Біології», вул. Володимирська, 64, Київ 01033, Україна e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com*

MINIATURE ЯК ГІПОТЕТИЧНИЙ БЛОК-РЕГУЛЯТОР BURSICON/ RICKETS СИГНАЛЬНОГО КАСКАДУ В КРИЛОВОМУ ЕПІТЕЛІЇ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Крило дрозозфіли, яка щойно вилупилась з лялечки, представляє собою м'яку компактизовану структуру. Трохи згодом після вилуплення нейрогормон бурсикон, синтезований на даному етапі розвитку комахи у її головному мозку, з током гемолімфи, який створюється і підтримується білатеральними «криловими сердечками» торакса, потрапляє до крила, де запускає ряд процесів в його епітеліальних клітинах, безпомилкове проходження яких, гарантує успішне завершення матурації крила дрозозфіли (Honegger *et al.*, 2008; Togel *et al.*, 2008). Основними подіями, які відбуваються на цій стадії розвитку молодого комахи, є епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП) та апоптоз епітеліальних клітин (Kimura *et al.*, 2004; Natzle *et al.*, 2008), які, в свою чергу, супроводжуються вимиванням клітинного дебрису з порожнини між дорзальним та вентральним шарами кутикули, попередньо синтезованої епідермальними клітинами, розташованими під ними (Honegger *et al.*, 2008; Togel *et al.*, 2008), в результаті чого крило дрозозфіли розгортається та розширюється. Фінальними акордами стають адгезія цих двох кутикулярних шарів, їх склеротизація та меланізація, що врешті-решт призводить до утворення плоского міцного та водночас гнучкого літального органу дорослої комахи (Johnson and Milner, 1987).

Зв'язування бурсикону зі своїм рецептором Rickets, який належить до LGR – підродини GPCR, вважається причиною запуску усіх згаданих вище процесів (Baker and Truman, 2002): Rickets активує гетеротримерний Gs-білок (Kimura *et al.*, 2004; Luo *et al.*, 2005) з утворенням GTP-зарядженої Gas субодиниці та G $\beta\gamma$ гетеродимеру (Gilman, 1987). Gas-GTP запускає апоптоз, в процесі проходження якого задіяні каспази, через активацію cAMP-РКА сигнального шляху (Kimura *et al.*, 2004), в свою чергу, G $\beta\gamma$, скоріш за все є регулятором сигнального шляху відповідального за епітеліально-мезенхімальний перехід та розширення крила (Katanaeva *et al.*, 2010). До всього цього ж інгібітори металопротеїназ, інтегрини та β -катенін також залучені до процесів матурації крила дрозозфіли (Brower and Jaffe, 1989; Kiger Jr *et al.*, 2007).

X-зчеплений ген *miniature* (*m*) є необхідним на пізніх етапах пупаріального розвитку крила (Roch *et al.*, 2003). Його роль консервативна між видами *Drosophila*. Так, мутації цього гена призводять до зменшення розмірів крилової пластинки приблизно у 1.5 рази без зменшення кількості клітин як у *Drosophila melanogaster*, так і у *D. virilis* (Dobzhansky, 1929; Kozeretka *et al.*, 2004). Дослідження ультраструктури мутантних крил виявило порушення у сплюсненні та розширенні стовпчастих клітин епітелію, яке зазвичай відбувається між 32 та 60 годинами після формування пупарію, що може бути причиною виникнення згаданого вище фенотипу (Roch *et al.*, 2003). Окрім цього, неповна адгезія шарів крилового епітелію, присутність залишків клітинного дебрису в товщі крила, наявність видимих під світловим мікроскопом гексагональних меж клітин, які представляють собою кутикулярні утворення, також як і дефекти орієнтації волосків крилової пластинки були описані у мух з мутантним геном *miniature* (Newby *et al.*, 1991; Roch *et al.*, 2003).

Білковий продукт цього гена має у своїй структурі сигнальну послідовність, значну позаклітинну частину із досить консервативним *zona pellucida* (ZP)-доменом, характерною рисою якого є наявність восьми залишків цистеїну, RGD-мотив (сайт зв'язування з інтегринами); та можливі сайти глікозилювання, єдиний трансмембранний регіон та короткий внутрішньоклітинний С-кінцевий хвіст. Наявність передбачуваних сайтів, які впізнаються ендопептидазами фуринового типу (рис. 1А), дає можливість припустити, що *Miniature* може бути позаклітинним білком (Roch *et al.*, 2003; Jovine *et al.*, 2005). Більш того, власне сам ZP-домен являється полімеризаційним модулем позаклітинного матриксу (Jovine *et al.*, 2005).

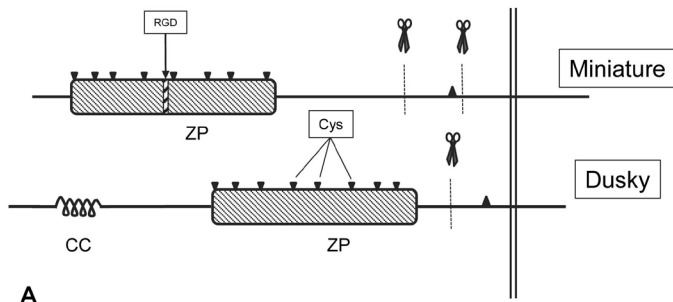


Рис. 1. Структурна модель білків *Miniature* та *Dusky*.

ZP – *zona pellucida* домен, CC – *coiled coil* регіон, можливі сайти глікозилювання вказані трикутниками, передбачувані сайти для впізнавання ендопептидазами фуринового типу вказані ножицями.

Білки позаклітинного матриксу (ПКМ) контролюють численні тканинні події, включаючи регуляцію дифузії чи секреції молекул таких як морфо-

гени чи гормони, підтримуючи їх стабільний градієнт (Hynes, 2009). І так як *Miniature* в значній мірі експресується в епітеліальних клітинах крила і впливає на властивості його ПКМ (Roch *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2005), постає цікаве питання чи процеси матурації крила, які запускаються нейрогормоном бурсиконом, регулюються *Miniature*.

Наше попереднє дослідження, яке мало на меті знайти відповідь на поставлене запитання, додало у загальну скарбницю відомостей про ген *miniature* та його білковий продукт декілька нових фактів, які ще на крок наблизили нас до розуміння його ролі у процесах матурації крила *D. melanogaster*. Так, стало відомо, що у мутантів за цим геном порушено нормальне проходження апоптозу, що проявляється у його сповільненні в порівнянні з мухами дикого типу. Більш того, скоріш за все порушення в структурі гену *miniature* або ж взагалі його відсутність, також негативно впливають і на нормальне проходження ЕМП (ще одного ключового процесу матурації крила). Хоча тут слід сказати, що цей доволі обережний висновок був зроблений на основі непрямих доказів в силу того, що дослідити це напряму (релокалізація β -катеніну дрозозфіли *Armadillo* з мембрани до цитоплазматичного простору) не дала змоги автофлюорисценція кутикулярних утворень в крилах досліджуваних мутантних мух (Bilousov *et al.*, 2012). Таким чином, зроблені висновки спирались на кореляцію ефективного розгортання крила з вдалим проходженням ЕМП (Katanayeva *et al.*, 2010).

Надзвичайно важливим є той факт, що згадані фенотипи спричинені виключно порушеннями у гені *miniature*, і не є результатом пошкодження якихось інших генів. Однак, справедливим буде відмітити, що якщо разом з *miniature* страждає *dusky* (ще один білок ПКМ із ZP-доменом (рис. 1), ген якого до того ж розташований настільки близько до *miniature*, що деякі автори об'єднують їх у єдиний функціональний комплекс), то спостерігається значне підсилення мутантного фенотипу, в той час як при одиничній мутації *dusky* процес апоптозу епітеліальних клітин під час матурації крила значних відхилень від норми не зазнає. З цього можна зробити висновок, що *Dusky* хоча і є необхідним для успішного проходження апоптозу та ЕМП, він, здається, виступає лише в ролі помічника головного героя, якого в цій постановці грає *Miniature*. І останнім, але не менш важливим фактом є розташування *Miniature* у *bursicon/rickets* сигнальному каскаді на рівні рецептора чи його ліганду (Bilousov *et al.*, 2012).

Існує безліч гіпотез і прикладів, коли білки ПКМ виконують не тільки структурну функцію, але й задіяні у передачі різноманітних сигналів, виступаючи при цьому як в ролі резервуарів для накопичення і стабілізації розчинних лігандів чи депо попередників сигнальних молекул, так і в ролі кофакторів чи власне нерозчинних лігандів до відповідних рецепторів (Hynes, 2009). Наприклад, колаген типу IV напряму зв'язує Dpp, який належить до родини TGF β ростових факторів дрозозфіли (Wang *et al.*, 2008).

Так само, білок ПКМ періостин зв'язує та акумулює Wnt ліганди (Malanchi *et al.*, 2012).

На основі всіх вище згаданих припущень та фактів ми спроектували гіпотетичні моделі, які можуть слугувати своєрідною ілюстрацією можливого сценарію розвитку подій під час матурації крила *D. melanogaster*, які запускаються гетеродимерним (burs та pburs) гормоном бурсиконом та його LGR-рецептором Rickets, регуляція взаємодії яких знаходиться під контролем Miniature та Dusky (Рис. 2 А,Б).

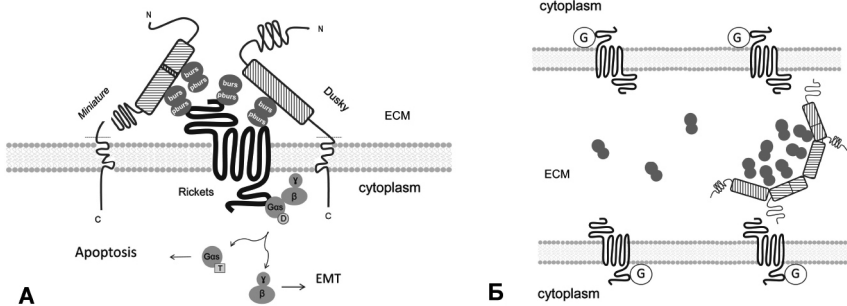


Рис. 2. Гіпотетичні моделі взаємодії Miniature, Dusky, гетеродимерного (burs та pburs) бурсиконом та його LGR-рецептору.

Не зважаючи на те, що у Miniature та Dusky є передбачувані сайти взаємодії з ендопептидазами фуринового типу (Рис. 1), достовірно не відомо чи є ці білки самостійною частиною ПКМ, чи залишають закореними на мембрані. В першій моделі, власне, розглядається останній варіант (Рис. 2 А). Так, білки із ZP-доменом, залишаючись на мембрані зв'язуються з нейрогормоном бурсиконом, таким чином підтримуючи його стабільність, та водночас акумулюючи сигнал, забезпечують його підсилення, безперервність, та підтримання його постійного градієнта у ПКМ завдяки запобіганню передчасного вимивання бурсиконом током гемолімфи з порожнини крила під час його матурації; або ж можливо виступають навіть у ролі кофактора.

Згідно іншої моделі обидва білки, Miniature та Dusky знаходяться у ПКМ, де завдяки полімеризаційним властивостям своїх ZP-доменів формують щось на кшталт резервуару, у якому накопичується бурсикон, який далі самостійно чи в комплексі дифундує в площі крилової пластинки, передаючи сигнал все далі і далі (Рис. 2Б). Цікаве підтвердження цій гіпотезі можна знайти в попередній нашій роботі (Vilousov *et al.*, 2012).

Жодна із запропонованих моделей не суперечить одна одній. Так, в першому випадку утворений комплекс може відрізатися від цитоплазматичної мембрани і діяти за сценарієм другої моделі. В свою чергу, у другому випадку запропонована організація ПКМ за участю Miniature та Dusky

може виступати в ролі бурсиконового пулу, таким чином підтримуючи постійний градієнт ліганду Rickets-рецептору та забезпечуючи безперервність сигналу, що являється характеристиками першої моделі.

На жаль, поки нема експериментального підтвердження взаємодії Miniature з бурсиконом, ці запропоновані моделі залишаються лише гіпотетичними і їх підтвердження та удосконалення потребує проведення додаткових досліджень.

Література

1. *Baker J.D. and Truman J.W.* Mutations in the *Drosophila* glycoprotein hormone receptor, rickets, eliminate neuropeptide-induced tanning and selectively block a stereotyped behavioral program // *Journal of Experimental Biology*. – 2002.- 205, № 17.- P.2555-2565.

2. *Bilousov O.O., Kozeretska I.A. and Katanaev V.L.* Role of the gene Miniature in *Drosophila* wing maturation. // *Journal*. – 2012.- doi:10.1002/dvg.22016.

3. *Brower D.L. and Jaffe S.M.* Requirement for integrins during *Drosophila* wing development // *Nature*. – 1989.- 342, № 6247.- P.285-287.

4. *Dobzhansky T.* The influence of the quantity and quality of chromosomal material on the size of the cells in *drosophila melanogaster* // *Development Genes and Evolution*. – 1929.- 115, № 3.- P.363-379.

5. *Gilman A.G.* G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals // *Annual Review of Biochemistry*. – 1987.- 56, № 1.- P.615-649.

6. *Honegger H.-W., Dewey E. and Ewer J.* Bursicon, the tanning hormone of insects: recent advances following the discovery of its molecular identity // *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*. – 2008.- 194, № 12.- P.989-1005.

7. *Hynes R.O.* The extracellular matrix: not just pretty fibrils // *Science*. – 2009.- 326, № 5957.- P.1216-1219.

8. *Johnson S.A. and Milner M.J.* The final stages of wing development in *Drosophila melanogaster* // *Tissue and Cell*. – 1987.- 19, № 4.- P.505-513.

9. *Jovine L., Darie C.C., Litscher E.S. and Wassarman P.M.* Zona pellucida domain proteins // *Annu Rev Biochem*. – 2005.- 74, № P.83-114.

10. *Katanayeva N., Kopein D., Portmann R., Hess D. and Katanaev V.L.* Competing activities of heterotrimeric G proteins in *Drosophila* wing maturation // *PLoS One*. – 2010.- 5, № 8.- P.e12331.

11. *Kiger Jr J.A., Natzle J.E., Kimbrell D.A., Paddy M.R., Kleinhesselink K. and Green M.M.* Tissue remodeling during maturation of the *Drosophila* wing // *Dev Biol*. – 2007.- 301, № 1.- P.178-191.

12. *Kimura K.-i., Kodama A., Hayasaka Y. and Ohta T.* Activation of the cAMP/PKA signaling pathway is required for post-ecdysial cell death in wing epidermal cells of *Drosophila melanogaster* // *Development*. – 2004.- 131, № 7.- P.1597-1606.

13. *Kozeretska I.A., Gubenko I.S. and Gorb S.N.* New unusual miniature-like wing mutation in *Drosophila virilis* // *J Morphol*. – 2004.- 261, № 3.- P.270-275.

14. *Luo C.-W., Dewey E.M., Sudo S., Ewer J., Hsu S.Y., Honegger H.-W. and Hsueh A.J.W.* Bursicon, the insect cuticle-hardening hormone, is a heterodimeric cystine knot protein that activates G protein-coupled receptor LGR2 // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005.- 102, № 8.- P.2820-2825.

15. Malanchi I., Santamaria-Martinez A., Susanto E., Peng H., Lehr H.-A., Delaloye J.-F. and Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization // Nature. – 2012.- 481, № 7379.- P.85-89.

16. Natzle J.E., Kiger J.A., Jr. and Green M.M. Bursicon signaling mutations separate the epithelial-mesenchymal transition from programmed cell death during *Drosophila melanogaster* wing maturation // Genetics. – 2008.- 180, № 2.- P.885-893.

17. Newby L.M., White L., DiBartolomeis S.M., Walker B.J., Dowse H.B., Ringo J.M., Khuda N. and Jackson F.R. Mutational analysis of the *Drosophila* miniature-dusky (m-dy) locus: effects on cell size and circadian rhythms // Genetics. – 1991.- 128, № 3.- P.571-582.

18. Ren N., Zhu C., Lee H. and Adler P.N. Gene Expression During *Drosophila* Wing Morphogenesis and Differentiation // Genetics. – 2005.- 171, № 2.- P.625-638.

19. Roch F., Alonso C.R. and Akam M. *Drosophila* miniature and dusky encode ZP proteins required for cytoskeletal reorganisation during wing morphogenesis // Journal of Cell Science. – 2003.- 116, № 7.- P.1199-1207.

20. Tögel M., Pass G. and Paululat A. The *Drosophila* wing hearts originate from pericardial cells and are essential for wing maturation // Dev Biol. – 2008.- 318, № 1.- P.29-37.

21. Wang X., Harris R.E., Bayston L.J. and Ashe H.L. Type IV collagens regulate BMP signalling in *Drosophila* // Nature. – 2008.- 455, № 7209.- P.72-77.

Резюме

Сразу после вылупления из пупария, в крыле дрозофилы проходит ряд процессов, совместно называемых матурацией, которые запускаются нейрогормоном бурсиконом и его рецептором Rickets. Здесь представлены гипотетические модели взаимодействия белков внеклеточного матрикса Miniature, а также Dusky, необходимых как на ранних стадиях формирования крыла, так и после вылупления мухи, с белками ответственными за запуск процессов матурации крыла *Drosophila melanogaster*.

Одразу після вилуплення з пупарію, в крилі дрозофіли проходить ряд процесів, які запускаються нейрогормоном бурсиконом та його рецептором Rickets, призводячи до його матурації. Тут представлені гіпотетичні моделі взаємодії білків позаклітинного матриксу Miniature, а також Dusky, які є необхідними як на ранніх стадіях формування крила, так і після вилуплення мухи, з білками відповідальними за запуск процесів матурації крила *Drosophila melanogaster*.

Soon after eclosion, epithelial cells of *drosophila* wing undergo number of processes due to release of neurohormone bursicon and its further binding to GPCR Rickets, collectively referred to as wing maturation. Here we propose hypothetical models of interaction between extracellular Miniature, and also Dusky, proteins and proteins responsible for the triggering of the wing maturation processes in *Drosophila melanogaster*.

ВАГИН Ю. В.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Украина, 03680, Киев, ул. Акад. Заболотного, 150; e.mail: maliuta@imbg.org.ua

СИНТЕЗ НЕОДАРВИНИЗМА И ГЕНЕТИКИ РАЗВИТИЯ: УКРЕПЛЕНИЕ ПОЗИЦИЙ

Во второй половине XX века четко обозначились узловые положения, характеризующие кризис неodarвинизма. Неodarвинизм так и не смог дать удовлетворительного объяснения возникновению в процессе эволюции организмов сложных признаков [1, 2]. Не вписывались в представления неodarвинизма о равномерном течении эволюционного процесса палеонтологические данные, указывающие на разносторонний характер филогенеза [3]. Особо прискорбным для него обстоятельством явилась узость эмпирической базы, призванной подтвердить ведущую роль положительного отбора в процессах формирования и реорганизации генетической структуры популяций [4 – 8]. Выход из создавшегося положения ознаменовался глубокой ревизией неodarвинизма, нашедшей свое выражение в новом эволюционном синтезе (НЭС) между неodarвинизмом и генетикой развития [1, 2]. Вместе с тем, в рамках неodarвинизма и НЭС неколебимо сохраняется основополагающий постулат классического дарвинизма о «творческой роли» положительного отбора в морфологической эволюции организмов [2, 7, 9]. В современной редакции, под «творческой ролью» подразумевается действие положительного отбора на уровне фенотипов, нацеленное на преобразование наследственной программы индивидуального развития организмов, как ответа на изменяющиеся экологические требования [2, 7, 9, 10].

В качестве лейтмотива модернизации парадигмы неodarвинизма, осуществляемой в рамках НЭС, выступает теоретический постулат о разграничении ролей структурных генов и генов-регуляторов в эволюционном процессе. Исходя из него, Р. Рэфф и Т. Кофмен подчеркивают [2], что основной отличительной чертой действия движущей формы положительного отбора является селекция мутантных аллелей относительно небольшого количества генов-регуляторов, функционирующих в качестве переключателей альтернативных состояний или путей онтогенеза. Тем самым, определяется направление исторического развития быстро эволюционирующих, в геологическом масштабе времени, организмов [1, 2]. По мнению Р. Рэффа и Т. Кофмена, указанные аллели не индуцируют остановку развития, как это наблюдается в большинстве случаев при мутациях структурных генов, а обеспечивают его переключение с одного пути на другой. При этом эволюционные изменения достигаются за счет трансформации существующей наследственной программы индивидуального развития организма, а наблюдаемые между видами морфологические различия обусловлены в основном мутациями упомянутых выше генов-регуляторов. Следовательно, вектор

активности движущего отбора направлен на модернизацию морфогенетической программы онтогенеза; указанный отбор задает темп и определяет направление морфологической эволюции организмов, а в его действии превалирует селективная функция. В свою очередь, селекция структурных генов играет ключевую роль в поддержании, а в случае необходимости и коррекции основного типа онтогенеза у медленно эволюционирующих организмов. Этот процесс находится под мощным контролем стабилизирующей формы положительного отбора, осуществляемым путем «постепенной замены вариантных аллелей (структурных генов) в соответствии с представлениями классической теории эволюции» [2]. В данном случае под «классической теорией эволюции» подразумевается неодарвинизм. Указанная форма положительного отбора контролирует ход адаптивной эволюции организмов путем фиксации аллелей структурных генов, усиливающих гомеостаз индивидуального развития особей и обеспечивающих, тем самым, укрепление существующей морфы [10, 12, 13]. В ее действии достигается определенное равновесие между элиминирующей и селективной функциями, что показали, в том числе, и наши исследования [14].

За последние годы получены принципиально важные данные, подтверждающие воззрения НЭС на определяющую роль наследственных изменений регуляторных систем генома в морфологической эволюции организмов. Выяснилось, что на фоне серьезных морфологических отличий, различия между геномами шимпанзе и человека весьма незначительны и составляют < 1,0% [15]. Отмечаемые в геноме человека изменения, происходившие под контролем положительного отбора, затрагивают относительно небольшое количество районов ДНК, среди которых выделяются так называемые зоны ускоренного развития человека (*Human Accelerated Regions – HAR*). Они, главным образом, ответственны за регуляцию процессов формирования ряда признаков, игравших ключевую роль в эволюции человека: коры и размеров головного мозга; мышц лица, участвующих в артикуляции; запястья и большого пальца руки [16]. Сравнительный анализ зоны *HAR1* стал ярким примером, демонстрирующим неравномерность течения эволюционного процесса. Выяснилось, что до появления человека зона *HAR1*, состоящая из 118 нуклеотидов, была почти неизменна: ее состав у кур и шимпанзе, эволюционные пути которых разошлись примерно 300 млн. лет назад, различается всего на два нуклеотида. В то же время у человека и шимпанзе, имевших общего предка 6 млн. лет назад, в зоне *HAR1* накопилось 18 различий. Это указывает на важную роль *HAR1* в эволюции человека; установлено, что указанная зона ответственна за регуляцию морфогенеза коры больших полушарий головного мозга [16]. В результате исследований, проведенных палеонтологами и эмбрионетиками, коренным образом изменились воззрения на генезис пера и его первоначальную функцию [17]. Выяснилось, что продукты генов *Sbb* и *Bmp2*, функционирующих как модульная пара сигнальных молекул, многократно используются в процессе

индивидуального развития пера. Они индуцируют пролифериацию клеток эпидермиса, регулируют ее скорость и способствуют клеточной дифференцировке, контролируя, тем самым, все стадии онтогенеза перьев у современных птиц. При этом указанные стадии демонстрируют поразительное тождество с этапами, характеризующими исторический процесс возникновения пера у динозавров. Эти данные привели исследователей к выводу о формировании примитивных перьев у древних рептилий из эпидермиса. По мнению палеонтологов первоначально они «отвечали за терморегуляцию, защиту кожи от повреждений и намокания, маскировку и т. д.», а их дальнейшая эволюция привела к появлению современного строения пера у двуногих хищных ящеров [17].

Эволюция глаза – проблема стоящая особняком в биологии [18]. Ч. Дарвин не смог объяснить возникновения столь сложного органа с позиций естественного отбора. Ее решение было найдено относительно недавно. Реконструировать путь исторического развития глаза позволили результаты исследований, связанные с изучением, его строения, хода индивидуально-го развития и контролирующих этот ход наследственных программ у представителей различных систематических групп. Выяснилось, что предтечей глаза являлся существовавший примерно 600 млн. лет назад светочувствительный орган, призванный поддерживать циркадные и сезонные биоритмы организма [19]. Путем поэтапной трансформации морфогенетической программы данного органа, происходившей под действием положительно-го отбора, 100 млн. лет назад завершилось формирование типичного глаза современных позвоночных [18, 19].

Итак, результаты исследовательских программ, разработанных на основе теоретических положений НЭС, подтвердили: ведущую роль в морфологической эволюции регуляторных элементов наследственного материала; наличие механизмов неравномерного течения филогенеза, основанных на различной роли генов-регуляторов и структурных генов в эволюционном процессе; поступательного возникновения сложных признаков, опирающегося на трансформацию «прародительской» морфогенетической программы. Опираясь на анализ палеонтологического материала и данные онтогенетики [16 – 19], исследователям удалось распознать первоначальное функциональное значение ряда морфологических признаков и проследить их последующую историческую трансформацию. При этом во всех указанных событиях отчетливо проявилась ведущая роль положительного отбора.

Необходимо отметить, что факты, представленные в сообщениях [15 – 17], противоречат устоявшейся точке зрения на механизм видообразования [7]. Данная точка зрения требует корректировки, главным образом, в соответствии с теоретическим положением НЭС о разграничении ролей структурных генов и генов-регуляторов в эволюционном процессе [2]. Таким образом, в полной мере начинает сбываться «пророчество» С. Гилберта [2] о том, что синтез неodarвинизма и генетики развития: «может привести к пе-

реоценке наших представлений о механизмах, лежащих в основе эволюционного изменения и разнообразия животных», По сути, данный синтез [1, 2] олицетворяет собой идею о сведении воедино процессов фило- и онтогенеза [12, 20], говоря иначе, он направлен на создание общей (холистической) теории развития. Исходя из этого, на первый план выходят результаты экспериментальных исследований, проводимых в рамках НЭС. Их целью является дальнейшее формирование фактологической базы, необходимой для решения задач, связанных с установлением общих закономерностей индивидуального и исторического развития организмов.

Литература

1. *Гилберт С.* Биология развития / С. Гилберт С. – М.: Мир, 1993. – Т. 3. – 350 с.
2. *Рэфф Р.* Эмбрионы, гены и эволюция / Р. Рэфф, Т. Кофмен – М.: Мир, 1986. – 402 с.
3. *Кэрролл Р.* Палеонтология и эволюция позвоночных / Р. Кэрролл – М.: Мир, 1993. – Т. 3. – 313 с.
4. *Кимура М.* Молекулярная эволюция: теория нейтральности / М. Кимура – М.: Мир, 1985. – 394 с.
5. *Левонтин Р.* Генетические основы эволюции / Р. Левонтин – М.: Мир, 1978. – 351 с.
6. *Эфроимсон В.П.* Введение в медицинскую генетику / В.П. Эфроимсон – М.: Наука, 1969. – 389 с.
7. *Dobzhansky Th.* Genetics of the evolutionary process / Dobzhansky Th. – N.Y.: Columbia Univ. Press, 1970. – 505 p.
8. *Ford E.B.* Ecological genetics / E.B. Ford – London: Chapman & Hall, 1971. – 410 p.
9. *Тимофеев-Ресовский Н.В.* Краткий очерк теории эволюции / Н.В. Тимофеев-Ресовский, Н.Н. Воронцов, А.В. Яблоков – М.: Наука, 1977. – 297 с.
10. *Шмальгаузен И.И.* Факторы эволюции. Теория стабилизирующего отбора / И.И. Шмальгаузен – М.: Наука, 1968. – 451 с.
11. *Гунбин К.В.* Ароморфозы и адаптивная молекулярная эволюция / К.В. Гунбин, В.В. Суслов, Н.А. Колчанов // Вестник ВОГиС. – 2007. – Т. 11, № 2. – С. 373 – 400.
12. *Шмальгаузен И.И.* Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии / И.И. Шмальгаузен – М.: Наука. – 1982. – 383 с.
13. *Шмальгаузен И.И.* Кибернетические вопросы биологии / И.И. Шмальгаузен – Новосибирск: Наука, 1968. – 223 с.
14. *Вагин Ю.В.* Положительный пренатальный отбор у плацентарных млекопитающих / Киев: Наукова думка, в печати.
15. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications / Z. Cheng, M. Ventura, X. She [et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 437, № 7055. – P. 88 – 93.
16. *Поллард К.* Что делает нас людьми? / К. Поллард // В мире науки – 2009, № 7. – С. 25 – 29.
17. *Прам Р., Браш А.* Динозавры или птицы: кто оперился первым? / Р. Прам, А. Браш // В мире науки – 2003, № 7. – С. 62 – 71.
18. *Лэм Т.* Эволюция глаза // В мире науки – 2012, № 1. – С. 64 – 71.

19. Evolution of the vertebrate eye: opsin, photoreceptors, retina and eye cup / Lamb T.D., Handwerker, C.A. Kessler [et al.] // Nature Reviews Neuroscience. – 2007. – Vol. 8. – P. 960 – 975.

20. Северцов А. Н. Этюды по теории эволюции / А. Н. Северцов – Берлин: РСФСР, 1921. – 312 с.

Резюме

В последнее десятилетие получен ряд данных, подтверждающих правомерность постулированного в рамках НЭС взгляда на процесс исторического развития организмов.

В останне десятиріччя отримано ряд даних, що підтверджують правомірність постульованого у рамках НЕС погляду на процес історичного розвитку організмів.

Over the last decade there was generated a series of data confirming a justification for postulated within NES outlook for process of organism historical development.

ВАСИЛЕНКО О. П., ПРОНИНА О. В., РУШКОВСКИЙ С. Р.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Учебно-научный центр «Институт биологии», Украина, 01601, Киев, ул. Владимирская, 64, e-mail: helga.wasilenko@gmail.com.

ЗАВИСИМОСТЬ ИНДУКЦИИ ЭФФЕКТА «СВИДЕТЕЛЯ» ОТ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК

Эффект «свидетеля» (ЭС), как феномен, при котором облучённые клетки генерируют стрессорный сигнал, приводящий к повреждениям расположенных в непосредственной близости интактных клеток [1], был зарегистрирован во многих экспериментах на клетках позвоночных и других многоклеточных [2-4], а также некоторых представителей одноклеточных организмов [5].

Ранее нами была показана возможность передачи ЭС сигнала между клетками организмов находящихя далеко друг от друга в эволюционном плане, что даёт основание предполагать неспецифичность ЭС сигнала [6]. Мы проводили совместное культивирование клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с лимфоцитами периферической крови (ЛПК) человека, где облучённые клетки дрожжей являлись донором ЭС сигнала, а ЛПК – клетками «свидетелями». Разработанный нами подход оказался перспективным в изучении механизмов ЭС. Так, используя в качестве донора ЭС сигнала штамм дрожжей утративший митохондриальную ДНК (ρ^0 -клетки), нами было показано что проявление ЭС зависит от нормального функционирования митохондрий клеток-доноров [7].

Ряд исследований показал, что уровень повреждения клеток-реципиентов может изменяться в зависимости от их пролиферативной активности во время воздействия на них ЭС сигнала [8]. Однако в литературе отсутствуют данные про то, в какой мере функциональное состояние самих клеток-доноров ЭС сигнала во время воздействия на них повреждающих

факторов влияет на индукцию эффекта «свидетеля». Поэтому целью нашей работы было сравнить эффективность индукции ЭС в лимфоцитах периферической крови человека в зависимости от активности деления клеток дрожжей. Для этого в качестве доноров ЭС сигнала мы использовали клетки дрожжевых культур в стационарной фазе роста (покоящиеся клетки), и логарифмической фазе роста (активно делящиеся клетки).

Материалы и методы

В исследовании были использованы гаплоидный ρho^+ (клетки с функциональными митохондриями) штамм дрожжей DLY 640 (происходит от штамма W303 [9]) и полученный от него штамм ρho^0 (клетки утратившие митохондриальную ДНК) в стационарной и логарифмической фазе роста. Для получения штамма ρho^0 , клетки ρho^+ штамма культивировали в 2 мл жидкой среды YPD, содержащей бромистый этидий в концентрации 10 мкг/мл. После инкубации клетки дважды отмывали дистиллятом и высевали на плотную YPD. Контроль потери митохондриальной ДНК проводили с помощью люминесцентной микроскопии после прижизненного окрашивания DAPI.

Образцы цельной крови (1 мл) культивировали при 37 °С 48 часов в 5 мл среды RPMI-1640 с добавлением ФГА. В начале культивирования проводили экспериментальную контаминацию культур облучёнными рентгеновскими лучами (аппарат РУМ-17, доза 1 Гр и 10 Гр) или необлученными клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (10^6 клеток на культуру). Дозы подбирались исходя из данных наших предыдущих исследований [6, 7, 10]. После культивирования, готовились препараты метафазных пластинок ЛПК, которые анализировались на наличие aberrантных метафаз.

Результаты и обсуждение

Совместное культивирование лимфоцитов с необлученными клетками дрожжей ρho^+ штамма ($1,33 \pm 0,66\%$ – культура ЛПК, $1,67 \pm 0,74\%$ – культура ЛПК с необлученными дрожжами, $p > 0,05$) и ρho^0 штамма ($1,00 \pm 0,70\%$ – культура ЛПК; $2,00 \pm 0,99\%$ – культура ЛПК с необлученными дрожжами, $p > 0,05$) не приводило к статистически значимым изменениям уровня aberrантных метафаз (AM) в ЛПК по отношению к контролю. Это подтверждает тот факт, что контаминация культуры ЛПК дрожжевыми клетками не влияет на уровень AM в лимфоцитах.

Как показано на рис. 1, при совместном культивировании с облучёнными клетками дрожжей ρho^+ штамма в стационарной в стационарной фазе роста, в лимфоцитах наблюдалось статистически значимое увеличение уровня AM в сравнении с культурой ЛПК сокультивируемой с необлученными дрожжами ($8,00 \pm 1,92\%$ – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 1 Гр; $8,33 \pm 1,60\%$ – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 10 Гр; $3,00 \pm 0,98\%$ – культура ЛПК с не облучёнными дрожжами, $p < 0,01$).

Аналогичная ситуация наблюдалась для культуры ЛПК при совместном культивировании с дрожжами в логарифмической фазе роста ($5,67 \pm 1,33\%$ – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 1Гр; $5,37 \pm 1,56\%$ – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 10 Гр; $1,67 \pm 0,74\%$ – культура ЛПК с не облучёнными дрожжами, $p < 0,01$). Несмотря на то, что наблюдалась тенденция к снижению эффективности индукции ЭС дрожжами в логарифмической фазе роста, разница между уровнем АМ в лимфоцитах сокультивируемых с дрожжами в стационарной и логарифмической фазе роста, была статистически не значима (рис. 1). При этом в обоих случаях уровень АМ в лимфоцитах, не зависел от дозы облучения дрожжевых клеток.

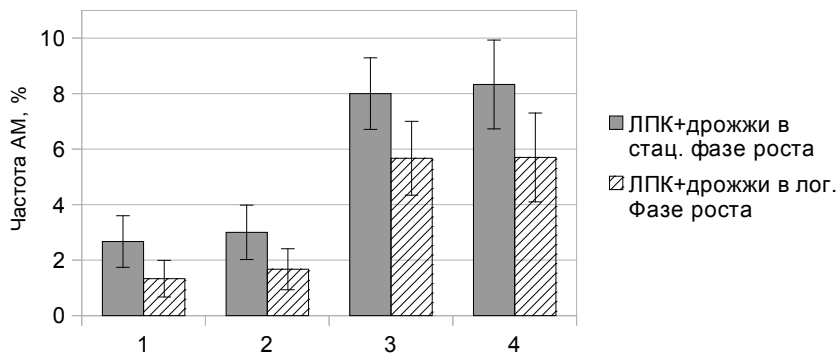


Рис. 1 Уровень aberrantных метафаз (АМ) в ЛПК при сокультивировании с клетками ρho^+ штамма дрожжей. 1 – контроль (культура ЛПК), 2 – культура ЛПК с необлучёнными дрожжами, 3 – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 1 Гр, 4 – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 10 Гр

В предыдущей работе [10] нами было показано, что при сокультивировании лимфоцитов с облучёнными дрожжами ρho^0 штамма в стационарной фазе роста ЭС проявлялся слабо и только после воздействия на клетки дрожжей ионизирующей радиации в дозе 10 Гр ($2,50 \pm 1,10\%$ – культура ЛПК с не облучёнными дрожжами; $2,00 \pm 0,81\%$ – культура ЛПК с облучёнными дозой 1Гр дрожжами; $3,67 \pm 1,09\%$ – культура ЛПК с облучёнными дозой 10 Гр дрожжами). Совместное культивирование с облучёнными ρho^0 клетками дрожжей в логарифмической фазе роста однако не привело к статистически значимому увеличению уровня АМ в лимфоцитах по отношению к культуре ЛПК с не облучёнными дрожжами ($2,00 \pm 0,99\%$ – культура ЛПК с не облучёнными дрожжами; $2,00 \pm 0,99\%$ – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 1Гр; $2,00 \pm 0,81\%$ – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 10Гр, $p > 0,05$) (рис.2).

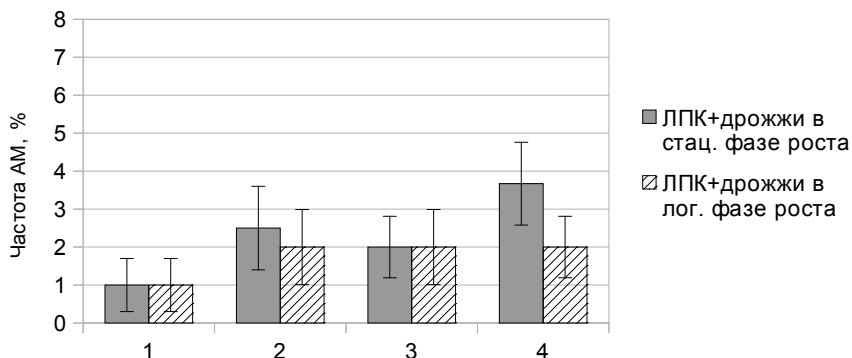


Рис. 2 Уровень aberrантных метафаз (АМ) в ЛПК при сокультивировании с клетками ρho^0 штамма дрожжей. 1 – контроль (культура ЛПК), 2 – культура ЛПК с необлученными дрожжами, 3 – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 1 Гр, 4 – культура ЛПК с дрожжами облучёнными дозой 10 Гр

Таким образом, клетки ρho^0 штамма дрожжей в логарифмической фазе роста, в отличие от ρho^+ клеток, не индуцировали проявление ЭС в ЛПК. Это подтверждает данные полученные нами ранее [10], про связь генерации ЭС сигнала с нормальным состоянием митохондрий и митохондриального генома клеток-доноров.

Выводы

Исходя из полученных нами данных следует, что для системы совместного культивирования лимфоцитов периферической крови человека с клетками дрожжей, пролиферативная активность клеток-доноров ЭС сигнала не является достаточно важным фактором, влияющим на эффективность индукции ЭС в клетках-реципиентах.

Литература

1. *Rzeszowska-Wolny J., Przybyszewski W., Widel M.* Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy // *European Journal of Pharmacology* – 2009. – Vol.625 – P.156-164
2. *Yang G., Wu L., Chen L., Pei B., Wang Y., Zhan F., Wu Y., Yu Z.* Targeted irradiation of shoot apical meristem of Arabidopsis embryos induces long-distance bystander/abscopal effects // *Radiation Research* – 2007. – Vol.167, №3. – P. 298-305.
3. *Daev E.V., Kazarova V.E., Vyborova A.M., Dukelskaya A.V.* Pheromones and adaptive bystander-mutagenesis in mice // *Third Internat. Conf. «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution»* – 2010. – P.55.
4. *Sroya R., Smith R., Seymour C., Mothersill C.* Injection of reserpine into zebrafish, prevents fish to fish communication of radiation-induced bystander signals: confirmation in vivo of a role for serotonin in the mechanism // *Dose-Response* – 2010. – Vol. 8. – P.317-330.

5. Muller W., Ushijima H., Batel R., Krasko A., Borejko A., Muller I., Schroder H. Novel mechanism for the radiation-induced bystander effect: nitric oxide and ethylene determine the response in sponge cells // *Mutat. Res.* – 2006. – Vol. 597, № 1-2. – P. 62-72.

6. Василенко О.П., Пронина О.В., Рушковский С.Р. Эффект «свидетеля» при совместном культивировании дрожжей с лимфоцитами периферической крови человека // *Матер. междунар. конфер. «Радиация и экосистемы».* – Гомель – 2008. – С. 263-267

7. Vasylenko O.P., Pronina O.V., Rushkovsky S.R. Bystander effect in human lymphocytes incubated with irradiated mitochondrial DNA deficient yeast cells // *Radioprot.* – 2011. – Vol. 46, № 6. – P. 555-559.

8. Purschke M., Anderson R., Zurakowski D., Manstein D. Cell-cycle-dependent active thermal bystander effect (ATBE) // *Lasers in Surg. and Med.* – 2011. – Vol.43. – P. 230-235.

9. Zubko M.K., Guillard S., Lydall D. Exo1 and Rad24 differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants // *Genetics* – 2004. – Vol.168. – P. 103-115

10. Василенко О.П., Пронина О.В., Рушковский С.Р. Хромосомная нестабильность в лимфоцитах периферической крови человека при совместном культивировании с облученными клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць, т.10.* – Київ: Логос, 2011. – С. 28-33

Резюме

В даній роботі ми показали, що при совместном культивировании лимфоцитов периферической крови человека с клетками дрожжей, пролиферативная активность клеток-доноров ЭС сигнала (дрожжей *S. cerevisiae*) является не достаточно важным фактором, влияющим на эффективность индукции ЭС в клетках-реципиентах (ЛПК). Сила проявления ЭС зависит от нормального функционирования митохондрий.

У даній роботі ми показали, що при сумісному культивуванні лімфоцитів периферичної крові людини з клітинами дріжджів, проліферативна активність клітин-донорів ЕС сигналу (дріжджів *S. cerevisiae*) являється не достатньо важливим фактором, що впливатиме на ефективність індукції ЕС в клітинах-реципієнтах (ЛПК). Сила прояву ЕС залежить від нормального функціонування мітохондрій.

In the present study, we have demonstrated that during cocultivation human lymphocytes with yeast, proliferative activity of donor cells for the BE signal (yeast *S. cerevisiae*) is not critically important factor for the efficiency of induction BE in receptor cells (lymphocytes). Strength of bystander effect depends on normally functioning mitochondria.

ВОЛКОВА Н.Е., ФИЛИПОНЕНКО Н.С., КОСТЕНКО В.В., ВОРОБЬЁВА Л.И.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы 4, e-mail: volkova_natalya@bk.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОМПОНЕНТОВ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ ВЫБОРОК ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАИНЫ РАЗНЫХ ЛЕТ И ПРОИЗВОДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЛИНИЙ

Анализ вклада генетической и средовой компонент в изменчивость природных популяций *Drosophila melanogaster* по количественным признакам – предмет исследования многих работ [1]. Особый интерес представляют адаптивно значимые признаки, по которым, как было показано [2], в природных условиях нарушается равновесие вследствие их постоянной подверженности действию естественного отбора. В природных популяциях широко распространены гетерозиготные организмы, которые характеризуются высокой жизнеспособностью и хорошей приспособляемостью [3], а снижение степени гетерозиготности приводит к нарушению надёжности и устойчивости развития [4, 5]. Оценить направление и степень изменения гетерозиготности в природных популяциях, особенно по локусам, контролирующим количественные признаки, крайне сложно. При проведении такого рода исследований, как правило, анализируется потомство сравнительно небольших выборок особей, отловленных в природе, что сопровождается переводом их на лабораторное содержание. Исходя из этого была сформулирована цель данной работы: в рамках долгосрочного мониторинга динамики популяций *D. melanogaster* Украины и экологического состояния регионов оценить и сравнить приспособленность выборок из природных популяций данного вида двух последовательных годов сбора (1 и 2), обитающих на территориях с разным уровнем радиационного загрязнения, а также проанализировать изменения в структуре показателя приспособленности при переходе на лабораторное содержание (1+1 лаб.).

Материалы и методы

Материал исследования: потомство первого и второго поколений особей, отловленных из природных популяций Магарач (г. Ялта, винзавод «Магарач»), Яблочный сад (г. Чернобыль; 100 мкР/час) и Озеро (водоем-охладитель ЧАЭС; 2100 мкР/час) в августе-сентябре двух последовательных годов сбора. И особи одноимённых линий, сформированных из потомства соответствующих выборок первого года сбора и содержащиеся в течение года в лаборатории. Природный материал был предоставлен нам для исследований к.б.н., доц. Козерецкой И.А. (Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина). Учитывали компоненты приспособленности: плодовитость, смертность на стадии метаморфоза, соотношение полов на момент выхода имаго, жизнеспособность, смертность на ранних стадиях эмбриогенеза (ДЛМ: ранние – рДЛМ, поздние – пДЛМ, суммар-

ный уровень – сумДЛМ), среднюю и максимальную продолжительность жизни самок и самцов (имаго). Статистический анализ данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования установлены (Табл. 1) достоверные различия между выборками первого и второго годов по плодовитости, уровню рДЛМ и сумДЛМ. Так, плодовитость особей выборки Яблочный сад второго года сбора достоверно ниже по сравнению с выборкой первого года; выборка Магарач второго года сбора, наоборот, отличается достоверно более высоким показателем плодовитости в сравнении с выборкой первого года. Выборки же из популяции Озеро характеризуются стабильными показателями плодовитости. Переход на лабораторное разведение сопровождается выравниванием средних значений данного показателя в трёх линиях. Отдельно следует отметить, что для лабораторной линии Яблочный сад отмечается снижение вариабельности (практически в два раза) по показателю плодовитость, по сравнению с исходной выборкой. Для всех исследованных выборок не установлено существенных отличий по показателю смертности на стадии метаморфоза. И только в лабораторной линии Магарач его значения в два раза снижаются, по сравнению с исходной выборкой, сопровождаясь при этом существенным уменьшением разнообразия. Жизнеспособность особей всех трёх выборок первого года оказалась ниже как по сравнению с соответствующими выборками следующего года сбора, так и по сравнению с соответствующими производными лабораторными линиями. Были выявлены также и различия по уровню сумДЛМ, основную долю которых составляют рДЛМ. Уровень рДЛМ и сумДЛМ существенно выше в выборках первого года, как по сравнению с выборками следующего года, так и по сравнению со значениями данных показателей в среднем характерных для линий дикого типа, содержащихся в культуре.

При помощи дисперсионного анализа количественных признаков было установлено, что по плодовитости выборки первого года не различаются между собой, также как и по уровню смертности на стадии метаморфоза. В этих выборках соотношение полов на момент вылета имаго зависит от популяционной принадлежности ($F=4,79$; $p=0,009$). Двухфакторный дисперсионный анализ показателя жизнеспособность также выявил влияние принадлежности к определённой популяции ($F=4,85$; $p=0,008$), но не к определённому полу, на данный признак. Кроме того, выборки первого года не различаются по уровню ДЛМ. Выборки второго года с тех же территорий между собой не различаются по плодовитости, уровню смертности на стадии метаморфоза и жизнеспособности. Половые различия по жизнеспособности особей из выборок второго года также не обнаружены. Как и аналогичные выборки первого года, выборки второго года не различаются и по уровню ранней эмбриональной смертности. Линии, основанные на природных выборках первого года и содержащиеся в течение года в лаборатор-

Таблица 1.

Компоненты приспособленности выборок из природных популяций и производных линий дрезофилы

Выборка	1		2		1+1 лаб.		
	x±sx	V (%)	x±sx	V (%)	x±sx	V (%)	
Плодовитость							
Магарач	97,16±13,33	59,82	122,96±10,47	42,59	104,30±17,49	53,04	
Я. сад	113,55±10,19	40,12	90,95±8,63	41,33	110,75±6,47	28,64	
Озеро	127,47±6,66	40,47	122,3±12,94	47,33	114,69±6,88	48,76	
Жизнеспособность							
Магарач	♀	47,55±6,47	60,8	54,40±4,87	44,76	46,90±8,84	59,62
	♂	45,25±6,2	61,24	58,84±5,07	43,05	52,90±9,27	55,41
	∑	46,4±4,09	60,28	113,24±9,66	42,66	99,80±16,97	53,78
Я. сад	♀	50,65±5,07	44,72	43,37±5,19	52,16	51,96±3,59	33,81
	♂	55,25±5,44	44,02	50,21±6,17	53,54	51,92±3,61	34,07
	∑	52,95±4,09	44,02	93,58±11,19	52,14	103,75±6,63	31,32
Озеро	♀	60,95±3,42	42,4	55,75±6,46	51,79	54,95±3,44	50,82
	♂	60,1±3,53	43,83	59,60±7,08	53,12	52,90±9,27	54,03
	∑	60,53±2,36	42,94	115,35±13,11	50,82	111,64±7,09	51,59
Смертность на стадии метаморфоза							
Магарач	8,7±2,97	148,85	8,87±1,94	109,25	4,36±0,83	60,32	
Я. сад	7,2±1,1	70,28	7,67±4,15	235,72	6,96±1,39	98,42	
Озеро	5,5±0,9	131,20	7,23±1,63	100,69	6,29±0,82	106,04	
рДЛМ							
Магарач	7,39±2,79	164,55	2,69±0,75	87,94	11,27±2,54	71,34	
Я. сад	9,95±1,42	63,62	2,87±1,03	113,24	4,53±1,53	106,17	
Озеро	8,41±2,59	115,22	3,30±0,99	94,84	5,09±5,42	106,48	
пДЛМ							
Магарач	0,18±0,12	300	0,82±0,38	121,95	2,14±0,68	100,47	
Я. сад	0,59±0,19	144,07	0,32±0,18	175,55	0,27±0,15	170,37	
Озеро	0,28±0,15	193,1	1,15±1,12	304,35	0,60±0,20	185	
сум.ДЛМ							
Магарач	7,57±2,77	159,71	4,45±2,03	75,21	13,37±3,12	73,82	
Я. сад	10,57±1,50	63,58	3,12±1,06	107,62	4,81±1,56	102,70	
Озеро	8,7±2,69	115,65	3,51±0,84	144,49	5,69±1,12	108,08	

ных условиях, также между собой не различаются по показателям плодовитости, смертности на стадии метаморфоза и жизнеспособности, а также по жизнеспособности самок и самцов. Но, в отличие от природных выборок, они различаются уровнем ранней эмбриональной смертности (рДЛМ: F=4,60; p=0,015; пДЛМ: F=6,48; p=0,003; сумДЛМ: F=5,40; p=0,0077). На

все три показателя, характеризующие раннюю эмбриональную смертность, оказывают существенное влияние условия существования (сохранение естественного местообитания или перевод в «стандартные» условия) (рДЛМ: $F=4,55$; $p=0,012$; пДЛМ: $F=3,08$; $p=0,049$; сумДЛМ: $F=3,57$; $p=0,03$); причём характер изменений (снижение или увеличение) зависит от принадлежности к той или иной исходной популяции (рДЛМ: $F=2,51$; $p=0,045$; пДЛМ: $F=2,45$; $p=0,049$; сумДЛМ: $F=2,98$; $p=0,02$). Учитывая экологические условия естественных местообитаний анализируемых популяционных выборок, можно предположить, что повышенный радиационный фон может быть критическим фактором, сдвигающим действие отбора преимущественно на стадию раннего эмбриогенеза и стабилизирующим определенным образом генетическую структуру популяции по генам, определяющим плодовитость и жизнеспособность.

При анализе показателей продолжительности жизни (Табл.2) установлено, что для самцов всех выборок второго года изученные показатели ниже по сравнению с выборками первого года сбора. При этом в выборках популяций Магарач, независимо от года, наблюдаются половые отличия по средней и максимальной продолжительности жизни, причем более долгоживущим является женский пол.

Таблица 2.

Соотношение и дифференциальная продолжительность жизни полов в выборках из природных популяций и производных линиях дрозофилы

Выборка		1			2			1+1лаб.		
		N	СПЖ	МПЖ	N	СПЖ	МПЖ	N	СПЖ	МПЖ
Магарач	♀	951	19,5	31,5	1329	18,5	24,5	469	24,5	27,5
	♂	905	13,5	28,5	1433	10	14	529	21,5	24,5
	χ^2	1,14			3,9			3,6		
	p	>0,05			<0,05			>0,05		
Я. сад	♀	1013	22,5	31,5	824	29	32,5	1247	27,5	32,5
	♂	1105	22,5	43,5	954	18,5	24,5	1246	18,5	21,5
	χ^2	3,98			9,5			0,5		
	p	<0,05			<0,01			>0,05		
Озеро	♀	3657	32,5	47,5	1115	15,5	24,5	1070	18,5	23,5
	♂	3606	33,5	43,5	1192	15,5	21,5	1134	15,7	21,5
	χ^2	0,36			2,58			1,86		
	p	>0,05			>0,05			>0,05		

Для выборок популяции Яблочный сад характерно отсутствие половых различий по средней продолжительности жизни в выборках первого года, но их наличие в следующем году. Кроме того в выборке этой популяции первого года сбора более высоким значением максимальной продолжи-

тельности жизни характеризуются самцы, что однако не сохраняется при лабораторном разведении данной линии. Во всех популяционных выборках, где наблюдаются половые различия, характерной является большая средняя продолжительность жизни самок, по сравнению с самцами. Для обеих выборок популяции Озеро не выявлено половых различий средней продолжительности жизни. По показателю максимальной продолжительности жизни в выборках популяции Озеро обнаружены половые различия, причем самки живут дольше, чем самцы. Так же выявлено значимое его снижение для особей обоих полов в выборках второго года сбора, по сравнению с предыдущим, и для особей лабораторной линии по сравнению с исходной выборкой. Можно предположить, что популяция, обитающая в условиях повышенного радиационного фона, стабилизирована по аллельному составу локусов (возможно X-сцепленных), обуславливающих различия средней продолжительности жизни полов, т.е. самцы с рецессивными мутациями в генах X-хромосомы, снижающими среднюю продолжительность жизни, не доживают до стадии имаго и не учитываются при анализе продолжительности жизни.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышенный радиационный фон может быть критическим фактором, сдвигающим действие отбора преимущественно на стадию раннего эмбриогенеза и стабилизирующим определенным образом генетическую структуру популяции по генам, определяющим плодовитость и жизнеспособность, а также по аллельному составу локусов, обуславливающих различия средней продолжительности жизни полов. Условия существования (сохранение естественного местообитания или перевод в «стандартные» условия) оказывают значимое влияние на раннюю эмбриональную смертность и на пол-специфические особенности продолжительности жизни имаго, причём характер изменений (снижение или увеличение) в данном случае зависит от принадлежности к той или иной исходной популяции.

Литература

1. *Имашева А.Г., Лазебный О.Е.* Изменчивость природных популяций *Drosophila melanogaster* Евразии по признакам поведения // Генетика. – 1993. – Т.29, №10. – 1646-1655.
2. *Никоро З.С., Васильева Л.А.* Проблема изменчивости и отбора по количественным признакам на примере популяции *Drosophila* // В кн.: Дрозофила в экспериментальной генетике. – М.: Наука, 1978. С. 196-224.
3. *Алексеева Т.А., Владимирова И.Г.* Энергетический обмен у куколок дрозофилы (*Drosophila lummei*) из разных географических зон // Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии: Сб. научн. статей. – Х: ХНУ, 2008. – С. 69-71.
4. *Berrigan D.* Acclimation of metabolic rate in response to developmental temperature in *Drosophila melanogaster* // J. therm. Biol. – 1997. – Vol. 22, No 3. – P. 213-218.

5. Clarke A. Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? // *Functional Ecology*. – 1993. – No 7. – P. 139-149.

Резюме

Проведена оцінка і порівняльний аналіз компонентів пристосованості вибірок із природних популяцій *D. melanogaster* двох послідовних років збору, обитаючих на територіях з різним рівнем радіаційного забруднення, а також аналіз змін у структурі показателя пристосованості внаслідок переходу на лабораторне утримання.

Проведено оцінку та порівняльний аналіз компонентів пристосованості вибірок з природних популяцій *D. melanogaster* двох послідовних років відлову, що мешкають на територіях з різним рівнем радіаційного забруднення, а також аналіз змін у структурі показника пристосованості внаслідок переходу на лабораторне розведення.

The assessment and comparative analysis of the components of fitness of samples from natural populations of *D. melanogaster* of two consecutive years of data collection, living in areas with different levels of radioactive contamination was carried out, as well as the analysis of changes in the structure of fitness due to the transition rate for laboratory maintenance.

ГОРЕНСКАЯ О. В., КОМАРОВА Е. В.

*Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
Украина, 61077 Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: olgavg@bk.ru*

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ИМАГО ДРОЗОФИЛЫ ПРИ ГОЛОДАНИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ КОФЕИНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА

Оценка хронического (длительного) действия разнообразных биологически активных веществ в малых концентрациях на жизнедеятельность организмов на сегодняшний день является весьма актуальной, но малоизученной задачей. 1,3,7-trimethylxanthine (кофеин) является наиболее распространенным природным веществом умеренно токсического действия. Высокие дозы кофеина оказывают мутагенный эффект [3], нарушают репарационные процессы, приводят к ускоренному старению организмов [8], угнетают процессы эндоредупликации в слюнных железах личинок дрозофилы [1]. Кофеин влияет на внутриклеточные процессы, взаимодействуя с биополимерами (нуклеиновыми кислотами) и вызывает скрытые изменения, которые могут проявляться не сразу, а по истечении достаточно долгого времени. Так, длительное влияние этого биологически активного вещества в экспериментах на дрозофиле [1] сопровождается снижением плодовитости и жизнеспособности, временным сдвигом в интенсивности откладывания яиц в сторону ранней репродукции, снижением устойчивости генетического аппарата ооцитов к действию мутагена. К пятому поколению развивается устойчивость к изучаемому воздействию у мух, и показатели приспособленности практически достигают уровня контроля. Однако мало изученным остается вопрос о вкладе генотипа в проявление количес-

твенных признаков при хроническом действии малых концентраций кофеина.

Целью данной работы было изучить продолжительность жизни (ПЖ) при голодании у выравненных по генотипу линий *Drosophila melanogaster* при хроническом действии кофеина.

Объекты и методы

В работе использовалась неселектированная линия дикого типа *Canton-S* и линии с замещенным генотипом *white*_{C-S} *white*^{apricot}_{C-S} *white*^{satsuma}_{C-S} (мутации *white*, *white*^{apricot}, *white*^{Satsuma} соответственно перенесены на генетический фон линии дикого типа *Canton-S* путем возвратных насыщающих скрещиваний [2]). Мух выращивали в стандартных условиях (контроль). В опытах в питательную среду добавляли кофеин в концентрации 0,25 мг/мл.

Длительность предимагинального развития (в часах) учитывали от момента начала яйцекладки до выхода имаго. Относительная продолжительность жизни особей рассчитывалась как отношение средней продолжительности жизни самок и самцов в каждом варианте эксперимента к средней продолжительности жизни самок и самцов в контроле. Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием программы Biostat.

Продолжительность жизни мух при голодании определяли, помещая их в пробирки без корма. В условиях голодания мухи контактировали с влажной средой. Учет выживших мух проводили каждые три часа до полной гибели всех мух. Учитывали показатель средней ПЖ при голодании.

Результаты и обсуждение

Развитие мух в среде, содержащей кофеин, в течение одного поколения, приводит к снижению длительности жизни особей практически всех использованных в работе линий. Наиболее чувствительными к действию стрессовых факторов оказались самки и самцы мутантной линии *white*^{apricot}_{C-S}, где изучаемый показатель снизился на 30,5% и на 27,8% соответственно. Показатель продолжительности жизни при голодании определяется генотипом ($F_{\text{♀}}=100,6$, $F_{\text{♂}}=86,0$) и сочетанным действием генотипа и биологически активного вещества ($F_{\text{♀}}=28,5$, $F_{\text{♂}}=6,6$).

Длительность жизни при голодании у особей дикого типа и линий с замещенным генотипом для самок и самцов соответственно в контроле и после воздействия кофеина показаны в таблице 1.

Влияние кофеина на протяжении четырех-пяти поколений приводит к повышению устойчивости мух к голоданию. При этом, уже после пяти поколений воздействия отмечается увеличение продолжительности жизни при голодании ($p \leq 0,05$) у всех исследованных в работе линий от 7% до 28,5% по сравнению с контролем.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали, что ПЖ при голодании и хроническом воздействии биологически активного веще-

Таблица 1.

Длительность жизни имаго при голодании при хроническом воздействии кофеина в зависимости от генотипа.

Генотип	Пол	Длительность воздействия (поколение)		
		Контроль	F ₅	F ₇
<i>Canton-S</i>	♀	90,92 ± 1,76	104,83±1,59*	100,5±5,00
	♂	79,54± 1,85	95,25±2,13*	92,86±4,57*
<i>white_{C-S}</i>	♀	88,69±2,07	102,74±1,96*	112,14±5,39*
	♂	74,15±2,21	92,64±1,55*	89,53±5,15*
<i>white^{apricot}_{C-S}</i>	♀	94,03±2,88	97,86±1,68	95,82±3,89
	♂	81,89±2,53	93,17±1,33*	102,38±5,92*
<i>white^{satsuma}_{C-S}</i>	♀	80,93±1,97	86,6±1,91*	103,94±6,21*
	♂	76,05±1,61	78,83±1,33	96,79±6,36*

* Достоверность отличий от контроля $p \leq 0,05$

тва на протяжении семи поколений определяется генотипом ($h^2_{F7(\ominus)} = 5,1\%$, $h^2_{F7(\odot)} = 2,6\%$) и действием кофеина ($h^2_{F7(\ominus)} = 23,34\%$, $h^2_{F7(\odot)} = 35,97\%$).

В основе приспособленности к хроническому действию биологически активного вещества является формирование комплекса адаптивно важных признаков: плодовитости, жизнеспособности и т.д. Адаптивно важные признаки во многом определяются состоянием гормональной системы организма. Устойчивость к голоданию, как к одному из компонентов приспособленности и выживания, в значительной степени контролируется инсулиновой системой регуляции [7]. Потребление мухами дрожжей вызывает выработку инсулиноподобных пептидов продуцирующими инсулин клетками мозга, а эти пептиды необходимы для синтеза вторичных гормонов (ювенильного и экдистероидов). Эти гормоны, наряду с дофамином и октопамином, контролируя энергетический метаболизм насекомых, играют роль в адаптации индивидуумов к неблагоприятным условиям [9]. Взрослые мухи, питающиеся только водой, вырабатывают меньше экдистероидов [10]. Однако повышение устойчивости дрозофилы к голоданию при хроническом действии кофеина, показанное в данной работе, можно объяснить изменением уровня общей метаболической активности [4]. Кофеин, конкурентно связываясь с аденозиновыми рецепторами, регулирует уровень цАМФ в клетке, и, как следствие, изменяет уровень внутриклеточного кальция. Кроме того, возможно индуцированное кофеином подавление активности киназы TOR (target of rapamycin) что также приводит к увеличению продолжительности жизни у дрозофилы [6].

В то же время, кофеин способен напрямую связываться с ДНК, образуя устойчивые комплексы [5], приводящие к изменению функционирования генетического аппарата клеток. В частности, может нарушаться актив-

ность генов, отвечающих за синтез основных гормонов развития и нарушение гормонального баланса в организме имаго.

Результаты работы показали, что длительное культивирование дрозофилы на среде, содержащей кофеин в концентрации 0,25 мг/мл, повышает сопротивляемость к стрессовым воздействиям и увеличивает продолжительность жизни при голодании от 7% до 28,5% по сравнению с контролем. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа показали, что ПЖ при голодании и хроническом воздействии биологически активного вещества на протяжении семи поколений определяется генотипом ($h^2_{F7(\odot)} = 5,1\%$, $h^2_{F7(\delta)} = 2,6\%$) и действием кофеина ($h^2_{F7(\oplus)} = 23,34\%$, $h^2_{F7(\ominus)} = 35,97\%$).

Литература

1. Горенская О.В. Формирование приспособленности при хроническом действии кофеина у *Drosophila melanogaster* // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. – 2010. – Вип.10. – №905. – С. 66-77.
2. Костенко В.В., Волкова Н.Е., Воробьева Л.И. Аллель-специфическое действие мутаций в локусе *white Drosophila melanogaster* на локомоторную активность имаго разного пола. – Матеріали II Міжнародної конференції «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології», (м.Одеса, 6-10 вересня 2010 р.). – Одеса: Печатний дом, 2010 – 92-95с.
3. Clark A.M., Clark E.G. The genetic effects of caffeine in *Drosophila melanogaster* // Mutation Research. – 1968.–№6. – P. 227–234.
4. Carrillo. R., Gibson. G. Unusual genetic architecture of natural variation affecting drug resistance in *Drosophila melanogaster*. // Genetical Research – 2002.– № 80. –P. 205-213.
5. Deriabina A.S., Grokhlina T.I., Polteva N.A. et al. Study of mechanisms of some caffeine biological effects via computer. Simulation of its Interactions with DNA fragments // J. Mol. Struct. (Theochem). – 2006. – V. 769 – №1–3. – P. 97–101.
6. Harbison S.T., Chang S., Kamdar K.P. et al. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila* // Genome Biol. –2005. –V. 6. –P. 30-36.
7. Mattson C. Age, Cell and Adaptability // Aging Cell. – 2006. –V.6. – P. 112-134.
8. Nikitin A.G., Navitskas S., Gordon L.N. Effect of varying doses of caffeine on life span of *Drosophila melanogaster* // J. Gerontol.: Biol. Sci. – 2008. – V.63A. – №2. – P.149–150.
9. Rauschenbach I.Y., Shumnaya L.V., Khlebodarova T.M. et al. Role of phenol oxidases and tyrosine hydroxylase in control of dopamine content in *Drosophila virilis* under normal conditions and heat stress // J. Insect Physiol. – 2005. – V.41. – P. 279–286.
10. Tu M.-P., Flatt T., Tatar M. Juvenile and steroid hormones in *Drosophila melanogaster* longevity // Handbook of the biology of aging. Amsterdam: Acad. Press – 2006– P. 407 – 440.

Резюме

Изучена продолжительность жизни при голодании у выравненных по генотипу линий *Drosophila melanogaster* при хроническом действии кофеина в концентрации 0,25 мг/мл. Показано повышение устойчивости к голоданию после семи поколений воздействия.

Вивчено тривалість життя при голодуванні у вирівняних за генотипом ліній *Drosophila melanogaster* при хронічній дії кофеїну у концентрації 0,25 мг/мл. Показано підвищення стійкості до голодування після семи поколінь впливу.

The starvation stress resistance and influence of caffeine in the concentrations of 0,25 mg/ml during seven generations in *Drosophila melanogaster* stocks *Canton-S*, *white*_{C-S}, *white*^{apricot}_{C-S}, *white*^{satsuma}_{C-S} was studied. The increase starvation stress resistance after seven generations of the influence has been observed.

ГОРЯЧКИНА О.В.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

Россия, 660036, г. Красноярск, Академгородок, e-mail: kvitko_olga@mail.ru

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ ИЗ МОНГОЛИИ

Лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.) имеет обширный ареал в Восточном Казахстане и Сибири, произрастая на севере до низовьев Енисея, на юге – по всему Алтаю, на востоке – до Южного Забайкалья (Бобров, 1978). Основные массивы естественных насаждений лиственницы сибирской приурочены к континентальным районам южной Сибири, юго-западной окраине Среднесибирского плоскогорья и лесотундры Западной Сибири (Ирошников, 2004). На севере Монголии лиственница сибирская является наиболее распространенной лесной породой, занимающей около 80 % покрытой лесом территории страны (Dulamsuren et al., 2010).

Генетические ресурсы данного вида изучены недостаточно полно, учитывая обширный ареал и значительную внутривидовую изменчивость (Милютин, 2006). Цитогенетические исследования являются составной частью изучения генетических ресурсов и необходимы для использования генофонда мирового разнообразия хвойных. Однако работа с хромосомами хвойных представляет большие сложности из-за сходства их кариотипов и отсутствия методов дифференциального окрашивания. В кариотипе лиственницы сибирской, как и других представителей рода *Larix*, содержится 12 пар хромосом: 6 пар (I-VI) длинных метацентрических и 6 пар (VII-XII) более коротких субмета- и субакроцентрических хромосом (Sitmak, 1964; Hizume, 1988; Муратова, 1991; Muratova et al., 2007). В настоящее время существует небольшое количество работ, посвященных исследованию кариотипов лиственниц с помощью молекулярно-цитогенетических маркеров (Hizume et al., 1995; Lubaretz et al., 1996; Liu et al., 2006, 2007; Zhang et al., 2010). Для лиственницы сибирской такое исследование ранее не проводилось.

Настоящая работа посвящена анализу кариотипа лиственницы сибирской из Монголии с помощью стандартных для хвойных методик, а также флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с пробами рибосомных генов

5S и 45S рДНК. Такой подход облегчает идентификацию хромосом в кариотипе и подбор пар гомологов.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили семена лиственницы сибирской, собранные на северо-востоке Монголии (Мунгун Морт, 48°20' с.ш., 108°39' в.д.). Проросшие семена обрабатывали 1 % водным раствором колхицина в течение 4 ч и фиксировали в уксуснокислом этаноле. Для подсчета хромосом и выявления хромосомных и геномных мутаций корешки окрашивали ацетогематоксилином, анализ проводили на временных давленных препаратах.

Для флуоресцентной гибридизации *in situ* отмытые от фиксатора корешки обрабатывали 0,6 % водным раствором целлюлозина в течение 14-16 ч и готовили давленные препараты в капле 45 % уксусной кислоты. После замораживания в жидком азоте покровное стекло снимали и помещали препараты в 96° этиловый спирт для обезвоживания. Двухцветную FISH проводили по стандартной методике (Badaeva et al., 1996) с некоторыми модификациями. Использовались клонированные последовательности генов 5S и 45S рРНК пшеницы (Gerlach and Bedbrook, 1979; Gerlach and Dyer, 1980), пробы метили методом ник-трансляции с использованием наборов для метчения ДНК.

Результаты и обсуждение

В диплоидном наборе лиственницы сибирской содержится 24 хромосомы ($2n=2x=24$). Геномные мутации в исследуемой популяции не обнаружены, что может свидетельствовать о благоприятных условиях произрастания для лиственницы и стабильности ее кариотипа. Хромосомные мутации (кольцевые хромосомы и ацентрические кольца) были отмечены в единичных клетках.

Для исследования кариотипа лиственницы сибирской использовали 30 метафазных пластинок. Суммарная длина хромосом в метафазной пластинке варьировала от 188,8 до 272,7 мкм и в среднем составляла $225,9 \pm 3,36$ мкм (коэффициент вариации 8,2 %). С помощью поликариограммного анализа в кариотипе выделяются 6 пар длинных метацентрических (I-VI) и 6 пар более коротких субметацентрических (VII-XII) хромосом. По морфологии практически в каждой метафазной пластинке можно выделить I пару метацентриков как наиболее крупные хромосомы, VI пару – как наиболее асимметричные среди метацентриков, VII пару – как наиболее асимметричные среди субметацентриков. Для характеристики кариотипа лиственницы удобно использовать классификацию хромосом В. Г. Грифа и Н. Д. Агаповой (1986) и выделять хромосомы VII и VIII пар как интерцентрические (I^c от 20 до 30 %). Морфометрические параметры выделенных пар хромосом представлены в таблице.

Морфометрические параметры хромосом лиственницы сибирской

№№ хр-м	Абсолютная длина (L ^a), мкм		Относительная длина (L ^r), %	Центромерный индекс (I ^c), %	Локализация вторичной пере- тяжки (SC), %
	M±m	CV, %			
I	12,59±0,17	10,16	5,85±0,08	47,16±0,19	
II	11,24±0,13	9,25	5,22±0,06	47,34±0,19	
III	11,36±0,14	9,58	5,28±0,07	46,92±0,21	60,42 (l)
IV	11,62±0,14	9,57	5,41±0,07	47,16±0,24	62,50 (s)
V	10,80±0,13	9,07	5,02±0,06	46,70±0,27	
VI	10,09±0,14	10,55	4,69±0,06	44,49±0,29	
VII	8,37±0,09	8,28	3,89±0,04	27,75±0,39	
VIII	8,05±0,10	9,57	3,74±0,05	29,39±0,40	
IX	7,67±0,08	7,89	3,57±0,04	30,76±0,34	
X	7,29±0,08	8,61	3,39±0,04	31,51±0,28	
XI	7,04±0,07	7,99	3,28±0,03	31,56±0,25	
XII	6,83±0,07	7,55	3,17±0,03	31,39±0,28	

Постоянные вторичные перетяжки локализованы в дистальных районах двух пар метацентрических хромосом: на длинном плече III пары и коротком плече IV пары (рисунок). Известно, что постоянные вторичные перетяжки являются ядрышкообразующими районами хромосом и местом локализации рибосомных локусов ДНК (Brown, Carlson, 1997). Это подтверждается результатами флуоресцентной гибридизации *in situ*: в районах постоянных вторичных перетяжек были выявлены мажорные локусы 45S рДНК. Кроме того, у данного вида были выявлены минорные локусы 45S рДНК в перичентромерных районах трех пар метацентрических (I, II, VII) и наиболее короткой пары субметацентрических (XII) хромосом. Сайт 5S рДНК распо-

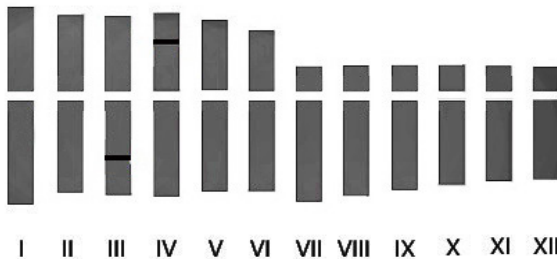


Рисунок. Идиограмма хромосом лиственницы сибирской из Монголии. I-XII – номера хромосом. Блоком черного цвета показаны постоянные вторичные перетяжки.

жен субтерминально на III паре метацентриков, несущей также локус 45S рДНК, хотя расположены они на разных плечах хромосом.

После гибридизации *in situ* хромосомы лиственницы сибирской имеют довольно четкий рисунок DAPI-бэндинга, который значительно облегчает определение пар гомологичных хромосом. У лиственницы сибирской DAPI-бэнды наблюдались в перичентромерных районах I, IV, V и VI пар хромосом на длинном плече, III, VII, VIII, XI и XII пар – на коротком плече. На II паре хромосом наблюдался наиболее широкий DAPI-бэнд, включающих перичентромерные районы обоих плеч.

Анализ ядрышек в интерфазных ядрах показал, что в кариотипе лиственницы сибирской функционально активными могут быть все ядрышкообразующие районы хромосом, соответствующие мажорным сайтам 45S рДНК. Тем не менее, большинство клеток содержат 3 ядрышка, а среднее число ядрышек в интерфазных ядрах в изученной популяции составило $2,88 \pm 0,03$. Наличие единичных клеток с 5 ядрышками может свидетельствовать об активации обнаруженных у лиственницы минорных локусов 45S рДНК.

Полученные данные в целом согласуются с результатами исследований кариотипа данного вида из других районов произрастания (Simak, 1964; Hizume, 1988; Муратова, 1991 и др.). Применение флуоресцентной гибридизации *in situ* с пробам генов 5S и 45S рДНК совместно со стандартными для хвойных методиками хромосомного анализа значительно облегчает идентификацию хромосом лиственницы сибирской.

Работа выполнена при финансовой поддержке Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности и РФФИ (проекты № 11-04-98081, 11-04-00063).

Литература

1. Бобров Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР. – Л.: Наука. Ленингр. отд. – 1978. – 188 с.
2. Гриф В.Г., Агапова Н.Д. К методике описания кариотипов растений // Бот. журн. – 1986. – Т. 71, № 4. – С. 550-553
3. Ирошников А.И. Лиственницы России. – М. – 2004. – 182 с.
4. Милютин Л.И. Лесные генетические ресурсы Северо-Восточной Азии // Лесные экосистемы северо-восточной Азии и их динамика: Матер. междунар. конф. – Владивосток: Дальнаука, 2006. – С. 208-210.
5. Муратова Е.Н. Кариологическое исследование *Larix sibirica* (Pinaceae) в различных частях ареала // Ботанический журнал. – 1991. – Т. 76, № 11. – С. 1586-1595.
6. Badaeva E.D., Friebe B., Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species // Genome. – 1996. – N. 39. – P. 293-306.
7. Brown G.R., Carlson J.E. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18S-5.8S-26S rDNA and 5S rRNA in two species of spruce (*Picea*) // Theoretical and Applied Genetics. – 1997. – Vol. 95, N. 1-2. – P. 1-9.

8. Dulamsuren C., Hauck M., Khishigjargal M., Leuschner H.H., Leuschner C. Diverging climate trends in Mongolian taiga forests influence growth and regeneration of *Larix sibirica* // *Oecologia*. – 2010. – vol. 163. – P. 1091–1102.

9. Gerlach W.L., Bedbrook J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucleic Acids Res.* – 1979. – Vol. 7, N. 7. – P. 1869-1885

10. Gerlach W.L., Dyer T.A. Sequence organization of the repeated units in the nucleus of wheat which contains 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Res.* – 1980. Vol. 8, N. 21. – P. 4851-4865.

11. Hizume M. Karyomorphological studies in the family *Pinaceae*. Mem Fac Educ Ehime University. Ser III. Natural Sci. – 1988. – Vol. 8, N. 2. – P. 1-108.

12. Hizume M., Kuzukawa Y., Kondo K., Yang Q., Hong D., Tanaka R. Localization of rDNAs and fluorescent bandings in chromosomes of *Larix potaninii* var. *macrocarpa* collected in Sichuan, China. // *La Kromosomo*. – 1995. – II (78): – P. 2689-2694.

13. Lubaretz O., Fuchs J., Ahne R., Meister A., Schubert I. Karyotyping of three *Pinaceae* species via fluorescent in situ hybridization and computer-aided chromosome analysis. // *Theor. Appl. Genet.* – 1996. – Vol. 92. – P. 411-416.

14. Liu B., Zhang S.G., Zhang Y., Lan T.Y., Qi L.W., Song W.Q. Molecular cytogenetic analysis of four *Larix* species by bicolor fluorescence in situ hybridization and DAPI banding // *Int. J. Plant Sci.* 2006. – Vol. 167. – P. 367-372.

15. Liu B., Qi L., Chen R., Song W. Multicolor fluorescence in situ hybridization with combinatorial labeling probes enables a detailed karyotype analysis of *Larix principis-rupprechtii* // *Biol. Res.* – 2007. – Vol. 40. – P. 23-28.

16. Muratova E.N., Sedelnikova T.S., Pimenov A.V., Karpjuk T.V., Sizikh O.A., Kvitko O.V. Karyological analysis of larch species from Siberia and the Far East of Russia // *Forest Science and Technology*. – 2007. – Vol. 3. – P. 89-94.

17. Šimak M. Karyotype analysis of Siberian larch (*Larix sibirica* Ldb. and *Larix sukaczewii* Dyl.) // *Studia Forestalia Suesica*. – 1964. – N. 17. – 15 p.

18. Zhang S.G., Yang W.H., Han S.Y., Han B.T., Li M.X., Qi L.W. Cytogenetic analysis of reciprocal hybrids and their parents between *Larix leptolepis* and *Larix gmelinii*: implications for identifying hybrids // *Tree Genetics and Genomes*. – 2010. – Vol. 6, N. 3. – P. 405-412.

Резюме

Проведено цитогенетическое исследование семенного потомства лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) из Монголии. Определены морфометрические параметры хромосом, установлена локализация вторичных перетяжек. Применение флуоресцентной гибридизации *in situ* с пробами генов 5S и 45S рДНК совместно со стандартными для хвойных методиками кариологического анализа значительно облегчает идентификацию хромосом лиственницы сибирской. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* выявлено 2 мажорных локуса 45S рДНК в дистальных районах метацентрических хромосом III и IV, а также 4 минорных сайта 45S рДНК в перичентромерных районах хромосом. Локус 5S рДНК обнаружен на хромосоме III, несущей также мажорный локус 45S рДНК на другом плече.

The cytogenetic study of *Larix sibirica* Ledeb. seed progeny from Mongolia was carried out. The morphometric characteristics of *Larix sibirica* chromosomes and location of secondary constrictions were determined. Use of fluorescent in situ hybridization with the 45S and 5S ribosomal RNA gene probes together with conventional technique of conifer karyotype analysis facilitates the identification of Siberian larch chromosomes.

Two major 45S rDNA loci (per haploid genome) have been observed in the intercalary regions of two metacentric chromosomes, III and IV of *L. sibirica*; in addition to them, minor NORs were mapped in pericentromeric regions of four chromosomes. Locus of the 5S rDNA was located in the distal region of the chromosome III short arm, which also carried major NOR in the opposite arm.

ДЕРІЙ С.І., ТИТАРЕНКО Л.М., СПРЯГАЙЛО О.А.

*Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького
Україна, 18000, Черкаси, бул. Шевченка, 81, e-mail: larisa_titarenko@mail.ru*

ФОРМУВАННЯ ПРОФЕСІЙНОЇ КОМПЕТЕНТНОСТІ СТУДЕНТІВ НА ЗАНЯТТЯХ З ГЕНЕТИКИ

Найважливішим напрямком реформування вищої освіти в Україні в контексті рішень євроінтеграції є забезпечення універсальності підготовки фахівця та його конкурентноздатності на ринку праці. Традиційні підходи, що полягали у наданні студентам якомога більшої кількості фактичного матеріалу не спроможні вирішити дані завдання.

На фоні тривалого функціонування у педагогічній практиці авторитарних концептів зміна освітньої парадигми видається досить складним процесом, оскільки потребує розробки інструментарію суто практичних методів їх реалізації, необхідною умовою яких є використання плідних зв'язків між наукою та освітою.

В контексті досліджуваної проблеми актуальними є праці О. Я. Іванців [1], Н. В. Назаренко [2] та інших, які вивчали окремі аспекти методичної роботи в університеті.

Враховуючи, що компетентність – це здатність особистості до практичної діяльності, яка вимагає наявності певної системи знань [3], вважаємо, що використання ситуаційних методик є ефективним для формування професійної компетентності студентів. У модельованих ситуаціях студенти набувають особистісного досвіду. Такі ситуації створюються педагогом цілеспрямовано.

Метою цієї статті є з'ясування операційно-процесуальних засад формування професійної компетентності студентів засобами ситуаційної методики на заняттях з генетики.

Ситуація «Мікроматриця»

Вступ (викладач). Рак спричинений пошкодженням генів, що контролюють поділ клітин. У результаті такого пошкодження клітини діляться неконтрольовано. Ракові клітини експресують набір генів, відмінний від нормальних клітин. Різні типи ракових клітин експресують різні варіанти наборів генів.

У 1999 році команда науковців в Америці використала ДНК-чип для розділення двох клінічно схожих типів раку: гострої лімфобластичної лей-

кемії (ALL) і гострої мієломної лейкемії (AML). Обидві форми уражають клітини кісткового мозку. Вчені змогли ідентифікувати набір з 50 генів, активність яких відрізняється в різних видах раку.

Ситуація.

Пацієнт А має п'ять генів (A2, A3, B1, B3, C4), які високоактивні в ALL, тоді як інші гени є контрольними (вони не дають жодної інформації про тип раку). Таким чином, можемо сказати, що цей хворий має діагноз ALL.

Пацієнт В має два гени (A4, B2), які швидко експресуються в AML, тоді як інші гени є контрольними. Виставляти діагноз AML цьому хворому досить ризиковано. Він не має жодних інших генів, активних у клітинах AML. Висока активність зазначених генів може бути зумовлена іншим типом раку, відмінним від ALL чи AML. Отже, цей хворий не може бути діагностований ні як AML- ні як ALL-позитивний.

Пацієнт С має 6 генів (A1, A4, B2, C3, D2, D3), які високоактивні в клітинах А. Інші гени в чіпі слугують контролем. Ймовірно, що пацієнт С має AML.

(Під час виконання цієї вправи деякі з цих генів використовуються у малому мікрочіпі, щоб показати, як мікрочіп може бути використаний для діагностики пацієнтів з різними типами раку).

Вкладач. В таблиці 1 відображено гени, які використовуються в цьому мікрочіпі, а також за яких типів раку ці гени проявляють високу активність.

Таблиця 1

Гени використані в аналізі мікрочіпу

Location	Gene Name	Gene highly active with
A1	Zyxin	AML
A2	Cyclin 03	ALL
A3	Myosin light chain	ALL
A4	HOX A-9	AML
A5	SNF 2	ALL
B1	Coenzyma A	ALL
B2	Leptin receptor	AML
B3	OP 18	ALL
B4	Dynein light chain	Neither (control)
B5	SRP 9	ALL
C1	Actin	Both (control)
C2	IL7receptor	ALL
C3	CD-33	AML
C4	MCM 3	ALL
C5	LYN	AML
D1	Myc 3	Neither (control)

Продовження табл. 1

Location	Gene Name	Gene highly active with
D2	ATP ase	AML
D3	SRP 9	AML
D4	CD 19	Neither (control)
D5	Catalase	AML
E1	IL 8 receptor	AML
E2	Lysozyme	AML
E3	Topoisomerase II	ALL
E4	Acyl-CoA Dehydrogenase	ALL
E5	Glucose-6-phosphte	Both (control)

Контрольними генами називаються ті, які експресуються або в обох, або не експресуються в жодному з типів раку. Ці гени не дають жодної інформації про тип раку, але зазвичай включаються до мікрочіпа, щоб показати, що експеримент іде нормально (немає помилок).

Студент. мРНК була екстрагована з клітин трьох пацієнтів, помічена флуорисцентними маркерами і використана для гібридизації. Для спрощення в наступних трьох таблицях показані лише активні під час експерименту гени.

Таблиця 2

Результати аналізу мікрочіпа

Пацієнт А					
	1	2	3	4	5
A		*	*		
B	*		*		
C	*			*	
D					
E			*		*
Пацієнт В					
	1	2	3	4	5
A				*	
B		*			
C	*				
D					
E					*
Пацієнт С					
	1	2	3	4	5
A	*			*	
B		*			
C	*		*		
D		*	*		
E					*

(Можна або створити власний «килимочок», або замовити стандартний мат (1x2,5 м) для віртуального мікрочіпа. У віртуальному мікрочіпі мат (килимочок) відповідає скляному слайду з матрицею з 10 цяток, на які нанесено одно ланцюгові молекули ДНК (ДНК-зонди). Послідовності цих молекул відповідають невеличким ділянкам 10 генів: «Олександр Флемінг», «Жак Моно», «Томас Морган», «Бапрабара Мак Клінток», «Лео Сіцлард», «Джон Кендрю», «Френсіс Крік», «Розалін Франклін», «Моріс Вілкінс», «Джеймс Уотсон». Молекули ДНК на нашому килимку це шматочки кольорової липучки. Кожному з генів відповідає липучка певного кольору).

Студент. Матричній РНК та ігровому наборі відповідають невеличкі ліхтарики. Кожен ліхтарик відповідає одній молекулі одноланцюгової РНК і має на собі бирку з назвою одного із генів та шматочок липучки відповідного кольору для прикріплення до слайду.

Точну кількість ліхтариків з назвами різних генів обговоримо пізніше, а зараз досить того, що відомо – в наборі є ліхтарики, що відповідають мРНК з контрольних клітин і мРНК клітин лінії, яка вивчається.

(Для гри потрібні зелені та червоні ліхтарики. Зелені ліхтарики відповідають молекулам мРНК з нормальних (контрольних) клітин, а червоні імітують мРНК виділену з ракових клітин).

Проводимо гібридизацію міченої мРНК (ліхтарики) із ДНК-зондами (липучкою на віртуальному мікрочіпі). Кожна липучка повинна знайти відповідного кольорового партнера. Мікроматриця наповнена сумішшю мРНК (ліхтариків), проте тільки ліхтарики, які мають відповідні липучки, будуть гібридизуватися з комплементарною одноланцюговою ДНК матриці (мата), тобто прикріплюватися до неї. Наприклад, червоні ліхтарики гібридизуються з червоною липучкою, жовті – з жовтою і т.д.

(Якщо для ліхтарика не знаходиться відповідною липучки на маті, він нікуди не приєднується. Різнокольорова липучка на ліхтариках показує, що в цьому випадку тільки маленька (незначна) послідовність мРНК є комплементарною до ДНК і гібридизація буде дуже слабкою. На наступному етапі роботи, під час промивання, ці слабо приєднані молекули мРНК будуть змиті).

Прикріплюємо ліхтарики з відповідними липучками в кругах на мікрочіпі. Ліхтарики повинні бути вимкнені.

Для того, щоб просканувати віртуальний слайд, включаємо усі ліхтарики, що лежать на мікрочіповому маті. Робимо це обережно, щоб жодного з них не змістити. Вимикаємо світло в кімнаті та дивимося на мікрочіп.

(Розглядаємо мат, коло за колом: кожне коло – це одна цятка реального мікрочіпа).

Що можемо сказати про колір та інтенсивність світла? Звертаємо увагу, що у віртуальному мікрочіпі неможливо відтворити жовтий колір кола. Однак червоні і зелені цятки має бути добре видно. Занотовуємо кількість

червоних і зелених ліхтариків для кожного гена. Це число буде необхідне пізніше для аналізу.

Як і в реальному мікрочіпі, коло показує шкалу (градацію) кольору. Якщо коло виявилось червоним, то це означає що з молекулами ДНК гібридувалися тільки мРНК з ракових клітин. А зелені кола відповідають гібридизації молекул ДНК виключно з контрольною мРНК. Жовті кола означають наявність у пробі еквівалентної кількості мРНК з ракових і контрольних клітин.

Це дуже спрощений приклад, оскільки використання реального мікрочіпу, дає можливість побачити неймовірну різноманітність забарвлення цяток в межах зелено-жовто-червоної гами (*зображення реального мікрочіпа на слайді*). Її зміст може бути розшифровано лише за допомогою спеціальної програми лазерного сканування.

Науковці можуть робити висновок про кількість мРНК за кольором цяток на мікрочіпі. Аналогічно можна передбачати інтенсивність світла цієї точки за кількістю ліхтариків у колі на магі.

Студент. Розглянемо наступний приклад. Якщо є один ліхтарик у точці (колі), а в іншому колі – два, і якщо вони мають однакові світлові батареї, то можна очікувати, що світло від двох ліхтариків буде вдвічі сильніше, ніж від одного.

Але що буде, якщо батареї у двох ліхтариках слабші і ліхтарики світять у півсили? Тоді вони можуть випромінювати таку ж кількість світла, як і один ліхтарик. Іншими словами, кількість світла, яку бачимо у віртуальному мікрочіпі, залежить не лише від кількості ліхтариків, але також від стану батареї у кожному з них.

Кластерування генів заповнюється студентами самостійно.

Таким чином, у контексті підготовки майбутніх фахівців біологів інноваційні педагогічні технології покликані розвивати у студентів інтегральні характеристики (спрямованість, компетентність, гнучкість), які складають особистісний фундамент, забезпечують успішне й ефективне входження до ринку професій. Нові неспецифічні здібності, що утворюються за такої організації навчально-виховного процесу, надалі можуть перетворюватися із потенційної форми в актуальну, коли будуть застосовуватися у конкретній професійній діяльності.

Література

1. *Іванців О. Я.* Підготовка студентів біологічних факультетів університету до педагогічної діяльності в процесі вивчення фахових дисциплін / О. Я. Іванців. Автореферат канд. пед. наук. 13.00.04 теорія і методика професійної освіти. Київ, 2000. – 22 с.

2. *Назаренко Н. В.* Методичні засади використання педагогічних технологій у навчанні природничих дисциплін студентів біологічних спеціальностей / Н. В. Назаренко. Автореферат канд. пед. наук. 13.00.02 теорія та методика навчання біології. Київ 2007. 21 с.

3. Образовательный процесс в начальной, основной и старшей школе. Рекомендации по организации опытно-экспериментальной работы. – М.: Сентябрь, 2001. – С.231.

Резюме

У статті розкриваються деякі процесуально-операційні аспекти використання інтерактивних методів навчання на заняттях з генетики в університеті.

В статье раскрыты некоторые аспекты особенностей использования интерактивных методов обучения на занятиях по генетике в университете.

In the article some open up judicially operation aspects of the use of interactive methods of studies on employments after genetics in an university.

ДИКУН М.О., СІРАНТ Л.В., ЗАВАЛЬНА Г.В., ПОЧИНОК В.М.

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 31/17*

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГІБРИДІВ СОНЯШНИКА ЗА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИМИ СПЕКТРАМИ ГЕЛІАНТИНІВ

Соняшник – головна олійна культура України. Великий попит на насіння соняшника і рівень рентабельності цієї культури сприяє розширенню посівних площ. Питання підвищення врожайності соняшника є актуальним і залежить від багатьох чинників, в тому числі і від якості сортових ресурсів. Таким чином постає задача гарантованого відбору генотипів соняшника з відповідними сільськогосподарськими характеристиками. Ідентифікацію окремих генотипів успішно здійснюють при порівнянні електрофоретичних спектрів запасних білків.

Запасні білки соняшника (геліантини) інтенсивно синтезуються у процесі розвитку насінини. Їхній гетерогенний склад визначається генотипом і не залежить від умов вирощування культури, оскільки генетично закріплений у ряді поколінь [4].

Біологічна цінність білків насіння соняшника і їх функціональні властивості як молекулярних маркерів, визначається їх компонентним складом. Головні компоненти білкової фракції – солерозчинний 11S глобулін (геліантин) – олігомерний білок з молекулярною масою 30500 [2].

Структура електрофоретичних спектрів геліантинів насіння соняшника є відображенням конкретного прояву гена чи блоку генів. Це дає можливість використовувати геліантини як маркери, за допомогою яких можна оцінювати генетичну чистоту самозапилюваних ліній, гібридність насіння, ідентифікувати окремі генотипи.

Одним із методів лабораторного контролю якості насіння соняшника є електрофорез. Він має ряд суттєвих переваг над іншими традиційними методами аналізу та характеризується точністю, високою однорідністю результатів, відносною технологічною простотою, незначним апаратним на-

вантаженням, дешевиною, що дає змогу використовувати його для масових аналізів.

Для проведення електрофоретичного аналізу застосовується більше 20 різних методів електрофорезу та їх модифікацій [1].

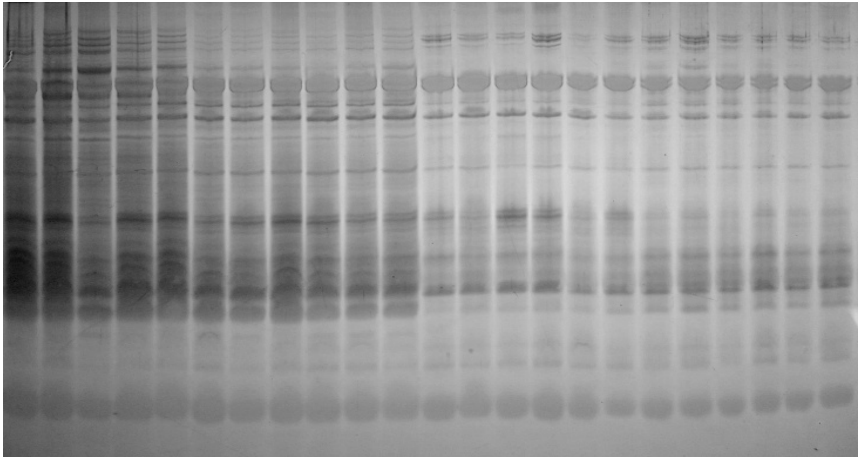
Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження було насіння соняшника комерційних гібридів: НК Долбі, НК Делфі, Арена ПР, НК Конді, НК Бріо, НК Неома, НК Ферті, НК Рокі, НК Армоні, Опера ПР, отримане від фірми Syngenta. Електрофорез геліантину проводили за методикою ВІР Санкт-Петербург [3] і Поперелі [5].

Аналізували 100 довільно вибраних насінин соняшника. Насіння чистили, подрібнювали та знежирювали. Знежирений зразок заливали розчином, складу (на 1 літр): 60 мл оцтової кислоти і 120 г сечовини. Суміш інтенсивно перемішували і залишали на 1 годину при кімнатній температурі. Потім центрифугували 4 хвилини при 4000 об. Для отримання розчину запасних білків до 100 мкл екстракту додавали такий же об'єм концентруючого і одночасно дезагрегуючого розчину, 1 літр якого містив 480 г сечовини, 30 мл оцтової кислоти і декілька кристалів піроніна-в. Розчин залишали у термостаті при 30⁰ С на ніч.

Компонентний склад гелю: акриламід, метиленбісакриламід, ТЕМЕД, гліцин, аскорбінова кислота, розчин семиводного закисного сірчаноокислого заліза. Каталізатором був 10% розчин персульфату амонію. Електродний буфер містив на 1 літр 4 мл оцтової кислоти і 0,4 г гліцину. Тривалість електрофоретичного фракціонування геліантинів була від 2 до 2,5 годин. Фіксацію і фарбування білків здійснювали у розчині наступного складу: 0,25 – 0,3 г Кумасі R, етиловий спирт – 70 мл, ацетон – 100 мл, льодяна оцтова кислота – 60 мл, трихлороцтова кислота – 60 г. Після фарбування гелеві пластини відмивали теплою водою не менше 2-х годин.

Перед виконанням процедури електрофорезу досліджували та модифікували деякі ділянки стандартного методу. Нами вивчався вплив різних речовин для знежирення. Традиційно для цього використовується ацетон або його суміш з оцтовою кислотою, які відзначаються шкодочинною дією на організм. Була поставлена мета знайти адекватну заміну. Електрофорез запасних білків соняшника проводили, застосовуючи різні речовини для знежирювання насіння: ацетон, етиловий спирт, суміші етилового спирту і води. Отримували геліантин і без знежирення насіння. На рис.1 наведено електрофореграму білкового спектру геліантинів соняшника гібриду НК Бріо із різною попередньою обробкою. Якість отриманих спектрів запасних білків гібриду НК Бріо має відмінності в залежності від способу знежирення. Цікаво, що найбільш чіткі та контрастні спектри одержані без усякого знежирення (рис.1).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23
 Рис.1. Електрофоретичні спектри гібриду соняшника НК Бріо з використанням різних способів знежирення (1-5 – без знежирення; 6-11 – ацетон; 12-16 – 96⁰ етанол; 17-20 – 50⁰ етанол; 21-23 – 70⁰ етанол).

Результати і обговорення

Оскільки компонентна структура запасних білків насіння точно відображає характер впливу певного блоку генів, вона може бути критерієм ідентичності оцінюваних гібридів. Функціональна цінність таких спектрів визначається якістю отримуваних електрофореграм та можливістю їх швидкого однозначного оцінювання. На рис. 2 – 9 наведено електрофореграми спектрів геліантинів різних комерційних гібридів соняшника. Прослідковується очевидна генотипова різниця.

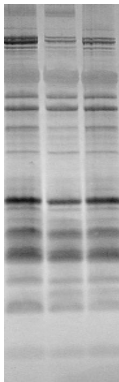


Рис.2
 НК Долбі

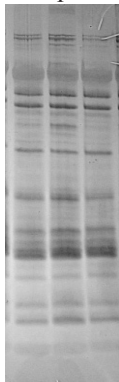


Рис.3
 НК Бріо

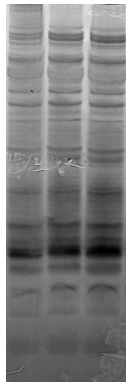


Рис. 4
 НК Неома

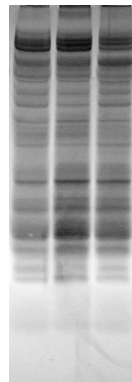


Рис.5
 Опера ПР

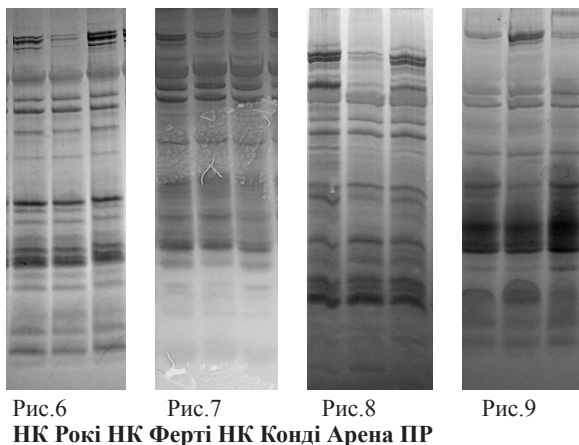


Рис 2 – 9 Електрофоретичні спектри геліантинів соняшника

Застосований підхід висвітлив два важливих результати. По-перше, була оптимізована методика підготовки насіння соняшника без попередньої екстракції олії. Це суттєво здешевлює ідентифікацію генотипів при масовому контролі насіннєвого матеріалу. По-друге, отримані спектри запасних білків гібридів соняшника можна використовувати як маркери в цілях ідентифікації.

Література

1. Cook R.J. Handbook of variety testing. Electrophoresis handbook; variety identification ISTA – 1992,- 25р.
2. Аксенов И.В. Идентификация белковых спектров в гибридных комбинациях подсолнечника // Научно-технический бюллетень Института олійних культур УААН.-2009.-№14.-С.3-7.
3. Идентификация, анализ и регистрация сортов, линий и гибридов подсолнечника методом электрофореза гелиантина. Метод. указания под ред. И.П.Гаврилюк.-Л.- ВИР.-1988.-23с.
4. Конарев В.Г.Проблемы современной биологии и селекции // Теоретические основы селекции.-М.-1993.-Т.1.-С.7-27.
5. Попереля Ф.О. Генетична інтерпретація електрофореграм геліантину насіння F_1 соняшника // Цитология и генетика.-2000.-Т.34, №2.-С.84 -90.

Резюме

Проведено електрофорез запасних білків гібридів соняшника іноземної селекції. Отримані спектри геліантинів можна використовувати як маркери в цілях ідентифікації. Рекомендована модифікована методика підготовки насіння соняшника без попередньої екстракції олії.

Проведен електрофорез запасних білків гібридів подсолнечника иностранной селекции. Полученные спектры гелиантинов можно использовать как маркеры для идентификации. Рекомендована модифицированная методика подготовки семян подсолнечника без предварительной экстракции масла.

It was conducted electrophoresis of storage proteins of sunflower hybrids foreign selection. The obtained spectra of heliantin can be used as markers for identification. Recommended a modified method of preparation of sunflower seeds without the prior extraction of oil.

ДМИТРИЕВ А.П., КРАВЧУК Ж.Н., ДЯЧЕНКО А.И.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
03680, Киев, ул. акад. Заболотного, 148, e-mail: dmyt@voliacable.com*

УЧАСТИЕ НАДФН-ОКСИДАЗНОЙ И КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ В ИНДУЦИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У РАСТЕНИЙ

«Окислительный взрыв» (резкое и избыточное образование активных форм кислорода (АФК) является одной из наиболее ранних реакций растительной клетки на инфицирование. С тех пор как Duke [1] впервые обнаружил индукцию образования супероксидного анион-радикала в ответ на инфицирование клубней картофеля фитофторой, множество работ посвящено выяснению роли АФК в защите растений от биотического стресса. В культуре некоторых растительных клеток в ответ на заражение или обработку бактериальными или грибными элиситорами регистрируют двухфазное увеличение содержания АФК [2]. Важной особенностью АФК является их, зависящее от дозы, различное действие: низкие дозы активируют антиоксидантные ферменты, подобные глутатион трансферазе и глутатион пероксидазе, тогда как высокие дозы приводят к включению зависящей от R-генов программированной клеточной гибели [3]. Известно, что АФК оказывают непосредственное токсическое действие на патогенов, катализируют механическое укрепление клеточных стенок и участвуют в активации транскрипции защитных генов [4]. Если раньше АФК рассматривали как высокотоксичные, хотя и короткоживущие молекулы, которые подавляют развитие патогена, то сейчас вырисовывается еще одна их важная функция – участие в трансдукции сигнала для экспрессии защитных генов и индуцирования защитных реакций. Однако, механизм образования АФК у растений и их роль в трансдукции сигнала для включения защитных реакций не ясна. У некоторых видов растений, например, у петрушки, окислительный взрыв необходим для синтеза фитоалексинов. Тогда как у клеток сои и табака ингибирование стимулированного элиситором образования АФК не влияло на накопление фитоалексинов.

Ранее мы обнаружили два фитоалексина лука и идентифицировали их как 5-октил-циклопентан-1,3-дион (цибулин 1д) и 5-гексил-циклопентан-1,3-дион (цибулин 2д) [5]. Было показано, что цАМФ-зависимый поток Ca^{2+} внутрь клетки играет важную роль в индукции синтеза фитоалексинов у *A. сера* [6]. Цель настоящей работы состояла в изучении образования

АФК в клетках лука, обработанных биогенным элиситором, и выяснении путей трансдукции сигнала для инициации окислительного взрыва.

Культура клеток. Суспензионную культуру клеток лука (*Allium cepa* L.) сорта Сквирский получали из каллусной ткани и выращивали при 24°C в темноте на среде BDS, содержащей 3 мг/л 2,4-D и 0,6 мг/л кинетина. Клетки (2-3 г/40 мл) переносили в свежую среду каждые 2 недели. 7-дневную культуру центрифугировали (100g, 5 мин) и дважды отмывали. В экспериментах с ЕГТА хлорид кальция не добавляли. Клеточную суспензию помещали в 50-мл колбы и выдерживали 5 ч на ротационном шейкере (120 об/мин). Далее к клеткам добавляли биогенный элиситор и различные химические соединения.

Биогенный элиситор и химические соединения. Элиситор готовили из некротрофного фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* (штамм 2307). Гриб выращивали 10 дн на жидкой среде Чапека при 22° С. Белковый элиситор из культуральной жидкости получали осаждением белков сульфатом аммония и последующим диализом. Концентрацию элиситора определяли в мкг белка/мл. Диэтилдитиокарбамат натрия (ДДК) и верапамил растворяли в H₂O. форсколин, W-7, трифторперазин (ТФП), К-252А, каликулин А и дифенилен иодониум (ДФИ) растворяли в ДМСО (конечная концентрация 0,1 %). Использовали реактивы фирмы Sigma (Германия).

Хемиллюминесцентный метод определения O₂⁻. Образование O₂⁻ клетками суспензионной культуры лука измеряли хемиллюминесцентным методом с использованием люцигенина, который специфичен к O₂⁻ [7]. В разное время после добавления элиситора отбирали аликвоты суспензии клеток по 0,4 мл и помещали в кювету. Добавляли 0,2 мл 1 мМ раствора люцигенина и 1,4 мл 0,1 М глицин-NaOH буфера (pH 9,0), содержащего 1 мМ ЭДТА. Ингибитор супероксиддисмутазы (СОД), ДДК добавляли к суспензии клеток в концентрации 1мМ для предотвращения дисмутации O₂⁻ в H₂O₂. Люцигенин-зависимую хемиллюминесценцию (ЛЗХЛ) определяли на хемиллюминометре (НЛЕМ 1С01, Ст-Петербург). Образование O₂⁻ выражали в % интенсивности относительного сигнала ЛСЗХ.

Характеристика индуцированного элиситором образования O₂⁻.

Суспензионная культура клеток лука в присутствии ДДК (1 мМ), ингибитора СОД, реагировала на обработку элиситором значительным увеличением образования O₂⁻. Концентрация супероксидного анион-радикала в клетках *A. cepa* начинала возрастать через 5 мин после добавления элиситора, достигала максимума к 4 ч и затем снижалась. Вероятно, первое незначительное увеличение образования O₂⁻ на протяжении 1 ч после добавления элиситора необходимо для индуцирования защитных реакций, тогда как максимальное накопление АФК может участвовать в образовании ограниченных некрозов клеток, т.е. проявлении реакции сверхчувствительности [8].

В контрольных экспериментах элиситор из *B. cinerea* не вызывал изменения хемилюминесцентного сигнала в отсутствие клеток лука. В необработанных элиситором клетках регистрировали постоянный незначительный уровень образования O_2^- . Следует отметить, что в отсутствие ДДК мы не наблюдали сигнал ЛЦЗХ ни в контроле, ни в обработанных элиситором клетках лука. По-видимому, количество СОД либо другой антиоксидантной системы в этих клетках достаточно для полной дисмутации O_2^- в H_2O_2 , несмотря на повышение содержания супероксидного анион-радикала после распознавания растительными клетками элиситора. ДДК в концентрации 0,63 мМ почти полностью ингибировал активность очищенной СОД, оставляя лишь незначительный уровень сигнала ЛЦЗХ [7].

Реакция клеток лука на добавление элиситора зависела от концентрации последнего. Для индукции образования значительного количества O_2^- достаточно было всего 10 мкг/мл элиситора из *B. cinerea*. Возникал вопрос – какая ферментная система отвечает за индуцированное образование супероксидного анион-радикала?

Возможный источник образования O_2^- . Считается, что молекулярные механизмы окислительного взрыва в клетках животных и растений имеют много общего [8, 9]. Мы решили выяснить причастность НАДФН-оксидазы – стартового фермента НАДФН-оксидазной сигнальной системы, который, как известно, участвует в образовании O_2^- при окислительном взрыве у активированных нейтрофилов клеток животных. С этой целью использовали ДФИ, который ингибирует активность НАДФН-оксидазы, непосредственно связывая флавопротеиновый компонент этого ферментного комплекса [10]. Оказалось, что ДФИ в концентрации 50 мкМ на 83% ингибирует сигнал ЛЦЗХ, индуцированного биогенным элиситором в клетках лука. При этом сам ДФИ не оказывал влияния на хемилюминесцентную реакцию люцигенина.

Анализ динамики ингибирования НАДФН-оксидазы показал, что образование O_2^- уменьшалось, если ДФИ добавляли перед обработкой элиситором. Добавление ДФИ через 10 мин после элиситора практически не влияло на сигнал ЛЦЗХ. Известно, что на плазматической мембране и в клеточной стенке растений существует несколько систем, способных генерировать активный кислород. При взаимодействии патогена с растением молекулярный кислород может восстанавливаться НАДН- или НАДФН-зависимыми оксидазами, находящимися в плазматической мембране. Однако, в ряде работ выявлены альтернативные источники АФК. Оказалось, что образование O_2^- при активации защитных реакций у растений могут индуцировать также пероксидазы и пуриноксидазы клеточных стенок. Высказано предположение, что АФК образуются при участии не одного фермента, а сразу нескольких из числа упомянутых выше ферментов [11].

Полученные нами данные свидетельствуют, что образование O_2^- в клетках лука является чувствительным к ингибитору НАДФН-оксидазы,

подавляющему окислительный взрыв у нейтрофилов. Так, добавление 50 мкМ ДФИ вызывало 98%-ное ингибирование образования O_2^- активированными нейтрофилами [10].

Вместе с тем, результаты такого рода ингибиторного анализа следует интерпретировать с определенной осторожностью. Оказывается, что ДФИ, который мы использовали в экспериментах для ингибирования НАДФН-оксидазы, может ингибировать пероксидазу и NO-синтазу. Более того, он мог также ингибировать образование мочевой кислоты ксантин-оксидазой [12]. Такое многоцелевое действие данного ингибитора можно объяснить тем, что все эти ферменты содержат в своем составе флавопротеиновую субъединицу. Принимая во внимание аргументы «за» и «против» ингибиторного анализа, мы полагаем, что вероятным источником образования супероксида в клетках *A. сера* является оксидаза с флавопротеиновой субъединицей.

Роль Ca^{2+} /кальмодулина в образовании O_2^- . Для выяснения роли Ca^{2+} в индукции АФК у *A. сера* анализировали эффекты различных соединений, которые способны изменять концентрацию вне- и внутриклеточного Ca^{2+} . Связывание свободного Ca^{2+} в среде при помощи 5 мМ ЭГТА приводит к существенному снижению образования O_2^- в обработанных элиситором клетках лука.

Блокатор потенциалзависимых Ca^{2+} каналов – верапамил значительно ингибировал индуцированное элиситором образование O_2^- . Добавление верапамила за 20 мин до обработки элиситором вызывало снижение образования O_2^- (51% ингибирование). Полученные нами данные об ингибирующем эффекте верапамила на образование O_2^- свидетельствуют о том, что Ca^{2+} играет важную роль на ранних этапах трансдукции сигнала при активации АФК-генерирующих ферментных систем.

Поскольку Ca^{2+} , как известно, может затем связываться с Ca^{2+} -зависимыми белками, включая кальмодулин, мы решили проанализировать роль последнего в активации ферментных систем, генерирующих АФК. Оказалось, что ТФП и W-7, антагонисты кальмодулина, полностью ингибировали индуцированное элиситором выделение O_2^- клетками лука. Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что кальмодулин также принимает участие в активации АФК-генерирующих систем.

Ингибирующее действие ЭГТА, верапамила и антагонистов кальмодулина свидетельствует о вовлечении Ca^{2+} и кальмодулина в процесс активации ферментных систем, которые генерируют O_2^- . Вероятно, Ca^{2+} может непосредственно или опосредованно модулировать активность НАДФН-оксидазы. Было показано, что у растений ген *gr91^{phox}* субъединицы НАДФН-оксидазы, гомологичной таковой НАДФН-оксидазы нейтрофилов, кодирует белок плазматической мембраны с Ca^{2+} -связывающим доменом [13]. У животных клеток, продуцирующих АФК, имеется кальмодулин-зависимая НАД-киназа, которая превращает НАД в НАДФ, обес-

печивая таким образом НАДФ для оксидазы в ходе окислительного взрыва. Кальмодулин-зависимые киназы, как известно, широко распространены и у растений. Были получены трансгенные растения, конститутивно экспрессирующие кальмодулин. Они обладали повышенным конститутивным и индуцибельным содержанием НАДФН, что приводило к усиленному образованию H_2O_2 в ответ на обработку элиситором [14].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что образование O_2^- в обработанных биогенным элиситором клетках лука происходит при участии НАДФН-оксидазной и кальциевой сигнальных систем. Показано, что возможным источником супероксидного анион-радикала в клетках *A. cepa* является оксидаза с флавопротеиновой субъединицей. Вклад других оксидаз в процесс генерации АФК еще предстоит выяснить.

Литература

1. *Doke N.* Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the HR to hyphal cell wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity // *Physiol. Plant Pathol.* – 1983. – 23. – P. 359-367.
2. *Baker B., Zambrysky P., Staskawic B.* Signaling in plant-microbe interactions // *Science.* – 1997. – 276. – P. 726-733.
3. *Levin A., Tenhaken R. Dixon R.* H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response // *Cell.* – 1994. – 79. – P. 583-593.
4. *Тарчевский И.А.* Сигнальные системы клеток растений. М: Наука. – 2002. – 294 с.
5. *Dmitriev A.P., Tverskoy L.A., Kozlovsky A.G.* Phytoalexins from onion and their role in disease resistance // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1990. – 37. – P. 235-244.
6. *Дячок Ю.В., Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М.* Ca^{2+} как вторичный мессенджер в индуцировании синтеза фитоалексинов и накопления каллозы в культуре клеток *Allium cepa* // *Физиология растений.* – 1997. – 44. – P. 333-338.
7. *Corbisier P., Houbion A., Remacle J.* A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence // *Anal. Biochem.* – 1987. – 164. – P. 240-247.
8. *Дмитриев А.П.* Фитоалексины и их роль в устойчивости растений. Киев: Наук. думка, 2000. – 209 с.
9. *Дьяков Ю.Т.* На пути к общей теории иммунитета. Журнал общ. биол. – 2005. – 66. – 6. – С. 451-458.
10. *Cross A.R., Jones O.T.G.* The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils: specific labeling of a component polypeptide of the oxidase // *Biochem. J.* – 1986. – 237. – P. 111-116.
11. *Bolwell G.P.* Role of active oxygen species and NO in plant defense responses // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 1999. – 2. – P. 287-294.
12. *Able A.J., Guest D.I., Sutherland M.W.* Hydrogen peroxide yields during the incompatible interaction of tobacco suspension cells inoculated with *Phytophthora nicotianae* // *Plant Physiol.* – 2000. – 124. – P. 899-910.
13. *Keller T., Damude H., Werner E. et al.* A plant homologue of the neutrophil NADPH oxidase gp 91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca^{2+} binding motifs // *Plant Cell.* – 1998. – 10. – P. 1-13.

14. *Harding S.A., Roberts D.M.* Incompatible pathogen infection results in enhanced reactive oxygen and cell death responses in transgenic tobacco expressing a hyperactive mutant calmodulin // *Planta.* – 1998. – 206. – P. 253-258.

Резюме

Биогенный элиситор из фитопатогенного гриба *Botrytis cinerea* вызывает значительное повышение содержания активных форм кислорода (АФК) в клетках суспензионной культуры *A. cepa*. Окислительный взрыв, индуцированный этим элиситором, зависит от активности Ca^{2+} и кальмодулина. Возможным источником образования супероксидного анион-радикала в клетках лука является оксидаза с флавопротеиновой субъединицей.

Биогенний еліситор з фітопатогенного гриба *Botrytis cinerea* викликає значне підвищення вмісту активних форм кисню (АФК) в клітинах суспензійної культури *A. cepa*. Окиснювальний вибух, індукований цим еліситором, залежить від активності Ca^{2+} та кальмодуліну. Можливим джерелом утворення супероксидного аніон-радикалу в клітинах цибулі є оксидаза з флавопротеїновою одиницею.

Biotic elicitor derived from necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* induced remarkable amount of reactive oxygen species (ROS) in cultured onion (*A. cepa*) cells. Elicitor-induced oxidative burst depends on Ca^{2+} /calmodulin activity. A possible source of superoxide anion-radical in onion cells assumed to be an oxidase with a flavoprotein subunit.

ЕВДОКИМЕНКО К. , СЕРГА С.В., КОЗЕРЕЦЬКА И.А.

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01601, ул. Володимирська, 64, м. Київ, Україна
Evdokimenkoks@gmail.com*

LTR- ГЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАИНЫ

Ретротранспозоны являются эукариотическими мобильными элементами и составляют значительную часть генома разных организмов [1]. Раньше считалось что все мобильные элементы (МЕ) являются «паразитическими» компонентами, которые не дают никаких преимуществ геному хозяина [2]. Недавние исследования показали, что делать выводы о «эгоистичной» ДНК в геноме преждевременно и, возможно, присутствие МЕ необходимо для нормального функционирования генетического аппарата. На данный момент все больше и больше ретротранспозонов идентифицируют в или около функционирующих генов, и показано, что эти элементы имеют значительный эффект на уровень экспрессии генов[3,4]. Геномные подходы начинаются с идентификации ассоциации мобильный элемент- ген [5]. Нахождение определенной ассоциации в геноме само по себе не свидетельствует о ее адаптивном значении. Однако, эти ассоциации могут встречаться с высокой частотой в популяции, что свидетельствует о фиксации такого события в геноме данного вида [6]. Ранее было показано, что в различных популяциях и лабораторных линиях *Drosophila melanogaster* встречаются ассоциации генов и ретротранспозонов с высокой

частотой, что позволяет говорить о их адаптивности [6]. Закономерности распространения таких ассоциаций в природных популяциях детально не изучены, а причины и механизмы их возникновения/исчезновения остаются не известными.

В данной работе исследовано распространение ассоциаций LTR-ретротранспозон-ген в нескольких природных популяциях *D. melanogaster* Украины. Для этого проводили анализ наличия ассоциаций в 2 годах сбора особей из природных популяций. Исследовали ассоциации гена ингибитора 3 сериновой протеазы (*SPN3*) с мобильным элементом *Quasimodo*, гена белков надсемейства *TM4SF* с мобильным элементом 297 и гена *Ken and Barbie* с 297 элементом.

Материалы и методы

Были проанализированы представители *D. melanogaster* природных популяций городов Умань, Киев, Пирятин, Дрогобыч, Варва, Мотовиловка, Одесса, Ялта, Чернобыль, Полесское, а также вблизи водоема-охладителя ЧАЭС и на опушке Рыжего леса. Из 10 особей каждой популяции была выделена ДНК, которая использовалась для проведения ПЦР. Проводили поиск последовательности отдельно каждого гена, ретротранспозона и ассоциации ген-мобильный элемент во всех исследуемых популяциях.

Для идентификации искомым фрагментов использовали праймеры и ПЦР программы, приведенные в литературе [6].

Секвенирование проводилось в Университете Южной Каролины, США с использованием 3130 Genetic Analyzer. Результаты секвенирования были проанализированы с применением программы VectorNTI. Последовательности идентифицировались с помощью BlastN поиска в базе GenBank.

Результаты и обсуждение

Присутствие 3 указанных выше ассоциаций было проанализовано в 12 природных популяциях. Результаты, представленные в данной работе, свидетельствуют, что ассоциации являются свойственными для данной территории и широко распространены в исследованных популяциях. Секвенирование изучаемых последовательностей показало, что мобильный элемент может находиться между генами или примыкать к одному из генов, что соответствует литературным данным [7]. На рисунке схематически представлен результат секвенирования фрагмента 1233 п.о., который включает часть гена и часть LTR-ретротранспозона (ген *Spn3* и мобильный элемент *Quasimodo* в геноме представителей популяции яблочного сада в г. Чернобыль).

Результаты секвенирования свидетельствуют, что 3' конец гена *SPN3* фланкируется 5' концом ретротранспозона *Quasimodo*, который находится на расстоянии 136 пар оснований от 3'UTR гена.

SPN3- Quasimodo
 1233 bp
Intron 2
Intron 3
Quasimodo
Exon 2
3'UTR
Exon 3
Exon 4

Рис. Взаимное расположение гена *Spn3* и мобильного элемента *Quasimodo* в геноме представителей популяции яблочного сада в г. Чернобыль.

Секвенирование 2 остальных ассоциаций показало, что 297 ретроэлемент ассоциирован одновременно с 2 генами (примыкает к 5' концу гена *Ken and Barbie* и к 3' концу гена *TM4SF*).

Кроме анализа присутствия ассоциаций в геномах представителей природных популяций анализировалась динамика их распространения в природе за 2 года. Результаты представлены в таблице.

Таблица

Наличие ген – LTR-ретротранспозон ассоциаций в природных популяциях *D. melanogaster* Украины

Популяции	2010	2011	2010	2011	2010	2011
	<i>Ken-297</i>	<i>Ken-297</i>	<i>Spn3-Quasimodo</i>	<i>Spn3-Quasimodo</i>	<i>TM4SF-297</i>	<i>TM4SF-297</i>
Киев	+	+	-	+	+	+
Варва	+	+	+	-	+	-
Умань	+	+	+	+	-	+
Полесское	+	+	-	-	+	+
Одесса	-	+	-	-	+	+
Ялта	+	+	-	+	+	+
Пирятин	+	-	+	+	-	+
Дрогобыч	+	+	-	+	+	-
Мотовиловка	-	+	-	-	+	+
Рыжий лес	+	+	-	н/д	+	н/д
Водоем охладитель ЧАЭС	-	+	+	-	+	+
Чернобыль	+	+	-	+	+	-

«+» -ассоциация присутствует в данной популяции; «-»- ассоциация не выявлена; н/д- нет данных по данной популяции

Данные, приведенные в таблице свидетельствуют, что три различные ассоциации встречались за 2 года исследований в популяциях г. Киев, Варва, Умань, Ялта, Пирятин, Дрогобыч ,Чернобыль и водоем-охладитель

ЧАЕС, две – Полесское, Одесса, Мотовиловка, опушка Рыжего леса. Кроме того следует отметить, что наличие ассоциации в конкретной популяции в 2010 году не гарантирует ее обнаружение в следующем. Таким образом можно сделать вывод, что такие ассоциации формируются в каждой популяции в каждом году *de novo*, а следовательно могут рассматриваться, как кратковременные адаптации. Следует также отметить, что на полученном результате могло также сказаться то, что не все особи обладают данной инсерцией в геноме и мы не детектировали ассоциацию в силу случайных причин.

В работе John F. McDonald [6] были проанализированы особи 18 природных популяций Америки, Африки, Океании, Азии и Европы, а также лабораторной линии на наличие исследованных нами ассоциаций ген-ретротранспозон. За данными этих авторов ассоциации мобильного элемента 297 с геном *ken* была найдена во всех Американских исследованных природных популяциях и в одной из пяти европейских (украинские популяции не исследовались), кроме того в популяциях Антильских островов и Чили; в Океании; в Африке на территории ЮАР, Конго и Кот-д'Ивуара. Наши исследования демонстрируют, что данная ассоциация найдена во всех изученных популяциях либо в 2010 либо в 2011 году. Таким образом частота встречаемости этой ассоциации в украинских популяциях гораздо выше, чем по Европе. Ассоциация 297 LTR с геном *TM4SF* в украинских популяциях, во-первых, встречается чаще, чем по Европе, во-вторых, эта встречаемость не совпадает иногда с такой для ассоциации 297 с геном *ken*, что характерно для исследований 2004 года [6]. Ассоциация *Quasimodo- SPN3* за литературными данными [6] встречалась равномерно в половине природных популяций. В Украине эта ассоциация была найдена в 8 из 12 исследованных популяций, что опять выше частоты встречаемости этой ассоциации в среднем по миру.

Таким образом проведенные нами исследования позволяют утверждать, что частоты встречаемости исследованных ассоциаций ген – ретро-транспозон в природных популяциях дрозофилы Украины выше, чем в Европе, а по ассоциации 297 с геном *ken* близки американским.

Литература:

1. Boeke J. D., and J. P. Stoye. Retrotransposons, endogenous retroviruses and the evolution of retroelements. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1997
2. Charlesworth B.. The maintenance of transposable elements in natural populations. Basic Life Sci. 1988. 47:189–212.
3. Britten R. J. 1996. DNA sequence insertion and evolutionary variation in gene regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9374–9377.
4. Lerman D. N., P. Michalak, A. B. Helin, B. R. Bettencourt, and M.E. Feder. 2003. Modification of heat-shock gene expression in *Drosophila melanogaster* populations via transposable elements. Mol. Biol. Evol. 20:135–144.

5. Petrov, D. A., Y. T. Aminetzach, J. C. Davis, D. Bensasson, and A. E. Hirsh. 2003. Size matters: non-LTR retrotransposable elements and ectopic recombination in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 20:880–892.

6. Lucia F. Franchini, Eric W. Ganko, and John F. McDonald. 2004 . Retrotransposon-gene associations are widespread among *D. melanogaster* populations . *Mol. Biol. Evol.* 21(7):1323–1331.

7. Ganko E.W., Greene C.S., Lewis J.A., Bhattacharjee V., McDonald J.F. LTR retrotransposon-gene associations in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Evol.* 2006 Jan;62(1):111-20.

Резюме

Проанализировано 12 природных популяций *Drosophila melanogaster* Украины на наличие трех LTR-ретротранспозон-генных ассоциаций в геноме. Ассоциация 297 LTR с геном *ken* и *TM4SF* найдена во всех исследуемых популяциях. Ассоциация *Quasimodo-SPN3* детектирована в 8 из 12 популяций. Картина распространения ассоциаций в популяциях в различные годы несколько различается.

Було проаналізовано 12 природних популяцій *Drosophila melanogaster* України на наявність 3 LTR-ретротранспозон-генних асоціацій в геномі. Асоціація 297 LTR з геном *ken* та *TM4SF* знайдена в усіх досліджуваних популяціях. Асоціація *Quasimodo-SPN3* детектована в 8 з 12 популяцій. Картина розповсюдження асоціацій в популяціях дещо варіює в різні роки.

We reviewed 12 natural populations of *Drosophila melanogaster* from Ukraine for the presence of 3 retrotransposon-gene associations their genomes. The associations of 297 retroelement with the *ken* and *TM4SF* genes were detected in all of the studied populations. *Quasimodo-SPN3* associations were observed in 8 of 12 populations. The distribution of the associations among natural populations varies from year to year.

ЖУК О.И.

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: zhuk_bas@voliacable.com*

ЭВОЛЮЦИОННОЕ СТАНОВЛЕНИЕ СИСТЕМ КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО РОСТА

Появление клеточной формы жизни обусловило необходимость контроля размеров для эффективного существования в виде компартмента, ограниченного со всех сторон плазматической мембраной. В основе ростовых процессов у всех живых организмов лежит необратимое увеличение объема клеток и изменение их поверхности. Обычно объем клетки увеличивается в 10-1000 раз. Главной движущей силой роста клетки растением является тургорный потенциал [7]. Наиболее существенную роль в этих процессах выполняет вода. Уникальные физические свойства воды не только содействовали появлению клеточной жизни, но также определяли эффективные для выживания и репродукции объемы клеток. Определяющим для функционирования клетки был жесткий контроль осмолярности, натяжения мембраны и гидростатического давления. Гидродинамическое

и гидростатическое давление относятся к фундаментальным физическим свойствам, которые определяют форму клетки и ее функции. Уже в ранней эволюции клетки встретились с проблемой контроля своего объема и регуляции потока воды через мембраны [14]. Клетки быстро отзываются на изменения в объеме и осмотическом потенциале. Считают, что решение этой проблемы возникло одновременно с появлением наиболее ранних протоклеток и формировалось на основе регуляции объема во время развития компонентов клетки.

У одноклеточных прокариот архей, возникших из первоклетки-прогенота и являющихся одними из наиболее древних из существующих организмов уже найдены механочувствительные ионные каналы (МК), которые в литературе обозначают MscS, MscL, TRP [9]. МК функционируют как осмотические предохранительные клапаны и инициируют процессы, ведущие к восстановлению объема клетки. Считают, что МК являются наиболее рано возникшими в процессе эволюции. Они сформированы в мембранах архей, которые образованы не фосфолипидами жирных кислот, как у эукариот и бактерий, а многоатомными спиртами с цепочками длиной 20-40 атомов углерода и зачастую эти мембраны представляют собой не бислой, а монослой. Археи преимущественно термофилы, хемоавтотрофы, обнаружены в горячих источниках. МК обнаружены также у бактерий и эукариот. Считают, что индуцированная давлением активация МК относится к первым сигнальным каскадам, которые реагируют при угрозе жизни клетки. У растений МК вовлечены в восприятие сигнала и регуляцию объема клетки. Клетки мезофилла *Arabidopsis thaliana* имеют МК, которые специфически открываются через выпуклые поверхности плазматической мембраны, такие как во время разбухания клетки [12]. Механочувствительные анионные каналы идентифицированы в клетках табака и участвуют в изменении объема. MscS-каналы контролируют размер и поверхность пластид у *Arabidopsis*. Механочувствительные Ca^{2+} -каналы идентифицированы в пыльцевых трубках лилии [5].

Дальнейшее повышение проницаемости мембран для воды произошло с формированием аквапориновых каналов, которые проницаемы для воды и небольших незаряженных молекул [8]. Считают, что аквапорины могут функционировать как осмосенсоры и регулировать объем клеток у животных и растений, грибов и бактерий. Первоначально аквапорины были открыты в эритроцитах человека [11]. Эти мембранные белки, образующие поры, были фактически найдены у всех организмов. Аквапориновые белки обнаруживают характерное консервативное строение. Часто аквапорины встроены в соответствующие мембраны в виде тетрамерной конструкции, содержащей четыре функционально независимые поры, которые снабжены соответствующими мономерами и дополнительную центральную пору, такую же, как и четыре латеральные поры. Аквапорины обнаружи-

вают неожиданно высокое разнообразие в проводимости. Они проводимы для воды, малых молекул, пероксида водорода, газов и ионов [2].

Растительные аквапорины подразделяют на четыре главные группы [13], которые локализованы в различных клеточных компартментах: плазматические мембранные внутренние белки (PIPs), тонопластные внутренние белки (TIPs), NOD26-подобные внутренние белки (NLMs, NIPs) и малые основные внутренние белки (SIPs), которые локализованы в эндоплазматическом ретикулуме. PIP подсемейство подразделяют на две группы, названные PIP1 и PIP2. В клетках растений функционирование PIP1 зависит от экспрессии PIP2.

Много аквапоринов экспрессируется в корнях [1, 3]. В кончике корня водный путь полностью контролируется аквапоринами и является трансклеточным. Аквапорины клеток корней непосредственно влияют на динамику гидравлической проводимости корней, транспорт воды по растению, тургор клеток в зоне растяжения листьев [6].

В поддержании динамического баланса между осмотическим потенциалом по обе стороны плазматической мембраны и объема клеток принимают участие ионы, особенно K^+ [4]. Транспорт K^+ через мембрану происходит с помощью K^+ -транспортеров и ионных каналов и зависит от H^+ -АТФазной активности, которая обеспечивает направленную электростатическую движущую силу для K^+ и открывание канала K^+ -каналы функционируют не только в растительных, но и в животных, и бактериальных клетках и имеют много общего в структуре. K^+ -каналы представляют собой ансамбли из четырех гомологичных субъединиц, которые объединяются, чтобы образовать центральную трансмембранную пору, формирующую пропускающий путь канала. Внутри каждой субъединицы четыре α -петли формируют заряженный сенсорный комплекс. Полагают, что открывание поры зависит от S5 и S6 α -петель, которые формируют диафрагму на внутренней поверхности мембраны. Механизм работы K^+ -каналов остается до конца не исследованным. Помимо специфических K^+ -каналов в мембранах существует ряд других каналов, способных транспортировать Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ и другие [10]. Эти каналы также являются компонентами сигнального пути, рецепторами внешних сигналов, участвуют в формировании симбиотических взаимоотношений растений с почвенными микроорганизмами, арбускулярными микоризными грибами. Изменение скорости потока ионов индуцирует ответное изменение потоков воды через мембрану и соответствующие изменения объемов клетки. Ионы и осмотически активные вещества формируют осмотический потенциал, который обуславливает гидростатическое давление по обе стороны плазмалеммы. Считают, что осмотическое давление и гидродинамика являются определяющими и критическими для клеточного роста. Объем клетки является критическим для натяжения мембраны и изменяется от периода ее роста и пролиферации до некроза и апоптоза у бактерий и эукариот. Некоторые функции растений и грибов зависят

от гидродинамического потока. К ним относятся открывание и закрывание замыкающих клеток устьиц, проникновение гифов грибов.

Изменения объема клетки индуцируют сигнальные пути. Показано, что в условиях осмотического стресса возрастает уровень сигнальных липидов [14]. Гипоосмотические условия и набухание клетки увеличивали количество фосфатидной кислоты в пыльцевых трубках цветковых растений, одноклеточных зеленых водорослях и эритроцитах. Гиперосмотические условия и сжатие клеток индуцировали увеличение количества фосфатидилинозитолбисфосфата в животных и растительных клетках. Осмотический стресс также индуцировал MAP-киназный каскад и индуцировал экспрессию генов.

Рост растительной клетки растяжением включает формирование клеточной стенки. Увеличение объема клетки происходит путем эластической деформации клеточной стенки, транспорта материалов матрикса и прикрепления их к внутренней стенке с помощью эндоцитоза [7]. Считают, что механические свойства клеточной стенки могут находиться под контролем вне- и внутриклеточного давления. Механические свойства клеточной стенки могут регулироваться балансом и гидродинамическим взаимодействием между внеклеточным и внутриклеточным давлением. Рост клетки растяжением происходит до периода формирования вторичной клеточной стенки. Ориентация микрофибрилл в клеточной стенке считается критическим параметром для определения анизотропии стенки клетки при натяжении. Микрофибриллы образуют полные петли или спирали, чьи концы соединены. Типичные микрофибриллы не превышают 10 мкм в длину, поэтому не способны формировать полные петли вокруг периметра клетки. Их дополняют такие компоненты клеточной стенки как арабиногалактаны.

Процессы растяжения клеток растений находятся под непосредственным контролем фитогормонов. Считают, что ауксины регулируют активацию экспансинов через открытие водородных связей между целлюлозными микрофибриллами, позволяя расширять клеточную стенку. Экспансины и другие модифицирующие клеточную стенку ферменты играют особенно важную роль у быстрорастущих клеток, чтобы поддерживать оптимальное растяжение клеточной стенки. В контроле растяжения клетки принимает участие сеть микротрубочек, организующая цитоскелет. В период формирования клеточной стенки значительная часть микротрубочек ориентируется вдоль главных микрофибрилл.

Таким образом, возникновение клетки в процессе эволюции сопровождалось формированием и совершенствованием систем и структур, формирующих и контролирующих процессы роста клеток и взаимодействие с окружающей средой и соседними клетками в составе многоклеточного организма. Клеточные мембраны обладают эволюционно сформированными каналами, которые регулируют и контролируют процессы транспорта воды и ионов и возникли еще в период формирования первых клеток.

Литература

1. Жук О.І. Транспорт води в рослинах //Вісник Харківського державного університету ім. Каразіна.- 2010.- вип.11 (№905). –С.212-217.
2. Обручева Н.В., Синькевич І.А. Аквапорины и рост клеток// Физиология растений.- 2010.- т.57,№2.-С.163-176.
3. Bramley H., Turner N.C., Terner D.V., Tyerman S.D. Roles of morphology, anatomy and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots// Plant Physiol.-2009.-vol.150,N1.-P.348-364.
4. Dryer J., Blatt M.R. What makes a gate? The ins and outs of Kv-like K⁺ channels in plants // Trends Plant Sci.-2009.-vol.14, N7.-P.383-390.
5. Dutta R., Robinson K.P. Identification and characterization of stretch-activated ion channels in pollen protoplasts //Plant Physiol.- 2004.-vol.135.-P.1398-1406.
6. Ehlert Ch., Maurel Ch., Tardieu F., Simorreau T. Aquaporin-mediated reduction of maize root hydraulic conductivity impacts cell turgor and leaf elongation even without changing transcription // Plant Physiol.- 2009.-vol.150,N2.- P.1093-1104.
7. Geitmann A., Ortega J.K.E. Mechanics and modeling of plant cell growth // Trends in Plant Science.-2009.-vol.14, N9.-P.467-478.
8. Kaldenhoff R., Ribas-Carbo M., Sans J.F., Lovisolo K., Heckwolf M., Uehlein N. Aquaporins and plant water balance// Plant, Cell Environ.-2008.-vol.31.- P.658-666.
9. Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction// J. Cell Sci. -2004.-vol.117.- P.2449-2460.
10. Matzke M., Weiger T.M., Papp I., Matzke A.J.M. Nuclear membrane ion channels mediate root nodule development // Trends Plant Sci.- 2009.-vol.14, N6.- P.295-298.
11. Preston G.M., Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: members of an ancient channel family// Proc. Nat. Acad. Sci. USA.- 1991.-vol.88.- P.11110-11114.
12. Roberts S.K. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots //New Phytol.-2006.-vol.169.- P.647-666.
13. Wudick M.M., Doan-Trung L., Maurel Ch. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins //New Phytol.-2009.-vol.184, N2.- P.289-302.
14. Zonia L., Munnik T. Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function //Trends in Plant Science. -2007.-vol.12, N3.- P.90-97.

Резюме

Поява клітинної форми життя обумовила необхідність контролю розмірів клітин. У древніх одноклітинних прокариот архей сформовані механочутливі канали. Для регуляції потоків води, малих молекул існують аквапоринові канали. Потік іонів і осмотичний потенціал регулюють іонні канали. Таким чином, ростові процеси знаходяться під контролем еволюційно сформованих систем каналів.

Появление клеточной формы жизни обусловило необходимость контроля размеров клеток. У древних одноклеточных прокариот архей сформированы механочувствительные каналы. Для регуляции потоков воды, малых молекул существуют аквапориновые каналы. Поток ионов и осмотический потенциал регулируют ионные каналы. Таким образом, ростовые процессы находятся под контролем эволюционно сформированных систем каналов.

The emergence of cell form of life set conditions for necessity to control the cell sizes. In the ancient unicellular prokaryote archaea mechanosensitive channels were

formed. Aquaporin channels exist for regulation of water and small molecules flow. Ion channels regulate the flow of ions and osmotic potential. Thus, the growth processes are under control of channels systems formed by evolution.

ЗАДОРОЖНА О.А.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України

Україна 61128 Харків, Московський пр., 142, e-mail: olzador@ukr.net

ВИЯВЛЕННЯ АЛЕЛІВ ГЕНА Rf_1 У ЛІНІЙ СОНЯШНИКУ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Важливим напрямком сучасної селекції соняшнику (*Helianthus annuus* L.) є створення вихідних форм для гетерозисних гібридів [1]. Сучасні комерційні гібриди соняшнику, як правило, базуються на такому джерелі цитоплазматичної чоловічої стерильності (ЦЧС) як PET1 цитоплазма. Це джерело було ізольовано Леклерком (1969) з міжвидового гібриду *Helianthus petiolaris* Nutt. x *Helianthus* визначено, як PET1 цитоплазма [2]. Стерильні лінії – носії цієї цитоплазми відновлюються геном фертильності пилку Rf_1 . Відомі інші джерела ЦЧС, відмінні від PET1 [3,4].

Вважалось, що відновлення фертильності пилку забезпечується наявністю одного домінантного гена Rf в гомозиготному та гетерозиготному стані [5]. В інших дослідженнях доведено складний генетичний контроль ознаки відновлення фертильності пилку, зокрема, що відновлення чоловічої стерильності контролюють неалельні домінантні гени, що взаємодіють комплементарно та за типом кумулятивної та некумулятивної полімерії [6].

Зараз існують більш конкретні дані. У більшості випадків для культурного соняшнику відновлення фертильності пилку відбувається завдяки одному ядерному гену Rf_1 , який знаходиться на 13 хромосомі (LG13) [7]. Відомо, також, про існування Rf_2 [8], комплементарного Rf_1 . Відомий ген Rf_3 , який відмінний від Rf_1 , знаходиться на сьомій хромосомі (LG7) та може відновлювати PET1 також ефективно, як і Rf_1 [9] та Rf_4 , що розташований в третій групі зчеплення (LG3) і контролює відновлення фертильності пилку в новому джерелі ЦЧС GIG2, [10]. Відомі молекулярні маркери до деяких генів Rf , зокрема Rf_1 .

Дослідження про використання молекулярних маркерів до генів відновлення фертильності пилку проводились і для соняшнику. Внаслідок найбільшої поширеності системи PET1- Rf_1 , більшість досліджень присвячено саме маркуванню гена Rf_1 . Молекулярне картування локусу Rf_1 проведено на різних популяціях. Для картування Rf_1 використовували RELP маркери [11], RAPD, SCAR та AELP маркери [11-13] та SSR [14,15]. Це дозволяє виявити ген Rf_1 у різних ліній соняшнику та при потребі провести їх диференціацію.

Для сучасних потреб селекції широко застосовуються добори за маркерами (Marker assisted selection) за допомогою яких можна швидко проводити добір відповідних зразків з цінними ознаками.

У зв'язку з цим, метою нашої роботи було ідентифікувати за допомогою молекулярного маркера ген Rf_1 , виявити поліморфізм відповідного локусу у селекційних лініях та гібридах. Прослідити успадковування алелів цього локусу, що в подальшому можна використовувати при доборах відповідних зразків.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були: лінії з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (PET1) Сх908А, Сх1002А, Сх1006А, Сх1010А, Сх1012А, Сх2111А, Сх2552А, лінія-закріплювач стерильності Х908Б, лінії-відновлювачі фертильності пилку Х114В, Х526В, Х711В, Х712В, Х714В, Х720В, Х762В, Х782В, Х840В селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва, лінія УКЧ-НР [16], гібриди F_1 , F_2 (Х114В× УКЧ-НР).

Для ідентифікації гена Rf_1 було використано молекулярний SSR маркер ORS511 [15]. Для молекулярно-генетичного аналізу екстракцію ДНК проводили з використанням СТАВ методу [17]. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за стандартною методикою в термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», Росія). До складу реакційної суміші об'ємом 20 мкл входили: 1х буфер (10 мМ Трис-НСІ, 50мМ КСІ, 0,8% нонідет), 2мМ dNTPmix, 0,2мМ кожного праймеру, 2,5 мМ MgCl₂, 1 од Таq-полімерази («Fermentas»). Ампліфікацію проводили. Умови ампліфікації: Початкова денатурація 94°C 2 хв, 35 циклів при таких режимах: денатурація 94°C 40 с, відпал 55°C 30 с, елонгація 72°C 2 хв. Фінальна елонгація 72°C 5 хв. Продукти ампліфікації розподіляли у 2% агарозному гелі в 1 х кратному TBE буфері відносно маркера Orange Ruler 100 bp DNA Ladder («Fermentas»). Візуалізацію проводили з використанням етідіум броміду за допомогою транслюмінатора UVT-1 («Біоком», Росія). Результати аналізували за допомогою програми Gel Images-2 («Хелікон», Росія).

Результати та обговорення

За результатами досліджень встановлено, що у локусі ORS511 відбулась ампліфікація у ліній Х114В, Х526В, Х711В, Х712В, Х714В, Х720В, Х762В, Х782В, Х840В, УКЧ-НР, гібридів F_1 , F_2 (Х114В× УКЧ-НР) (рис.1, 2). У більшості ліній спостерігався алель ORS511_169. У лінії Х720В та гібридів F_1 , F_2 (Х114В×УКЧ-НР) також алелі ORS511_287, ORS511_384 та ORS511_461. У лінії Х114В, Х762В лише алелі ORS_287, ORS_384 та ORS_461. З 10 проаналізованих за локусом ORS511 ліній-відновлювачів фертильності пилку лише 3 виявились поліморфними. В цілому, в локусі ORS511 ідентифіковано 4 алеля. Найпоширеніший з них ORS511_169. Таким чином аналіз локусу ORS511, який знаходиться на відстані 3,7сМ від гену Rf_1 [15] свідчить про наявність маркерних алелів до гену Rf_1 у досліджених ліній-відновників фертильності пилку. Одержані результати під-

твердили, що вищезазначені лінії соняшнику є носіями гена Rf_1 , що раніше було визначено традиційним методом запилення стерильних форм на РЕТ1 цитоплазмі.

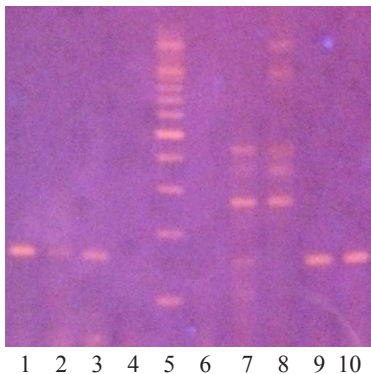


Рис.1 .Електрофореграма продуктів ампліфікації по локусу ORS511 у 2% агарозі:1-X526В, 2-X711В, 3-X714В, 4-Сх1006А, 5-М – маркер молекулярної маси 100 бр, 6-X908Б, 7-X720В, 8-X762В, 9-X782В, 10-X840В

Аналіз локусу ORS511 для стерильних ліній Сх908А, Сх1002А, Сх1006А, Сх1010А, Сх1012А, Сх2111А, Сх2552А та лінії – закріплювача стерильності Х908Б маркерних алелів не виявив (рис.1). Аналогічні результати одержані при використанні SCAR-маркерів ОРК13_454/HRG01 та HRG02, які спостерігались у ліній-відновлювачів фертильності пилку та були відсутні у закріплювачів стерильності [12].

Проведено аналіз алелів гена Rf_1 у вихідних ліній та їх гібридів (рис.2). Лінія Х114В має алелі ORS511_287, ORS511_384 та ORS511_461. Лі-

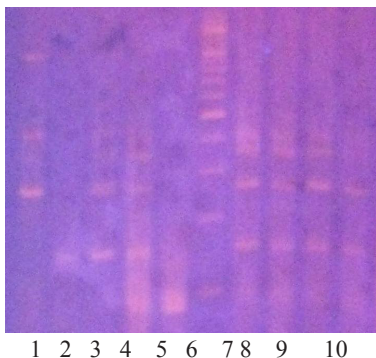


Рис.2. Електрофореграма продуктів ампліфікації по локусу ORS511 у 2% агарозі:1-Х114В; 2-УКЧ-НР; 3- F_1 (Х114В×УКЧ-НР); 4,7-10- F_2 (Х114В×УКЧ-НР), 6-М-маркер молекулярної маси 100 бр

нія УКЧ-НР – ORS511_169. Гібриди F_1 та F_2 (X114В×УКЧ-НР) мали алелі ORS511_169, ORS511_287, ORS511_384 та ORS511_461. Прослідкований поліморфізм у гібридів F_1 , F_2 (X114В×УКЧ-НР) за відповідним локусом свідчить про сумарний характер його утворення.

Таким чином, одержані результати свідчать про наявність гена Rf_1 у ліній-відновлювачів фертильності пилку та відповідних гібридів селекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва. Виявлені 4 алелі гену Rf_1 : ORS511_169, ORS511_287, ORS511_384 та ORS511_461. Встановлена можливість диференціації ліній за здатністю до закріплення стерильності та відновлення фертильності пилку за допомогою молекулярного SSR маркера.

Література

1. *Курченко В.В.* Селекция и семеноводство подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). – Харьковю- 2005. – 385 с.
2. *Leclercq, P.* Une sterilité male cytoplasmique chez le tournesol//Annales de l'Amélioration de Plantes.-1969.-vol.19,-P. 99-106.
3. *Chepurhaya A., Sherstyuk V., Tikhomirov V.* CMS-Rf system for sunflower breeding //Helia.-2003.-vol. 26,-№ 38. P. 59-65.
4. *Venkana V., Lokanadha Reddy D. et al.* Identification of restorers and maintainers for different cms sources in sunflower using new inbreds // Helia.-2008.-vol.31, №49.-P.65-70.
5. *Анащенко А. В., Дука М. В.* Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение II. Восстановление мужской фертильности у гибридов на сонове ЦМСр // Генетика.-1985.-Т.XXI, №12.-С.1999-2004.
6. *Анащенко А. В., Дука М. В.* Изучение генетической системы ЦМС-Rf у подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Сообщение III. Восстановление мужской фертильности у гибридов на сонове ЦМС₁ // Генетика.-1985.-Т.XXI, №12.-С.2005-2010.
7. *Yu, J.K., Tang, S., Slabaugh, M.B. et al.* Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower // - Crop Science.-2003.-vol. 43, №1. - P. 367-387.
8. *Leclercq P., Philippon J. P.* Identification de gènes de restauration de fertilité sur cytoplasmes stérilisants chez le tournesol // Agronomie.- 1984.-vol.4, №6.-P. 573-576.
9. *Jan C-C., Vick B.* Inheritance and allelic relationships of fertility restoration genes for seven new sources of male-sterile cytoplasm in sunflower //Plant Breeding.-2007.-vol.126, №2.-P.213-217.
10. *Feng J., Jiujuan J.* Introgression and molecular tagging of Rf_4 , a new male fertility restoration gene from wild sunflower *Helianthus maximiliani* L. // Theor. Appl. Genet.-2008.-vol. 117, № 2.-P. 241-249.
11. *Gentsbittel L., Vear F., Zhang Y.-X. et al.* Development of a consensus linkage RELP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor. Appl. Genet.- 1995.-vol.90, №7-8.-P.1079-1086.
12. *Horn R, Kusterer B, Lazarescu E. et al.* Molecular mapping of the Rf_1 gene restoring pollen fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor Appl Genet.-2003.-vol.106, №4.-P.599-606.
13. *Kursterer B., Prüfё M., Lazarescu E.* Mapping of the restorer gene Rf_1 in sunflower (*Helianthus annuus* L.)// Helia.-2002.-vol.25, №36.-P.41-46.

14. Kusterer B., Friedt W., Lazarescu E. et al. Map-based cloning strategy for isolating the restorer gene Rf_1 of the Pet1 cytoplasm in sunflower, *Helianthus annuus* L.//*Helia*, vol. 27, br. 40, str. 1-14, 2004

15. Yue B., Vick B., Cai X., Hu J. Genetic mapping for the *Rf1* (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers// *Plant Breeding*.-2010.-vol.129, №1.-P. 24–28

16. Задорожна О. А. Успадковування деяких ознак листів соняшнику //Вісник Харківського Національного університету. Серія біологія.- 2011. -Вип.13 (№947).- С.87-92.

17. Ідентифікація і реєстрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшнику (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів: Методичні рекомендації. -Одеса, 2004.-16 с.

Резюме

Проведено тестування ліній та гібридів соняшнику (*Helianthus annuus* L.) на наявність гена Rf_1 за допомогою SSR маркера. Встановлено наявність гена Rf_1 у ліній-відновлювачів фертильності пилку та гібридів. Виявлені чотири алелі цього гена. Обговорюється можливість диференціації ліній-відновлювачів від ліній-закріплювачів за допомогою SSR маркера.

Проведен аналіз ліній і гібридів подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) на налічие гена Rf_1 при помощи SSR маркера. Установлено налічие гена Rf_1 у ліній-восстановителей фертильности пыльцы и гибридов. Выявлены четыре аллели этого гена. Обсуждается возможность дифференциации линей-восстановителей фертильности пыльцы и линей-закрепителей стерильности при помощи SSR-маркера.

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines and hybrids were tested with applying SSR-marker on restore gene Rf_1 present. It is determined the presence of Rf_1 in restorer lines and hybrids. Four alleles have been identified. An opportunity for differentiation of restorer lines and maintainer lines with SSR marker applying is discussed.

КАРПОВА І.С., *КОВАЛЕНКО Е.О., *ПОВЕЛИЦЯ Ю.А., *ГЕТЬМАН К.І., *САЩУК О.В., ЛУКАШ Л.Л., ПІДГОРСЬКИЙ В.С.*

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150,

** Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,*

e-mail: karpova_is@mail.ru

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМУ МОРФОЛОГІЧНИХ ВАРІАНТІВ ПРОДУЦЕНТА ЛЕКТИНУ – ШТАМУ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7014 З ВИКОРИСТАННЯМ ПРАЙМЕРІВ ДО ПОВТОРЮВАНИХ ВОХ-ЕЛЕМЕНТІВ

На сьогодні відомо, що вуглеводзв'язувальні білки – лектини є компонентами складних регуляторних систем у про- та еукаріот і відіграють фундаментальну роль в процесах біологічного впізнавання [1, 2]. В практичному плані лектини є перспективними фармакологічно активними ре-

агентами з антивірусними, імуномодуючими та протипухлинними властивостями. Зокрема, відкриті українськими вченими лектини сапрофітних бацил виявили здатність до стимуляції імунної відповіді та індукції гамма-інтерферону організму людини [3]. Гени лектинів сапрофітних бацил досі невідомі. За розробки рентабельної технології одержання позаклітинного сіалоспецифічного лектину з культуральної рідини штаму *B. subtilis* IMB B-7014 було помічено, що заміна поживного середовища Гаузе на мінеральне середовище спрощеного складу стимулює мінливість культури і призводить до збільшення частоти S-варіантів. Виявилось, що S-варіанти відрізняються від типових R-варіантів не тільки за морфологією і консистенцією колоній, але мають нижчий (у 4 рази) рівень лектинової активності. Відомо, що R-S дисоціація є адаптивною реакцією мікроорганізмів на зміну умов існування, зумовлена перебудовами певних ділянок геному. Геноми бактерій містять повторювані некодуючі послідовності довжиною до 400 п.о. серед яких найпоширенішими є представники трьох родин – позагенні повторювані паліндроми REP (repetitive extragenic palindromic), ентеробактеріальні повторювані внутрішньогенні консенсуси ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) та елементи BOX [4]. Останні належать до MITE-подібних елементів, мають міжгенну локалізацію, подвійну симетрію і здатні до формування петлеподібних структур. Розташовуючись на 5'-кінці мРНК, елементи BOX регулюють експресію генів [5]. На використанні праймерів, комплементарних до зазначених повторюваних послідовностей ДНК, базується метод геномного фінгерпринтингу (rep-PCR), який знайшов застосування у систематиці та клінічних дослідженнях бактерій. Раніше ми запропонували даний підхід для характеристики генетично нестабільних мутантів *B. subtilis* [4].

Мета роботи – використання комплементарних до міжгенних елементів BOX праймерів для виявлення можливих структурних перебудов геному серед R- і S-варіантів штаму *B. subtilis* IMB B-7014 – продуцента сіалоспецифічного лектину.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були: стандартні штами *B. subtilis* (SHgw і Lys42) з ґрунтових ізолятів, одержані з міжнародних колекцій, які слугували контролем, та R- і S-варіанти природного штаму *B. subtilis* IMB B-7014 з Української колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, виділений з шлунково-кишкового тракту здорово новонародженого теляти.

Геномну ДНК отримували за конвенційним фенольно-детергентним методом з бактеріальної нічної культури клітин, яку вирощували на агаризованому середовищі (Tryptose blood agar «Difco») протягом 12 год при 37⁰C. Клітини лізували лізоцимом (5 мг/мл) 15 хв при 37⁰C з наступним додаванням 35 мкл 10 % SDS. Депротейнізацію проводили в три етапи: 1 – обробка лізату рівним об'ємом суміші фенол/хлороформ, 2 – об-

робка лізату рівним об'ємом суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1), 3 – додавання до лізату рівного об'єму хлороформу. Від домішок РНК отриману ДНК очищали панкреатичною РНКазою А (50 мкг/мл, Sigma, США) протягом 30 хв при 37⁰С. Далі розчин геномної ДНК додатково депротейнізували описаним вище способом. Нуклеїнові кислоти осаджували центрифугуванням при 10 000 об/хв протягом 10 хв, промивали 70 % етиловим спиртом, висушували і розчиняли у 100 мкл буфера ТЕ. Геномну ДНК бактерій зберігали при – 20⁰С і для подальшої ВОХ–PCR брали 50 нг/ мкл на пробу [5].

Реакцію ВОХ–PCR проводили з використанням праймера ВОХ А1R (5'-СТACGGCAAGGCGACGCTGACG -3') до послідовності voxA. Реакційна суміш, кінцевий об'єм якої становив 50 мкл, містила 50 нг бактеріальної ДНК, 200 нМ праймера, 200 мкМ кожного з нуклеозидтрифосфатів, стандартний буфер для PCR, 2 мкМ MgCl₂, 10 % ДМСО та 1 одиницю активності Taq-полімерази. Приготування реакційної суміші проводили на льоду. Реакцію ставили в ампліфікаторі («Терцик», Росія). Початкова денатурація відбувалась при 95⁰С 6 хв; наступні 30 циклів проводили за таких умов: 1 – денатурація при 94⁰С протягом 1 хв; 2 – гібридизація при 55⁰С протягом 1 хв; 3 – елонгація при 65⁰С протягом 8 хв з кінцевим синтезом при 72⁰С 2 хв [5]. Для аналізу отриманих даних застосовували програму TotalLab v 2.01.

Результати досліджень

Дослідження геномної ДНК двох стандартних штамів *B. subtilis* (SHgw і Lys42) та R- і S-варіантів штаму В-7014 методом ВОХ-PCR виявило певні міжштамові відмінності. Ампліфіковані PCR-продукти за виходом розподілилися на мажорні (їх вміст складав більше 50 % від загального виходу ДНК), проміжні (2-10 %), мінорні (1-2 %) та субмінорні (до 1 %) і утворювали характерний для штаму профіль (рисунок).

Профіль PCR-продуктів для колекційного штаму Lys42 при застосуванні ВОХ-праймерів містив щонайменше десять компонентів. Мажорний продукт мав молекулярну масу біля 600 п.о., а з двох проміжних – один мав 485 п.о., а інший – 1000 п.о. Інші продукти ампліфікації відносилися до мінорних. Профіль іншого колекційного штаму SHgw не мав принципових відмінностей порівняно з штамом Lys42, за винятком двох мінорних продуктів з молекулярною масою 2300 і 400 п.о. Для R- і S- варіантів штаму В-7014 спостерігалися суттєві варіації в електрофоретичному профілі як між ними, так і порівняно з контрольними штамми. Зокрема, для R-форми були характерні мажорні продукти з молекулярною масою 2600 та 500 п.о., а для S-форми – 1500, 750 і 600 п.о. Спостерігались також якісні відмінності між формами штаму В-7014, а саме поява у R-форми високомолекулярного продукту (2600 п.о.) і відсутність двох інших продуктів (1000, 750 п.о.) порівняно з S-формою.

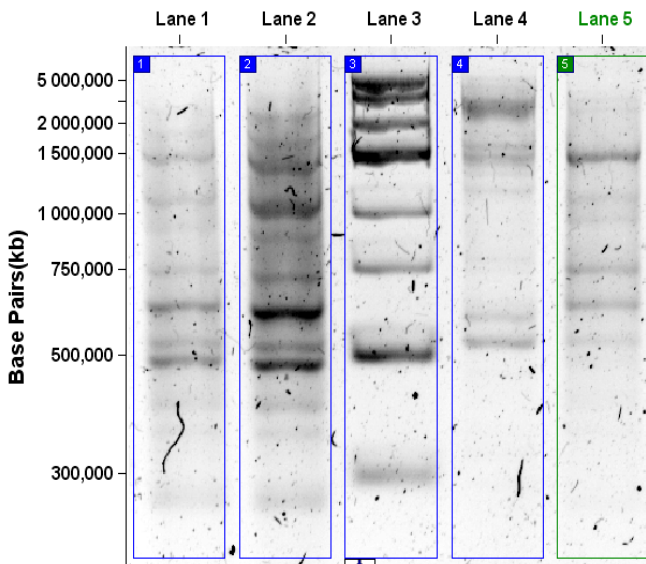


Рисунок. Продукти BOX-PCR-аналізу геномної ДНК. Молекулярна маса – т.п.о. (kb). Контрольні штам: 1 – SHgw, 2 – Lys42, 3 – маркер молекулярних мас, штам IMB B-7014: 4 –R-форма, 5 – S-форма.

Треба відмітити, що з п'яти PCR-продуктів у R-форми штаму B-7014 за молекулярною масою тільки три з них співпадали з такими колекційних штамів, а саме: 1500, 600 і 500 п.о. У випадку S-форми подібна кількість співпадінь з контрольними штамми SHgw та Lys42 була більшою і становила п'ять з шести PCR-продуктів (рисунок).

Одержані результати можна пояснити складними взаємодіями застосованих праймерів з різними ділянками геномної ДНК, в яких локалізовані повторювані BOX-елементи. Відмінності контрольних та досліджуваних штамів можуть бути наслідком їх різного походження, де штам *Bacillus subtilis* IMB B-7014 виділений із шлунково-кишкового тракту тварини, а контрольні штам є типовими представниками ґрунтової мікрофлори.

Можна висловити припущення, що характерні відмінності PCR-профіля R-форми від контролю та S-форми, які проявляються у появі мажорного високомолекулярного компонента (2600 п.о.), є наслідком перебудови (дуплікації/ампліфікації) певної ділянки геному, фланкованої BOX-елементами. Можливо, що дисоціація R-форми в S-форму супроводжується втратою або реорганізацією зазначеної послідовності ДНК. Не виключено, що рівень експресії позаклітинного сіалоспецифічного лектину даним штамом пов'язаний саме з цією ділянкою геному.

Висновки. Вперше з використанням праймерів до некодуючих послідовностей родини BOX встановлено відмінності типового R-варіанту штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014 від його S-форми, які проявляються у зміні характерного для штаму профілю з появою високомолекулярного PCR-продукта. Це може бути наслідком дуплікації/ампліфікації певної ділянки бактеріального геному, що впливає на лектинову активність штаму.

Література

1. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины. – Львов. – 1981. – 152с.
2. Лахтин М.В., Караулов А.В., Лахтин В.М., Алешкин В.А. и др. Лектин-гликоконъюгатные системы в организме человека // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2012. – №1. – С. 27-36.
3. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Лектины бактерий.– Киев.–1992. – 202 с.
4. Карпова І.С., Кузьменко О.Л., Негруцька В.В., Пальчиковська Л.Г. та ін. Аналіз методом REP-PCR нестабільних мутантів *Bacillus subtilis* з порушеннями росту за наявності в їх геномі інсерції Alu-повтору людини // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. – 2010. – № 19 – С. 213-219.
5. Knutsen E., Johnsborg O., Quentin Y., Claverys J.P. and Havarstein L.S. BOX Elements Modulate Gene Expression in *Streptococcus pneumoniae*: Impact on the Fine-Tuning of Competence Development // Journal of bacteriology. – 2006. – vol.188, № 23. – P. 8307–8312

Резюме

Застосування праймерів до некодуючих послідовностей родини BOX дозволило встановити відмінності типового R-варіанту штаму *Bacillus subtilis* IMB B-7014 від його S-форми, які проявляються у зміні характерного для штаму профілю з появою високомолекулярного PCR-продукта. Висловлено припущення, що ці відмінності можуть бути наслідком дуплікації/ампліфікації певної ділянки бактеріального геному, яка впливає на лектинову активність штаму.

Использование праймеров к некодирующим последовательностям семейства BOX позволило установить отличия типичного R-варианта штамма *Bacillus subtilis* IMB B-7014 от его S-формы, которые проявляются в изменении характерного для штамма профиля с появлением высокомолекулярного PCR-продукта. Высказано предположение, что эти отличия могут быть следствием дупликации/амплификации определенного участка бактериального генома, влияющего на лектиновую активность штамма.

Deviations in DNA pattern from control and between R-S derivatives of the *Bacillus subtilis* IMB B-7014 were shown using primers to noncoding BOX elements. Such deviations are supposed to be the result of duplication/amplification of some genome fragment that may effect on lectin's activity of the strain under study.

КЛИМЕНКО В.В., ЛЫСЕНКО Н.Г.

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы 4, e-mail: n.g.lysenko@gmail.com*

ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ШУМ И ОВОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Клонирование женских генотипов было открыто на тутовом шелкопряде более 70 лет назад благодаря разработанному Б.Л.Астауровым [1] методу искусственного амейотического партеногенеза, с помощью которого были получены первые искусственные клоны. Метод термического партеногенеза гарантирует клонирование материнского генотипа в силу подавления редукционного деления созревания тепловым шоком [2] и отсутствия кроссинговера у самок тутового шелкопряда [3]. Клонирование в данном случае является, фактически, результатом экспериментальной замены мейоза митозом во всех яйцах самки-основательницы клона, что и гарантирует копирование материнского генотипа всех особей партеногенетического поколения.

Несмотря на то, что особи клона имеют один генотип, они далеко не всегда демонстрируют фенотипическую идентичность. Внутриклональная вариация признаков (при синхронном развитии особей клона в одних и тех же условиях) со временем стала трудно объяснимой модификационной изменчивостью в принятом смысле слова. К настоящему времени определились четыре источника индивидуальной изменчивости в пределах клона: спонтанный мутагенез, трансплоидная комбинативная изменчивость, онтогенетические шумы и овогенетическая изменчивость [4].

В настоящей работе обсуждается изменчивость, связанная с разным возрастом зрелых ооцитов в яичнике, выраженная в случае тутового шелкопряда в линейном расположении яиц в овариоле имаго: здесь представлены данные, которые позволяют, на наш взгляд, говорить об овогенетической изменчивости и в общем случае, когда яичники занимают свое обычное положение в организме самки тутового шелкопряда в отличие от трансплантационных клонов, полученных ранее [5]. По сравнению с онтогенетическим шумом, стохастическим по своей природе, эта изменчивость закономерна и позволяет прогнозировать проявление признаков в зависимости от положения в овариоле / возраста ооцита.

Материал и методы

Выборку материала настоящей работы проводили в 2011 году на экспериментальной базе ХНУ им. Каразина в соответствии с принятыми зоотехническими требованиями. В качестве материала использовался партеноклон P5D (ch^+ , L , K , Ze , p^{δ}), гетерозиготный по указанным генам. Пенетрантность изучаемого признака (бугорчатых оранжевых пятен) на отдельном сегменте личинок клона оценивали как процент наличных пятен от их возможного числа в выборке, то есть если пятен 24, а личинок в вы-

борке 100, то пенетрантность составит $(24:200) \times 100 = 12\%$, поскольку больше двух пятен на сегменте не встречается. Экспрессивность, то есть максимальное выражение признака, вычисляли как процент личинок, проявивших оба пятна на изучаемом сегменте, по отношению к числу личинок в выборке.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического Т-критерия Вилкоксона для оценки разности между долями.

Результаты и обсуждение

Считается, что одной из причин внутриклональной фенотипической изменчивости является стохастичность молекулярных процессов в гомологичных закладках признака, имеющая модификационный характер и не наследующаяся при клонировании отдельного фенотипического варианта (особи клона) [6].

Внутриклональную изменчивость Струнников называл «третьей» или «реализационной» изменчивостью, проявляющейся только в синхронизированных популяциях изогенных особей (клонах) при идентичных условиях. Закономерные изменения в проявлении морфологических признаков внутри клона при этом остались незамеченными, поскольку в его опытах яйца каждой бабочки делили на порции, предварительно смешав [7]. Так как различий между полукладками обнаружено не было, предложенная им «реализационная» изменчивость, была определена как совокупность непредсказуемых и стохастичных отклонений от нормальной реализации генома. При таком описании реализационная изменчивость не отличается, по сути, от онтогенетических шумов, ранее предложенных Астауровым [8].

Только в экспериментальной ситуации, создаваемой имплантацией яичника в организм самца, впервые были замечены закономерно проявляющиеся отличия между ооцитами, которые сразу же были соотнесены с показанной ранее на тутовом шелкопряде внутриклональной изменчивостью морфологических признаков [5]. Выявлены градиенты убывания в дистально-проксимальном направлении вдоль овариолы: 1) эмбриональной жизнеспособности мурашей из яиц имплантата и 2) интенсивности окраски мурашей (неполное проявление гена ch^+ в гетерозиготе ch^+/ch). Ввиду случайной ориентации имплантата в теле самца эти вариации могут объясняться только временной программой созревания ооцитов в яичнике: эта программа, хоть и нарушена чужеродным окружением имплантированного яичника и отсутствием его связей с другими компонентами женской половой системы, все же сохраняет в модифицированном виде временную последовательность созревания яиц, создавая градуально изменяющиеся условия для будущей экспрессии гена ch^+ и эмбриональной жизнеспособности после термоактивации.

Параметры внутриклональной изменчивости, обусловленной положением зрелого яйца в овариоле, никогда не вычленились при изучении внут-

риклональной вариации признака, входя полностью в оценки его пенетрантности и экспрессивности, детерминированные генотипом клона и различающиеся в разных партеноклонах [6].

Исходя из результатов изучения вариации фенотипических признаков в трансплантационных клонах, мы считаем, что градиентный характер проявления признаков внутри клона, обусловленный растянутым во времени процессом формирования зрелых ооцитов имаго, сохраняется и в случаях клонирования без хирургического вмешательства. Для проверки этого предположения мы изучили пенетрантность и экспрессивность еще нескольких признаков в связи с положением яиц в овариоле.

Использовали партеноклон P5D, обладающий неполно проявляющимся геном L(4-0.0) пятнистости на дорзальной стороне каждого сегмента и геном K(11-0.0), который неизменно накладывается на проявление L-пятнистости, делая все пятна выпуклыми. Овариолы партеноклона разрезали на 2 и 3 части в разных опытах. Различия стали очевидны при разрезании овариолы на 2 части: проксимальную (концы овариол сходятся в апексе яичника) и дистальную, ближайшую к яйцеводу. В первом опыте потенциал развития яиц, оцениваемый по пигментации яиц (способности к активации) был выше в дистальной половине овариолы. (табл.1). Однако эмбриональная жизнеспособность, определяемая по вылуплению личинок из активированных яиц, оказалась выше в проксимальной половине овариолы, как и в случае трансплантационных клонов [5].

Таблица 1

Способность к термопартеногенезу зрелых ооцитов клона P5D в зависимости от их положения в овариоле.

Термопартеногенез	Часть овариолы (половина)	
	Проксимальная	Дистальная
Неоплодотворенные яйца, шт.	4067	4176
Активация (пигментация), %	84,8±3,6*	93,1±1,0*
Эмбриональная жизнеспособность, %	73,5±2,9**	48,0±4,6**

* – разница значима на уровне $p < 0,05$; ** – разница значима на уровне $p < 0,001$.

Сложный морфологический признак L-K имеет 100% пенетрантность и экспрессивность на II, III и V абдоминальных сегментах; на других сегментах (I, IV, VI, VII) его проявление варьирует; именно эти сегменты были выбраны для анализа. Максимальная пенетрантность и экспрессивность морфологического признака L-K на II и V абдоминальных сегментах, вероятно, является следствием участия в проявлении изучаемого признака еще одного гена, а именно, p^+ , определяющего самый обычный рисунок личинки: пара полулуний на II сегменте и пара звездчатых пятен на V сегменте, в котором под пятнами как раз и находится пара яичников.

Во втором опыте, с разрезанием овариол на 3 части установлено, что пенетрантность и экспрессивность изучаемого признака на I, IV, VI, VII

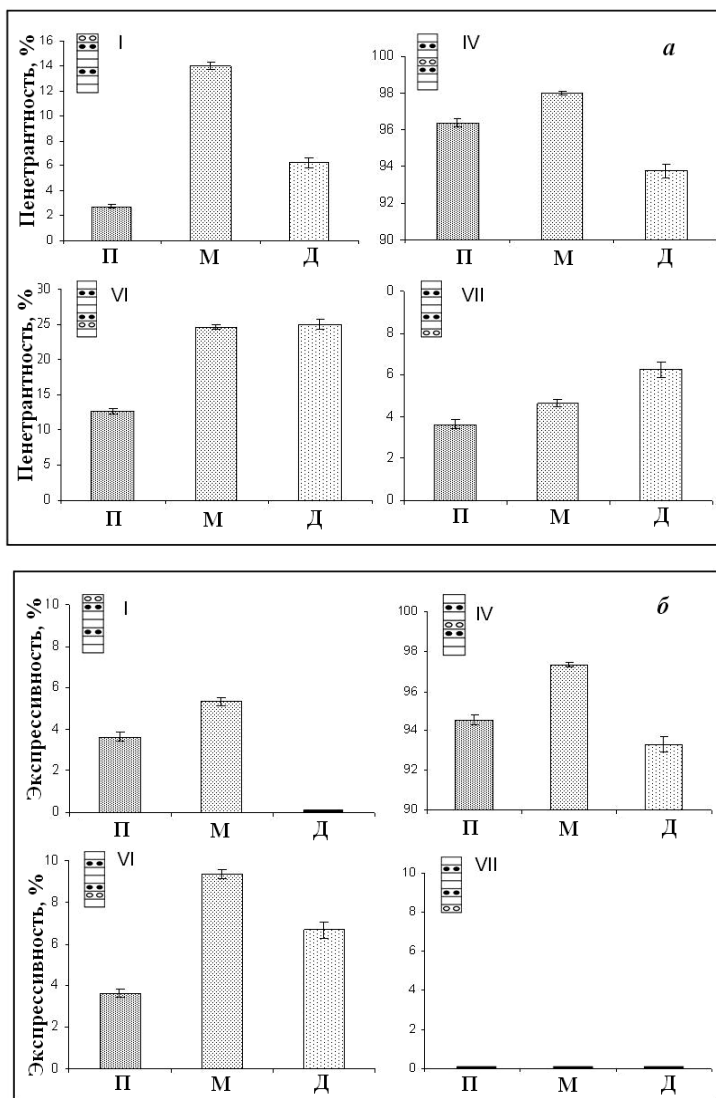


Рис.1. Пенетрантность (а) и экспрессивность (б) пятнистости (L-K) личинок на I, IV, VI и VII сегментах в зависимости от положения давших им начало зрелых ооцитов в овариолах материнского организма. (Изученный сегмент показан на вставках парой светлых кружков, П и V сегмент – черными кружками; P, M и D – проксимальный, медиальный и дистальный участки овариолы имаго).

сегментах личинки возрастают в проксимально-медиальном направлении овариолы, а на VI и VII сегментах (для пенетрантности) – в проксимально-медиально-дистальном (рис. 1). Кроме последнего случая, а также нулевой экспрессивности на VII сегменте и одинаковой пенетрантности на VI сегменте личинок из медиальной (М) и дистальной (Д) частей, оба показателя проявления изучаемого признака падают в медиально-дистальном направлении. Мы считаем, что объяснение этому следует искать во взаимодействии (наложении) факторов овариального проксимально-дистального градиента на возникающие в ходе эмбриогенеза градиенты экспрессии генов (L, p⁺), ответственных за формирование рисунка на дорзальной стороне личинки. Такое взаимодействие может как усиливать, так и ослаблять проявление генов рисунка в зависимости от уровня градиента в данном участке овариолы и рассматриваемого сегмента эмбриона. Кроме того, в пределах овариолы могут действовать два и более градиентов, некоторые из которых могут быть противоположно направленными и подавлять друг друга, как это показано в настоящей работе для партеноклонов, полученных обычным способом (табл. 1), и ранее – для трансплантационных клонов [5].

Выводы

Вариация фенотипа в клоне складывается из овогенетической изменчивости и онтогенетических шумов, которые после выделения овогенетической изменчивости следует отнести на более глубокий уровень. Диапазон овогенетической изменчивости зависит от стабильности изучаемого морфологического признака. Применительно к овариальному градиенту, различия столь существенны, что отражаются на жизнеспособности потомства и проявлении сложного морфологического признака. Таким образом, мы считаем, что установленный на трансплантационных кломах градуальный характер индивидуальной изменчивости фенотипического признака, определяемый положением в овариоле зрелых яиц, дающих начало особям с клона, имеет также место в кломах, получаемых обычным способом.

Литература

1. *Астауров Б.Л.* Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. // М.-Л.: Изд-во АН СССР. – 1940. – 240 с.
2. *Клименко В.В., Спиридонова Т.Л.* Мозаицизм при искусственном партеногенезе у тутового шелкопряда // XIV Международный генетический конгресс. Тез. докл. секц. засед. – 1978. – С. 259.
3. *Sturtevant A.H.* No crossing over in the female of the silkworm moth // Amer. Natur. – 1915. – Vol. 49. – P. 42-44.
4. *Клименко В.В., Забелина В.Ю., Лысенко Н.Г.* Внутриклональная изменчивость тутового шелкопряда // «Проблемы популяционной и общей генетики» (Матер. междунар. конф., 2011). – Москва: Цифровичок. – 2011. – С. 161-162.
5. *Zabelina V., Klymenko V.* Ovary transplantation in the silkworm *Bombyx mori* L.: parthenocloning by eggs produced in male recipient // Sericologia. – 2008. – Issue 48, № 2. – P. 123-128.

6. Клименко В.В., Воробьева Л.И., Шахбазов В.Г. Температурный контроль степени проявления морфологического признака в партеноклонах тутового шелкопряда // Доклады АН СССР.– 1980.– Т.252, № 3.– С. 732–735.

7. Струнников В.А. Третья изменчивость // Природа. – 1989. – №2. – С. 17-27.

8. Астауров Б.Л. Исследование наследственного изменения гальтеров у *Drosophila melanogaster* Schin. // Журн. эксперим. биол. Сер. А.– 1927. – Т.3, Вып. 1-2. – С.1-61.

Резюме

Получены результаты, показывающие наличие в онтогенетических шумах нестохастической компоненты, названной овогенетической изменчивостью.

Наведені результати, що демонструють наявність у онтогенетичних шумах закономірного компоненту, який названо овогенетичною мінливістю.

The results have been obtained that show that ontogenetic noise includes nonstochastic component considered as ovogenetic variability.

КЛИМЕНКО В.В., ПРОХОРОВА Е.А., ТИГУНЦОВА А.Е., ЛЯН ХАОЮАНЬ

Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина.

Украина 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: silkway@rambler.ru

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ ПАРТЕНОЗИГОТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Прогрев свежееосемененных яиц тутового шелкопряда в режиме термического партеногенеза (46°C, 18 мин) по Астаурову приводит к смешанному, партенозиготическому, развитию, в результате которого могут возникать в значительном количестве триплоиды; для последних обычная обополая репродукция становится проблематичной, а партеногенетическая репродукция открывает им выход на арену отбора: искусственного в экспериментальной селекции и естественного в природе, при мутационном происхождении партеногенеза у диплоидных форм (Клименко и др., 2011).

Дальнейшая репродуктивная судьба возникших внутри диплоидного обополого вида триплоидных партеногенетических форм частично может быть смоделирована на тутовом шелкопряде путем повторного приложени партеногенетической термоактивации к неоплодотворенным и свежееосеменным яйцам триплоидных самок. Помимо этого логичного продолжения в лабораторных условиях экспериментальной эволюции полиплоидных форм, существенный интерес представляет изучение механизмов полиплоидизации в соме и зародышевой линии партенозигот, что стало возможно благодаря достаточно простому методу определения пloidности клеток диапаузирующего зародыша путем подсчета зерен гетерохроматина в ядрах (Клименко, Лян, 2012). В диапаузе все клетки зародыша находятся в интерфазе в течение нескольких месяцев; это дает возможность оценить пло-

идность составляющих его клеток как результат имевших место процессов полиплоидизации независимо от механизмов, лежащих в их основе.

Материал и методы

Использовали грену от скрещивания партеноклона P50 (w_2 , ch, lem, p, a, Ng) с линией ge971 (re, ch⁺, Ze, a). Уникальность клона P50 состоит в том, что он гомозиготен по пяти рецессивным маркерам; линия ge971 (из коллекции лаборатории) характеризуется гомозиготностью по гену re и Ze. Описание указанных маркеров можно найти в классической литературе (Tazima, 1978). Для полиплоидизации свежееосеменных яиц использовали их прогрев в режиме термического партеногенеза по Астаурову (46°C, 18 мин), который был использован в предыдущей работе для получения триплоидов (Клименко и др., 2011).

Полученную в опытах грену в диапазоне анализировали цитологически. Для этого освобожденные от хориона яйца фиксировали смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1 и окрашивали ацетогематоксилином (Щегельская, Спиридонова, Клименко, 1986). Окрашенный зародыш вместе с краской помещали на часовое стекло и с помощью препаровальных игл разделяли на несколько частей, каждую из которых пипеткой переносили на предметное стекло и получали давленный препарат, накрывая перенесенную каплю покровным стеклом. Готовые препараты изучали под микроскопом и фотографировали. Фотоснимки переносили на компьютер и подсчитывали количество зерен хроматина в ядрах для определения плоидности клеток во взятой части зародыша (Лян, Клименко 2012).

Результаты и обсуждение

Получение полиплоидов путем прогрева свежееосеменной грены в режиме термопартеногенеза по Астаурову в настоящей работе доведено до тетраплоидов (табл. 1). Получение триплоидов от скрещивания диплоидных клонов, в которых всегда имеется незначительная примесь тетраплоидных яиц, с диплоидными самцами представлено верхней строкой таблицы; это так называемые зиготические триплоиды, давшие начало выведению тетраплоидной расы тутового шелкопряда (Астауров, 1968). Клоны P3nZZW, полученные прогревом с использованием приведенных в предыдущем разделе маркеров (Клименко и др., 2011), как и ожидалось, не все оказались триплоидными (13 из 15), что подтвердилось при цитологическом анализе диапаузирующего потомства от скрещивания их с диплоидными самцами: во второй строке таблицы триплоиды явно зиготические, а ожидавшиеся партенозиготы 4n не выявлены, следовательно клон был заложен от диплоидной самки. Когда полученное потомство скрестили с диплоидными самцами и отложенную грену прогрели, то в диапазоне были выявлены триплоидные и тетраплоидные зародыши (третья строка табл. 1); в отсутствие пентаплоидов это доказывает зиготическое происхождение тетраплоидных зародышей, подтверждаемое бурым цветом пигментированных яиц в слу-

чае экспрессии генотипа GFP: зародыши из 7 темных яиц были триплоидными, а из 8 бурых яиц 6 были триплоидными, а 2 гаплоидными. Последний случай является доказательством возможности гаплоидного андрогенетического развития до стадии диапаузирующего зародыша.

Таблица 1

Экспериментальное получение полиплоидов прогревом свежесеменной гены

Прогрев свежесеменной гены от скрещиваний	Уровни плоидности зародыша			
	2n	3n	4n	5n
P50 x re971 прогрев	+	+		
P3nZZW x C-5	+	+	+	
(P3nZZW x C-5) x GFP прогрев	+	+	+	+

+ – теоретически ожидаемые варианты плоидностей. Закрашенные ячейки – выявленные в работе варианты плоидностей

Партенозиготическое развитие, получаемое на тутовом шелкопряде как экспериментальной модели возникновения полиплоидов в природе, особенно интересно процессами полиплоидизации в соме и зародышевой линии эмбриона. Эти процессы были изучены с помощью маркеров и цитологическим методом на стадии диапаузы.

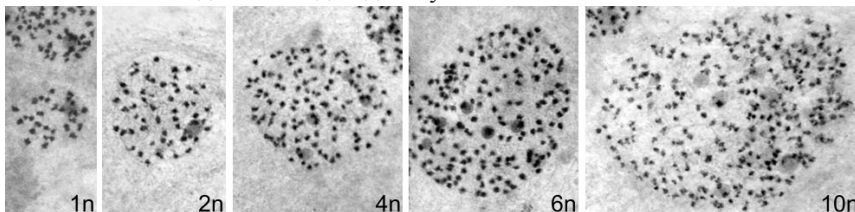


Рис. 1. Клетки разной плоидности зародышей

Таблица 2

Полиплоидизация клеток зародыша

Плоидность зародыша	Соматическая полиплоидизация											
	1n	2n	3n	4n	5n	6n	7n	8n	9n	10n	11n	12n
1n	+	+										
2n		+		+		+		+		+		+
2n/3n		+	+		+							
3n			+			+			+			+
4n				+				+				

Закрашенные ячейки – плоидности клеток, выявленные на цитологических препаратах 2n/3n – ди-триплоидные мозаики

Анализируя данные табл.2 можно предположить, что увеличение плодности клеток в соме происходит не только путем эндомитоза, но и в результате слияния ядер на ранних этапах эмбриогенеза, о чем свидетельствуют найденные в диплоидных зародышах 6n-, 10n- и 12n-ядра, а в триплоидных – 9n-ядра. Еще одним доказательством слияния ядер служит обнаруженное в 2n/3n-мозаиках пентаплоидное ядро.

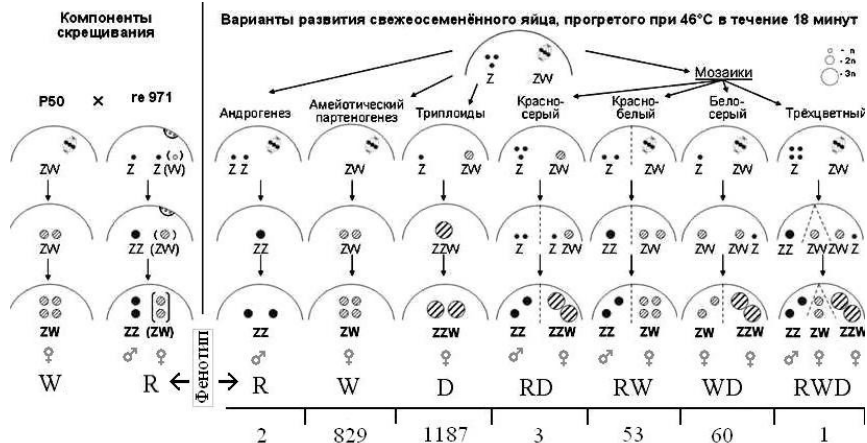


Рис. 2. Цитогенетические варианты развития, индуцированные тепловым шоком в свежесоменном яйце. Справа – репродукция компонентов скрещивания (амейотический партеногенез и нормальное зиготическое развитие). Слева, по порядку: андрогенез, амейотический партеногенез, кариогамия с образованием триплоида ZZW; далее мозаики, доказывающие возможность нескольких цитогенетических вариантов развития в одном яйце, в последнем случае три варианта. Указаны возможные формулы половых хромосом. Числа указывают количество яиц соответствующего варианта развития.

Разного рода мозаики, представленные на рис. 2, свидетельствуют о том, что в одном яйце может совмещаться несколько цитогенетических вариантов развития. На самом деле, доля яиц с мозаичным развитием, значительно выше выявленной, поскольку мозаицизм внутри яйца, т.е. среди клеток эмбриона и во внезародышевых клеточных образованиях, скрытых под серозной оболочкой, остается неучтенным при использованных маркерах. Андрогенез имеет место в том случае, когда в результате прогрева 46° 18 мин женское ядро исключается из развития и происходит слияние мужских пронуклеусов. Андрогенетический участок серозы яйца имеет красную пигментацию (R). Желтая пигментация (W) свидетельствует о партеногенетическом развитии яйца. В этом случае деления дробления претерпевает нередуцированное женское ядро (ZW). Триплоидные яйца имеют тёмную пигментацию (D) серозы. Триплоидность возникает в результате слияния

нередуцированного женского ядра (ZW) с гаплоидным мужским пронуклеусом (Клименко и др., 2011).

В полученной грене были обнаружены мозаики (рис.2). Мозаик с красно-серой пигментацией (RD) серозы может образоваться в результате слияния двух мужских пронуклеусов в одной части яйца и нередуцированного женского ядра с гаплоидным мужским пронуклеусом в другой его части. Образование красно-белого (RW) мозаика возможно при партеногенетическом и андрогенетическом варианте развития в разных частях яйца. При слиянии нередуцированного женского ядра с гаплоидным мужским пронуклеусом в одной части яйца и при партеногенетическом развитии другой части, образуется бело-серый мозаик (WD). Трехцветная пигментация (RWD) серозы свидетельствует об андрогенетическом, партеногенетическом и кариогамическом вариантах развития в разных частях яйца.

Выводы

При партенозиготическом развитии, как и при партеногенетическом, полиплоидизация клеток зародыша, выявляемая в диапаузе, происходит не только путем эндомитоза, но и через слияние ядер, вероятно, в период дробления.

Литература

1. *Астауров Б.Л.* Цитогенетика развития тутового шелкопряда и ее экспериментальный контроль. – Москва.: Наука, 1968. – 102с.
2. *Клименко В.В., Лян Хаююань* Хроматин в диапаузе тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.: термический партеногенез и нормальное развитие // *Цитология* – 2012. – Т.54. – №3. – С. 218-229.
3. *Клименко В.В., Лян Хаююань, Прохорова Е.А., Тигунцова А.Е.* Экспериментальные триплоиды тутового шелкопряда и происхождение естественной полиплоидии у бисексуальных животных // *Фактори експериментальної еволюції організмів.* – 2011. – Т.11. – С. 34-39.
4. *Щегельская Е. А., Спиридонова Т. Л., Клименко В. В.* Методы цитологического анализа профазы мейоза у тутового шелкопряда // *Известия АН Молдавской ССР. Серия биологических и химических наук.* – 1986. – №1. – С. 67-70.
5. *Tazima Y.* The silkworm: an important laboratory tool. – Tokyo: Kodansha Ltd. – 1978. – p. 308.

Резюме

С помощью генетических маркеров и цитологического метода изучена полиплоидизация клеток диапаузирующего эмбриона тутового шелкопряда. Показано, что в одном яйце может происходить одновременно несколько вариантов развития: кариогамический, партеногенетический и андрогенетический.

Using genetic markers and cytological methods polyploidization of silkworm diapausing embryo cells has been studied. Karyogamy, parthenogenesis and androgenesis can occur at the same time in the developing egg.

За допомогою генетичних маркерів і цитологічного методу вивчено поліплоїдизацію клітин ембріона у діапаузі шовковичного шовкопряда. Встановлено, що в одному яйці можуть відбуватися одночасно декілька варіантів розвитку: кариогамічний, партеногенетичний та андрогенетичний.

КОЗУБ Н.О.^{1,2}, СОЗІНОВ І.О.¹, СОЗІНОВ О.О.^{1,2}

¹Інститут захисту рослин НААН України,

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua

²ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАНУ»,

Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2а

ВПЛИВ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ ЗЕРЕН F₁ НА ЧАСТОТУ ПЕРЕДАЧІ ЖИТНЬОЇ 1BL/1RS ТРАНСЛОКАЦІЇ ЧЕРЕЗ ГАМЕТИ У М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Опромінення насінневого матеріалу гама променями представляє інтерес як джерело нової генетичної мінливості шляхом мутагенезу для селекції, як спосіб отримання матеріалу для генетичних досліджень, а також для вивчення процесів, які відбуваються в рослинах у відповідь на гама опромінення [1–5].

В дослідженнях наслідків опромінення зерна пшениці переважно аналізували частоту хромосомних аберацій, рівень проростання і виживання, зміну морфологічних та фізіологічних ознак, частоту видимих мутацій, при цьому матеріалом слугували сорти [1, 6–8]. Дослідження впливу радіації на розщеплення за маркерними локусами у гібридів пшениці практично не проводилось. Зручною моделлю для таких досліджень може бути матеріал з пшенично-житньою 1BL/1RS транслокацією. Житня 1BL/1RS транслокація на даний час є найпоширенішою чужинною транслокацією серед зерничних сортів м'якої пшениці [9]. Так, серед українських сортів зони Лісостепу частка сортів з цією інтрогресією, створених в останні 15 років, складає більше 40% [10]. Відомо, що ця транслокація характеризується зниженою частотою передачі через чоловічі гамети (приблизно, 40%) у гетерозигот за цією транслокацією [11]. В наших попередніх дослідженнях з використанням запасних білків як генетичних маркерів також виявлено зниження частоти передачі житньої транслокації і через жіночі гамети, хоча це зниження менш виражене [12]. Ймовірно, частота передачі житньої транслокації через гамети у гетерозигот може залежати від генотипу рослини, а також від абіотичних факторів – умов навколишнього середовища. Гамма-опромінення може бути використане як абіотичний фактор, що призводить до пригнічення показників фізіологічного стану рослин. Задачею нашого дослідження було вивчення впливу гама-опромінення гібридних зерен F₁, гетерозиготних за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації, на виживання рослин F₁, ознаки продуктивності та на частоту передачі цієї транслокації через гамети.

Матеріали і методи

В дослідженні використовували зерна F₁ від схрещення майже ізогенних ліній (МІЛ) озимої м'якої пшениці за гліадиновими локусами GLI-D1-4 x GLI-B1-3 на основі сорту Безоста 1 [13]. Вихідні лінії відрізняються лише за присутністю пшенично-житньої транслокації 1BL/1RS (її мар-

кером є гліадиновий алель *Gli-B11* [14]) та за гліадиновим локусом *Gli-D1* і мають наступні генотипи за маркерними локусами (позначення алелів за каталогом [14]): лінія GLI-B1-3: *Gli-B11 Gli-D1b*; лінія GLI-D1-4: *Gli-B1b Gli-D1j*. Сухі зерна F_1 в дослідному варіанті були опромінені гама-променями в дозі 200 Гр. Контрольні та опромінені зерна F_1 були висіяні на дослідній ділянці блоками з чергуванням рядів «контроль», «варіант з опроміненням зерен» широкорядним посівом. В 2005 р. висаджено 95 контрольних і 97 опромінених зерен (м. Київ, дослідна ділянка Інституту агроекології НААН), в 2006 р. – по 200 зерен кожного варіанту (с. Гатне, Київська обл.). Кожну рослину F_1 охарактеризовано за ознаками «кількість продуктивних стебел» та «маса зерна з рослини». Достовірність різниці оцінювали за критерієм Стьюдента. З кожної рослини F_1 проаналізовано 15–25 окремих зернівок F_2 електрофорезом гліадинів за методикою [12]. Проаналізовано 1762 окремих зерен F_2 контрольного варіанту та 1730 варіанту з дозою опромінення 200 Гр з рослин, зібраних в 2006 р; з рослин, вирощених в 2007 р., було проаналізовано 2399 та 2386 зерен, відповідно. Генотипи зернівок записували з врахуванням дози гена, яка дозволяє визначити генотип гамет, які сформували зернівку за локусами запасних білків: дві дози – генотип яйцеклітини, одна доза – пилкового зерна. Виживання рослин визначали як відношення кількості рослин F_1 до кількості висіяних зерен F_1 . Для аналізу розщеплень використовували критерій χ^2 .

Результати і обговорення

В 2006 році отримано 73 рослини F_1 від посіву 95 зерен в контролі і 81 рослину – від посіву 97 опромінених зерен. В 2007 році вирощено вирощено 135 рослин F_1 контрольного варіанту і 123 варіанту з опроміненням з 200 посіяних зерен в кожному варіанті. За показником виживання варіант з опроміненням та контрольний варіант достовірно не відрізнялись в обидва роки досліджень (табл. 1). Однак, рівень виживання у варіанті з опроміненням в умовах 2006-2007 р. був достовірно ($P < 0,001$) нижчий, ніж у 2005-2006 р., тоді як рівень виживання в контрольному варіанті в ці роки суттєво не відрізнявся. Отже, опромінення сухих зерен F_1 від схрещення ліній на основі сорту Безоста 1 дозою 200 Гр в не приводило до істотного зниження виживання рослин порівняно з контролем. Очевидно рівень виживання рослин M_1 (вирощених з опромінених зерен) пшениці залежить від ґрунтово-кліматичних умов, погодних умов і природи досліджуваного матеріалу. Так, опромінення зерна в дозі 200 Гр приводило до виживання 86% рослин від рівня у контролі у трьох пакистанських сортів м'якої пшениці [17]. Значно нижчі рівні виживання рослин M_1 , вирощених з опромінених дозою 200 Гр сухих зерен, отримано для ряду українських озимих сортів (від 8 до 56% від значення в контролі) [1, 7, 8].

Таблиця 1

Середні значення ознаки продуктивності та виживання (\pm стандартна похибка) рослин F_1 , вирощених з опромінених дозою 200 Гр та контрольних зерен

Рік	Варіант	Число продуктивних стебел з рослини	Маса зерна з рослини	Вживання рослин
2006	Контроль	8,36 \pm 0,44	12,69 \pm 0,93	0,768 \pm 0,043
	200 Гр	6,83 \pm 0,40*	9,50 \pm 0,65*	0,835 \pm 0,038
2007	Контроль	6,80 \pm 0,40	12,46 \pm 0,88	0,675 \pm 0,040
	200 Гр	4,89 \pm 0,32**	8,03 \pm 0,61**	0,615 \pm 0,044

Достовірно відрізняється від контролю при * $P < 0,01$, ** при $P < 0,001$

При відсутності впливу на рівень виживання рослин, опромінення зерен F_1 в дозі 200 Гр приводило до суттєвого зниження показників продуктивності рослин. В обидва роки досліджень рослини F_1 , вирощені з опромінених зерен, мали істотно менше значення числа продуктивних стебел та маси зерна з рослини, ніж у контрольному варіанті (табл. 1.). Слід відмітити, що популяції двох років значно відрізнялись за продуктивним кушенням ($P < 0,01$) як в у варіанті з опроміненням, так і в контролі, проте не відрізнялись за масою зерен з рослини. У 2006 р. значення ознак продуктивності у варіанті з 200 Гр становило 82% від значення в контролі для числа продуктивних стебел та 75% для маси зерна з рослини. В 2007 р. ці показники становили 72% і 64%, відповідно, для числа продуктивних стебел та маси зерна з рослини. Подібні рівні зниження певних ознак продуктивності при опроміненні дозою 200 Гр зафіксовано і для інших сортів [7, 8].

Розщеплення за локусом *Gli-B1* у зерен F_2 значно відрізнялось від співвідношення 1:1:1:1 ($P < 0,01$), та відповідало очікуваному за локусом *Gli-D1*. У рослин, вирощених в 2006 р., за локусом *Gli-B1* розщеплення за генотипами пилкових зерен, що сформували зерна F_2 (табл. 2), істотно не відрізнялись між контрольним та дослідним варіантами, тоді як за жіночими гаметами у варіанті з опроміненням дозою 200 Гр співвідношення гамет з аелями *Gli-B1b* та *Gli-B1l* достовірно відрізнялось від розщеплення в контролі ($\chi^2 = 5,0$, $P = 0,025$). У варіанті з опроміненням відносна чисельність жіночих гамет з хромосомою, що несе житню транслокацію 1BL/1RS (алель *Gli-B1l*) була менша. У рослин урожаю 2007 р., за локусом *Gli-B1* розщеплення за генотипами пилкових зерен з аелями *Gli-B1b* та *Gli-B1l*, що сформували зерна F_2 , істотно відрізнялись між контрольним варіантом та варіантом з опроміненням ($\chi^2 = 6,1$, $P < 0,025$), тоді як за жіночими гаметами співвідношення не відрізнялось. В обох варіантах спостерігалась знижена частота пилкових зерен з алелем *Gli-B1l*, проте у варіанті з опроміненням відносна чисельність таких гамет збільшувалась.

Порівняння співвідношень різних типів гамет в два роки, показало, що в популяції 2006 р. спостерігалась більша інтенсивність відбору проти гамет з житньою транслокацією на рослинах, вирощених з опромінених зе-

рен ($\chi^2 = 7,09$, $P < 0,01$ для пилкових зерен та $\chi^2 = 4,20$, $P < 0,05$ для яйцеклітин) ніж в умовах 2007 р., тоді як контрольні варіанти в ці роки між собою істотно не відрізнялись за цими співвідношеннями.

Таблиця 2

Розщеплення у гамет, що сформували зерна F_2 , за алелями локуса *Gli-B1*

Рік	Варіант	яйцеклітини			пилкові зерна		
		b	l	$\chi^2 1:1$	b	l	$\chi^2 1:1$
2006	Контроль	929	839	4,58*	1063	705	72,49**
	200 Гр	975	756	27,71**	1006	725	45,62**
2007	Контроль	1284	1115	11,91**	1379	1020	53,72**
	200 Гр	1267	1119	9,18**	1287	1099	14,81**
Сумарно за 2 роки	Контроль	2213	1954	16,10**	2442	1725	123,37**
	200 Гр	2242	1875	32,72**	2293	1824	53,43**

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Аналіз розщеплення в F_2 сумарно для двох років показав, що співвідношення пилкових зерен з різними генотипами за маркерним локусом *Gli-B1* у варіанті з опроміненням 200 Гр істотно відрізняється від співвідношення у контрольному варіанті ($\chi^2 = 7,1$, $P < 0,01$) за рахунок відносно-го збільшення частоти хромосоми з 1BL/1RS транслокацією, порівняно з контролем.

Отже, на рослинах, вирощених з опромінених зерен F_1 , які характеризувались істотно зниженим рівнем ознак продуктивності, нами вперше виявлено специфічний генетичний ефект: відмінності у відносній частоті пилкових зерен з житньою 1BL/1RS транслокацією, які взяли участь у формуванні зернівок F_2 , порівняно з контролем. Як і очікувалось, частка пилкових зерен з житньою 1BL/1RS транслокацією була зниженою, порівняно з часткою пилкових зерен без транслокації (маркер – алель *Gli-B1b*), як в досліді, так і в контролі. Однак опромінення сухих зерен F_1 , гетерозиготних за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації, дозою 200 Гр приводило до суттєвого відносного підвищення частоти пилкових зерен з цією транслокацією, які взяли участь у формуванні зернівок F_2 . Відхилення частоти маркерного алеля *Gli-B1l* від 0,5 при опроміненні 200 Гр зменшується на третину, порівняно з цим відхиленням у контролі. Можна припустити дві причини такого явища – опромінення приводить до 1) відносного зниження частоти утворення пилкових зерен без транслокації, або 2) підвищення рівня виживання чи конкурентоздатності пилкових зерен з даною транслокацією.

Література

1. Морсун В.В., Логвиненко В.Ф. Мутационная селекция пшеницы, –Киев: Наук. думка.– 1995.– 626 с.
2. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений.– Киев: Наук. думка.– 1989.– 384 с.
3. Mago R., Spielmeier W., Lawrence G.J., Ellis J.G., Pryor A.J. Resistance genes for stem rust (*SrR*) and barley powdery mildew (*Mla*) are located in syntenic regions on short arm of chromosome // *Genome*.– 2004.– vol. 47.– P. 112–121.
4. Kalavacharla V., Hossain K., Gu Y., Riera-Lizarazu O. et al. High-resolution radiation map of wheat chromosome D // *Genetics*.– 2006.– vol. 173.– P. 1080– 1099.
5. Ahloowalia B.S., Maluszynski M., Nichterlein K. Global impact of mutation-derived varieties // *Euphytica*.– 2004.– vol. 135.– P. 187–204.
6. Клименко Я.В., Ларченко К.А. Частота хромосомних аберацій озимої пшениці, індукованих мутагенами при дії на насіння та проростки // *Физиология и биохимия культ. растений*.– 2006.– том 38, № 3.– С. 222– 227.
7. Назаренко М.М. Вживаність і структура врожайності як показники мутагенної депресії у першому поколінні мутантів сортів озимої м'якої пшениці // *Физиология и биохимия культурных растений*.– 2007.– том 39, № 5.– С. 438–446.
8. Оксьом В.П. Вплив мутагенних чинників на рослини M_1 озимої пшениці та його зв'язок із частотою змінених форм у другому поколінні // *Физиология и биохимия культурных растений*.– 2010.– том 42, № 5.– С. 153–162.
9. Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L.// *Euphytica*.– 1998.– vol. 100.– P.323–340.
10. Kozub N.A., Sozinov I.A., Sobko T.A., et al. Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine// *Цитология и генетика*.– 2009.– vol. 43, № 1.– С. 69–77.
11. Rayburn L.A., Mornhinweg D.W. Inheritance of a 1BL/1RS wheat-rye translocated chromosome in wheat// *Crop Sci*.– 1988.– vol. 28.– P. 709–711.
12. Козуб Н.А., Созинов І.А., Созинов А.А. Особенности передачи ржаных транслокаций 1AL/1RS и 1BL/1RS через гаметы у гибридов мягкой пшеницы// *Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр./ Укр. тов.-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова/ К.: Логос, 2008.– Т. 4.– С. 163–168.*
13. Конусь М.М. О естественной геногеографии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы// *Селекция и семеноводство*.- 1994.– N 5, С. 9–14.
14. Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. II Catalogue of gliadin alleles in common wheat// *J. Genet. Breed*.– 1991.– vol. 45.– P. 325–344.
15. Irfaq M., Nawab K. Effect of gamma irradiation on some morphological characteristics of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // *OnLine Journal of Biological Sciences*.– 2001.– vol. 1 (10).– P. 935–937.

Резюме

Опромінення сухих зерен F_1 , гетерозиготних за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації, гамма-променями в дозі 200 Гр не впливало на виживання рослин F_1 , проте значно знижувало показники продуктивності рослин. У варіанті з опроміненням виявлено суттєве відносе підвищення частоти пилоквих зерен з 1BL/1RS транслокацією, які взяли участь у формуванні зернівок F_2 , порівняно з контролем.

Облучение сухих зерен F_1 , гетерозиготных по присутствию ржаной 1BL/1RS транслокации, гамма-лучами в дозе 200 Гр не влияло на выживаемость растений F_1 ,

но значимо знижало показателі продуктивності рослин. Для варіанта с облучением обнаружено достоверное относительное увеличение частоты пыльцевых зерен с 1BL/1RS транслокацией, которые приняли участие у формировании зерен F₂, по сравнению с контролем.

Irradiation with gamma-rays (200 Gy) of dry F₁ seeds heterozygous for the presence of the rye 1BL/1RS translocation did not affect the survival of F₁ plants but markedly reduced indices of plant productivity. In the variant with irradiation, a significant relative increase in the frequency of pollen grains with the 1BL/1RS translocation that formed F₂ seeds in comparison with the control was detected.

КОЛЕСНИК О. О.¹, ЧЕБОТАР С. В.¹, ХОХЛОВ О. М.², ЦЕВМА В. М.², СИВОЛАП Ю. М.¹

¹ Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України
Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна

² Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України (СГІ-НЦНС) Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна

E-mail: sabina-chebotar@rambler.ru

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ОПИСУ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ СОРТІВ ПШЕНИЦІ

У Державному реєстрі сортів рослин, придатних для поширення в Україні в 2012 р., зареєстровано 247 сортів озимої м'якої пшениці, серед яких сортів, що в перший раз занесено до реєстру — чотири [2]. Рішення про занесення до реєстру приймається за результатами вивчення господарської придатності сортів-кандидатів (агрономічні, біологічні властивості, показники екологічної безпеки) та при їх відповідності принципам відмінності — хоча б за однією ознакою, однорідності та стабільності ознак у просторі та часі (ВОС-тест) [3,4]. Відповідно до рекомендацій ВОС для опису та ідентифікації визначають 35 ознак, серед яких морфологічні ознаки паростків, стебла з листками, колоса, зернівки, габітусу рослини та типу розвитку, тобто ті ознаки, які порівняно легко можна визначити візуально [7]. У той же час, використання морфологічних ознак має ряд недоліків, серед яких: лімітована кількість, залежність прояву від умов навколишнього середовища, для багатьох ознак може втручатися суб'єктивність оцінки. Для подібних ситуацій, та на перспективу УПОВ (Міжнародна організація із захисту прав на нові сорти рослин) рекомендовано використання молекулярних маркерів, а саме рекомендованого набору з 8-ми мікросателітних маркерів (МС-маркерів) для пшениці [8]. Як показали наші попередні дослідження, аналіз мікросателітних локусів (МС-локусів) дозволяє оцінити генетичну різноманітність українських сортів озимої пшениці й проводити моніторинг спрямованості селекційного процесу, що відбувається на молекулярному рівні в генофонді вітчизняних сортів [6].

Мета даної роботи полягала у характеристиці нових сортів озимої м'якої пшениці за низкою агрономічних ознак, морфометричними параметрами зерна, оціненими за їх цифровим зображенням удосконаленим нами методом [10-12] та у співставленні цих результатів з характеристикою досліджених сортів за мікросателітним аналізом (МС-аналізом).

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугувало насіння сучасних сортів озимої м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) селекції СГІ—НЦНС, що були зареєстровані в Державному реєстрі у 2003 – 2009 роках й занесені до переліку сортів, перспективних для вирощування в 2008 – 2009 роках [1], та контрольні сорти: Альбатрос одеський і два колекційних зразки сорту Безоста 1. Насіння, надане селекційними підрозділами СГІ—НЦНС, було висіяно в полі ділянками, за близьких умов середовища як демонстраційний дослід 2010 р. Від кожного сорту рендомізованим способом було взято по 5 колосів для мікросателітного аналізу (МС-аналізу), з них 2-3 було використано для подальшого розмноження за схемою «колос-ряд». У поточному році потомство останніх (зерно) було проаналізовано за низкою морфометричних та колориметричних характеристик оптичними методами за цифровими зображеннями зернівок. Для аналізу були також залучені результати польових оцінок скоростиглості (за датою колосіння), висоти рослин, візуальних характеристик кольору, величини та щільності колоса.

Комп'ютерний аналіз розмірів та пропорцій зернівок проводили, вимірюючи по 100 зернівок кожного сорту, за допомогою комп'ютерної програми ImageJ 1.41 (National Institute of Health, США). Зерна сканували на приладі HP 3570с, зображення знімали на темному фоні, з розділенням 200 dpi (пікселів/дюйм), як рекомендовано [11]. Програма використовує автоматичний пошук і морфометричний аналіз окремих об'єктів на цифровому знімку [10]. Виконавши попередньо калібровку за стандартними об'єктами, можна отримати результати безпосередньо у «натуральних» одиницях розміру [5]. Визначали такі параметри (П) зернівки, як: площа проекції зернівки на площину (S_z), довжина (l_z) та ширина (d_z), периметр (P_z), округлість зерна (C_z), інтенсивність кольору (M_z), а також відношення ширини зерен до довжини (d/l). Показник округлості зерна визначали за формулою: $C_z = 400l * S_z / P_z^2$, де S_z — площа проекції зерна на площину, P_z — периметр зернівки. Статистичну обробку рядів даних здійснювали у програмі Excel інструментами обчислення параметрів варіаційної статистики. Дисперсійний аналіз даних проводили, використовуючи процедуру GLM (генеральна лінійна модель) із спеціалізованого програмного комплексу AGROBASE 21 (Agronomics Software Inc., Канада) за 3-факторною схемою (сорт-польові повторення-лабораторні повторення). При цьому використано систему позначення груп достовірності літерами. Кластерний аналіз за морфометричними параметрами проводили у програмі Statistica.

Результати та обговорення

Морфометричні параметри зразків по 100 зернівок (1, 2, 3) досліджених сортів озимої м'якої пшениці наведено в табл. 1. За параметром площі виділено 20 груп достовірності (ГД), позначених різними літерами; за показником інтенсивності кольору зерна – 25 ГД; за довжиною зерна – 12 ГД; за шириною зерна – 6 ГД; за округлістю зерна – 8 ГД; за параметром периметру зернівки – 21 ГД; за показником d/l – 10 ГД.

Проведено кластерний аналіз, що включав 14 морфометричних та колориметричних параметрів зерна, 4 візуальних характеристик колоса, дату колосіння та висоту рослин. При кластерному аналізі досліджених сортів на дендрограмі виявлено два великі кластери. На рисунку 1 показано дендрограму, побудовану за алгоритмом Ward [10] для 20 вказаних вище показників, виражених у відносних величинах. Звертає увагу те, що за розподілом сортів вона має певні відповідності до дендрограми, побудованої за результатами дослідження 11 МС-локусів (неопубліковані дані). Остання розділяє сорти на два близькі за розмірами кластери: А (включаючи сорти Безоста 1, Альбатрос одеський, Косовиця, Антонівка, Скарбниця, Оксана, Пошана, Господиня, Куяльник, Кірія, Дальницька, Ліона, Бунчук, Благодарка одеська, Місія одеська, Заможність) та В (включаючи сорти Зміна, Довіра, Годувальниця одеська, Істина одеська, Красень, Отаман, Єдність, Заграва одеська, Епоха одеська, Литанівка, Служниця одеська, Запорука, Подяка), тоді як наведена дендрограма – також на два кластери, де перший кластер ділиться на два субкластери 1а та 1в, та другий кластер (2), що включає сорти Дальницька, Годувальниця одеська, Служниця одеська, Єдність, Литанівка, Безоста 1. Виявилось, що у кластері 1а співвідношення сортів, що локалізуються в кластерах А та В дендрограми, яка отримана за МС-аналізом, становить 7:2, у кластері 1в – 7:7, а у кластері 2 – 2:4. Різниця у кількостях сортів, що належали до різних кластерів А та В за дендрограмою, побудованою за МС-аналізом, в кластерах 1а та 2 статистично достовірна за критерієм χ^2 -квадрат (6,9; $p=0,0088$), що вказує на можливі асоціації між МС-локусами та морфологією.

Висновки. За результатами дисперсійного аналізу морфометричні характеристики зразків зерна дають можливість розподілити наявний діапазон сортової мінливості на 5-10 груп, що достовірно різняться за величиною НІР, а взяті у сукупності – на декілька десятків. Це свідчить про здатність системи за рахунок одночасної оцінки низки відносно незалежних параметрів (розміру, конфігурації та колориметричних характеристик зерен) загалом створювати велику базу даних для диференціації сортів за морфометричними параметрами зерна та більш складними алгоритмами досліджень, такими як багатовимірна статистика. Виявлені асоціації між МС-локусами та морфометричними, колориметричними характеристиками зерен й агрономічними ознаками рослин можуть відкрити можливість дослідження генетичної структури господарських ознак, з якими звичайно

Характеристика сортів за параметрами* розміру, форми та кольору зерна

№	Сорт	S ₃ , мм ²		M ₃		l ₃ , мм		d ₃ , мм		C ₃		P ₃ , мм		d/l			
		П	ГД	П	ГД	П	ГД	П	ГД	П	ГД	П	ГД	П	ГД	П	ГД
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
1	Господина (1)	16,4	cdefg	139,1	de	6,8	cd	3,1	d	71	fg	17,0	efgh	0,46	fg		
2	Господина (2)	16,6	cde	135,6	fghijk	6,7	de	3,1	d	73	de	16,9	fghi	0,47	ef		
3	Скарбниця (1)	15,7	hijklm	141,7	bcd	6,5	fg	3,1	d	74	cd	16,4	klmn	0,48	de		
4	Скарбниця (2)	15,6	hijklmn	139,2	cde	6,6	ef	3,0	e	73	de	16,4	klmn	0,46	fg		
5	Косовиця (1)	17,8	a	131,8	opqrstuv	7,0	ab	3,2	c	72	ef	17,6	ab	0,46	fg		
6	Косовиця (2)	17,6	ab	133,1	klmnopqr	7,1	a	3,1	d	70	gh	17,7	a	0,44	hi		
7	Ангонівка (1)	17,6	ab	133,1	klmnopqr	6,8	cd	3,3	b	74	cd	17,3	bcde	0,48	de		
8	Ангонівка (2)	17,0	bc	131,5	opqrstuv	6,7	de	3,3	b	74	cd	17,0	efgh	0,49	cd		
9	Заможність (1)	14,7	qrs	135,9	fghij	6,4	gh	2,9	f	71	fg	16,1	nopq	0,45	gh		
10	Заможність (2)	16,1	defghi	134,0	hijklmn	6,7	de	3,1	d	71	fg	16,9	fghi	0,45	gh		
11	Благодарка одеська (1)	16,7	cd	131,3	opqrstuv	6,6	ef	3,2	c	74	cd	16,8	ghij	0,48	de		
12	Благодарка одеська (2)	17,6	ab	128,3	wx	6,8	cd	3,3	b	74	cd	17,3	bcde	0,48	de		
13	Місія одеська (1)	15,9	fghijk	129,2	vwxyz	6,4	gh	3,1	d	74	cd	16,4	klmn	0,48	de		
14	Місія одеська (2)	16,7	cd	132,2	opqrst	6,8	cd	3,1	d	73	de	17,0	efgh	0,47	ef		
15	Дальницька (1)	14,8	pqrst	132,8	lmnopqr	6,0	kl	3,1	d	76	ab	15,6	st	0,51	ab		
16	Дальницька (2)	16,0	efghij	137,3	efg	6,4	gh	3,2	c	75	bc	16,3	lmno	0,49	cd		
17	Дальницька (3)	16,2	defgh	131,1	qrstuv	6,4	gh	3,2	c	75	bc	16,4	klmn	0,49	cd		
18	Єдність (1)	14,2	st	139,1	de	5,9	i	3,0	e	76	ab	15,2	u	0,52	a		
19	Єдність (2)	14,7	qrs	141,9	b	6,0	kl	3,1	d	77	a	15,5	tu	0,52	a		
20	Кірія (1)	16,4	cdefg	133,6	ijklmnopq	6,5	fg	3,2	c	75	bc	16,6	ijkl	0,50	bc		

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
21	Кірія (2)	16,7	cd	132,1	nopqrstu	6,6	ef	3,2	c	74	cd	16,8	ghij	0,48	de
22	Ліона (1)	14,7	qrs	127,9	x	6,2	ij	3,0	e	74	cd	15,8	qrst	0,49	cd
23	Ліона (2)	15,5	ijklmno	130,8	rstuvw	6,6	ef	3,0	e	71	fg	16,5	ijklm	0,45	gh
24	Ліона (3)	14,4	rst	134,9	ghijklm	6,3	hi	2,9	f	73	de	15,8	qrst	0,47	ef
25	Кузальник (1)	15,6	hijklmn	136,3	fgh	6,5	fg	3,1	d	74	cd	16,3	lmno	0,48	de
26	Кузальник (2)	15,5	ijklmno	135,3	fghijkl	6,5	fg	3,0	e	73	de	16,4	klmn	0,46	fg
27	Кузальник (3)	14,9	opqr	133,9	hijklmno	6,3	hi	3,0	e	74	cd	15,8	qrst	0,48	de
28	Пошана (1)	16,1	defghi	134,0	hijklmn	6,7	de	3,1	d	71	fg	16,8	ghij	0,46	fg
29	Пошана (2)	16,5	cdef	132,7	lmnopqr	6,9	bc	3,0	e	70	gh	17,2	cdef	0,43	ij
30	Пошана (3)	16,6	cde	133,8	hijklmnop	6,9	bc	3,0	e	70	gh	17,2	cdef	0,44	hi
31	Запорука	16,7	cd	147,9	a	7,1	a	3,0	e	69	h	17,5	abc	0,42	j
32	Бунчук (1)	15,1	mnpqr	132,2	nopqrst	6,5	fg	3,0	e	71	fg	16,3	lmno	0,46	fg
33	Бунчук (2)	15,3	klmnopq	129,8	tuvwxyz	6,4	gh	3,1	d	73	de	16,2	mnpq	0,48	de
34	Подяка (1)	14,8	pqrst	130,0	stuvw	6,1	jk	3,1	d	75	bc	15,7	rst	0,50	bc
35	Подяка (2)	15,5	ijklmno	129,7	tuvwxyz	6,6	ef	3,0	e	72	ef	16,5	ijklm	0,46	fg
36	Оксана	14,0	t	137,6	ef	6,3	hi	2,9	f	72	ef	15,6	st	0,46	fg
37	Заграва одесь- ка (1)	15,3	klmnopq	135,3	fghijkl	6,4	gh	3,0	e	73	de	16,2	mnpq	0,47	ef
38	Заграва одесь- ка (2)	15,1	mnpqr	129,8	tuvwxyz	6,3	hi	3,1	d	74	cd	16,0	opqr	0,48	de
39	Заграва одесь- ка (3)	14,9	opqr	134,0	hijklmn	6,3	hi	3,0	e	73	de	16,0	opqr	0,47	ef
40	Епоха одесь- ка (1)	15,7	hijklm	129,7	tuvwxyz	6,6	ef	3,0	e	72	ef	16,5	ijklm	0,46	fg

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
41	Епоха одесь- ка (2)	16,6	cde	129,9	stuvwx	6,6	ef	3,2	c	75	bc	16,7	hijk	0,50	bc
42	Литанівка (1)	15,2	lmnopq	131,0	qrstuv	6,2	ij	3,1	d	76	ab	15,8	qrst	0,51	ab
43	Литанівка (2)	15,5	ijklmno	125,1	y	6,3	hi	3,1	d	75	bc	16,1	nopq	0,49	cd
44	Служниця одесь- ка (3)	15,9	fghijk	133,5	ijklmnopq	6,4	gh	3,1	d	75	bc	16,3	lmno	0,49	cd
45	Годувальниця одеська (1)	15,0	nopqr	136,2	fghi	6,3	hi	3,0	e	75	bc	15,9	pqrs	0,48	de
46	Годувальниця одеська (2)	15,9	fghijk	131,3	opqrstuv	6,4	gh	3,2	c	75	bc	16,3	lmno	0,49	cd
47	Істина одесь- ка (1)	16,0	efghij	132,8	lmnopqr	6,5	fg	3,1	d	74	cd	16,5	jklm	0,47	ef
48	Істина одесь- ка (2)	15,7	hijklm	136,7	efg	6,4	gh	3,2	c	75	bc	16,2	mnop	0,50	bc
49	Зміна (1)	15,6	hijklmn	141,8	bc	6,7	de	2,9	f	71	fg	16,6	ijkl	0,44	hi
50	Зміна (2)	15,3	klmnopq	142,3	b	6,7	de	2,9	f	70	gh	16,6	ijkl	0,43	ij
51	Довіра	17,5	ab	129,8	tuvwxyz	6,9	bc	3,2	c	72	ef	17,4	abcd	0,47	ef
52	Красень (1)	15,5	ijklmno	137,4	efg	6,4	gh	3,1	d	74	cd	16,2	mnop	0,48	de
53	Красень (2)	15,3	klmnopq	137,2	efg	6,4	gh	3,1	d	74	cd	16,1	nopq	0,48	de
54	Отаман (1)	15,8	ghijkl	129,5	uvwxyz	6,7	de	3,0	e	71	fg	16,6	ijkl	0,45	gh
55	Отаман (2)	15,4	ijklmnop	131,1	qrstuv	6,6	ef	3,0	e	71	fg	16,5	jklm	0,45	gh
56	Альбатрос одеський (1)	15,9	fghijk	131,2	pqrstuv	6,4	gh	3,1	d	74	cd	16,3	lmno	0,48	de
57	Альбатрос одеський (2)	15,9	fghijk	132,5	mnpqrstu	6,4	gh	3,1	d	74	cd	16,4	klmn	0,49	cd

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
58	Альбагрос одеський (3)	15,6	hijklmn	132,5	mnpqrqs	6,5	fg	3,1	d	73	de	16,3	lmno	0,47	ef
59	Безоста 1 (1)	17,7	a	124,0	y	6,6	ef	3,4	a	76	ab	17,2	cdef	0,52	a
60	Безоста 1 (2)	17,4	ab	123,3	y	6,6	ef	3,4	a	75	bc	17,1	defg	0,51	ab
	<i>Статистика**</i>														
	ГС	15,85	-	133,47	-	6,51	-	3,08	-	73,1	-	16,46	-	0,474	-
	НР _{0,5}	0,67	-	2,62	-	0,17	-	0,09	-	0,12	-	0,37	-	0,016	-
	max	17,9	-	148,2	-	7,2	-	3,4	-	77	-	17,8	-	0,52	-
	min	14,1	-	123,3	-	5,9	-	2,9	-	68	-	15,2	-	0,41	-
	РЗ	5,7	-	9,5	-	7,6	-	6,4	-	6,9	-	7,0	-	6,3	-

Примітки. * — Параметри зерна (П); S3 — площа проекції зерна на площину; M3 — інтенсивність кольору зернівок; Із — довжина зерна; d3 — ширина зерна; С3 — округлість зерна; Р3 — периметр зернівок;

** — ГС — генеральне середнє; НР_{0,5} — найменша істотна різниця; max — максимальне значення показника; min — мінімальне значення показника; РЗ — роздільна здатність, яка відображає співвідношення діапазону мінливості до НР

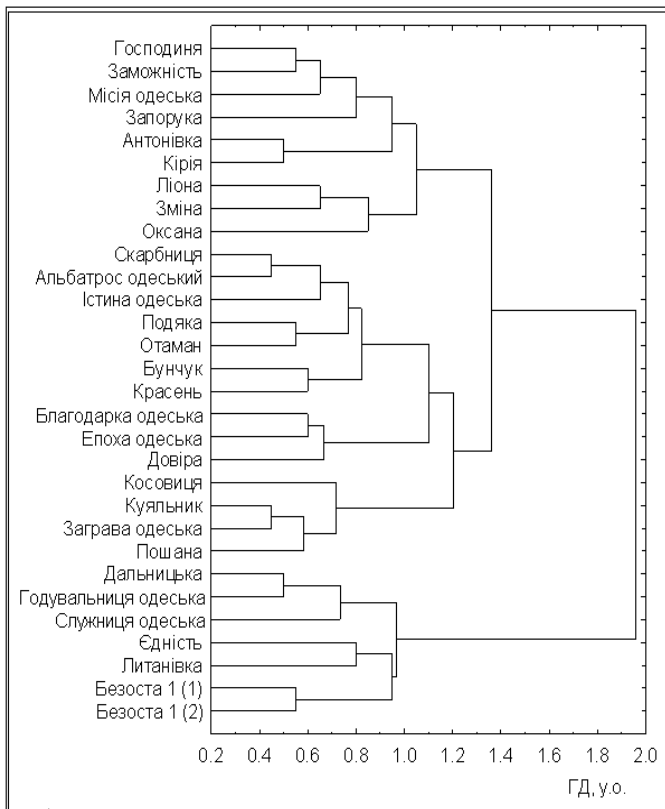


Рис. 1. Кластерний аналіз сортів пшениці, розрахований за алгоритмом UPGMA за сукупністю агрономічних ознак рослин, морфометричних та колориметричних характеристик зерен

оперує селекція. В значній мірі інформація, отримана двома групами методів, є незалежною, тобто з точки зору характеристики та опису матеріалу молекулярні та традиційні методи опису за морфологічними ознаками доповнюють одна одну.

Література

1. Державний реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні у 2010 році: офіційне видання. – К.: ТОВ «Алефа», 2010. – 262 с.
2. Державний реєстр сортів рослин, придатних для поширення в Україні у 2012 році: офіційне видання. – К.: ТОВ «Алефа», 2012. – 290 с.
3. Орлюк, А. П. Генетичні маркери пшениці. / А. П. Орлюк, О. М. Гончар, Л. О. Усик. – Київ, 2006. – 144 с.

4. Улич Л.І. Ідентифікація генотипів пшениці м'якої за висотою рослин при експертизі на ВОС та її вплив на стійкість до вилягання і врожайність // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. – 2011. – № 1. – С. 46-51.

5. Чеботар Г., Чеботар С., Хохлов О., Моцний І., Сиволан Ю. Характеристика за морфометричними параметрами зернівки ліній-аналогів м'якої пшениці, що різняться алелями генів короткостебловості // Вісник Львів. ун-ту Серія біологічна. – 2009. – № 51. – С. 49-54.

6. Чеботар С. В. Молекулярно-генетичний поліморфізм українських сортів озимої м'якої пшениці // Зб. наук. праць СГП. – 2011. – № 17 (57). – С. 17-29.

7. Шелепов, В. В. Морфология, биология, хозяйственная ценность пшеницы. / В. В. Шелепов и др. – Мироновка, 2004. – 524 с.

8. UPOV. Possible use of molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS). BMT/DUS/1 Draft 6. – 2011-10-03.

9. Ward, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function // J. Am. Statist. Assoc. – 1963. – Vol. 58. – P. 236-244.

10. Хохлов О.М. Застосування програми аналізу зображень ImageJ в дослідженнях об'єктів сортовивчення// Виноградарство і виноробство. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Спец.випуск. Одеса. – 2009. – С.179-185.

11. Цевма В.М., Хохлов О.М. Морфометрична характеристика зерен пшениці засобами „машинного бачення» // Зб. наук. праць СГП. – 2009. – № 14 (54). – С.182-189

12. Коруняк О.П., Цевма В.М., Хохлов О.М. Морфометрична та колориметрична характеристика зерен ячменю за їхніми цифровими зображеннями // Зб. наук. праць СГП. – 2011. – № 17 (57). – С.143-150

Резюме

Проведено дисперсійний аналіз за низкою агрономічних ознак, морфометричними параметрами зерна сортів озимої м'якої пшениці та побудовано дендрограму за сукупністю ознак рослин, морфометричних і колориметричних характеристик зерен. Показана досить висока диференційна здатність кожного з використаних методів за умови походження матеріалу з одного експерименту.

Проведен дисперсионный анализ по ряду агрономических признаков, морфометрических параметров зерна выборки сортов озимой мягкой пшеницы и построена дендрограмма по совокупности признаков растений, морфометрических и колориметрических характеристик зерна. Показана достаточно высокая дифференцирующая способность каждого из использованных методов при условии происхождения материала из одного эксперимента.

The analysis of variance by the agronomic traits and morphometric parameters of grain size, form and color of new winter wheat varieties has been conducted and the dendrogram by the total plant characteristics, morphometric and colorimetric characteristics of the grains has been built. There has been shown a relatively high separation ability of each of the applied methods if the provided material was grown in the same experiment.

КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., БУЦЕНКО Л.М.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: julyja@i.ua
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного,
Україна, Київ ДСП, вул. Заболотного, 154, e-mail: plant_path@ukr.net*

ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ РОСЛИН ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

Стабільність клітинних функцій залежить від біологічної активності мембран клітин. Мембрана відповідає за виконання захисної і багатьох інших функцій, пов'язаних з забезпеченням міжклітинних контактів і взаємодією клітини із зовнішнім середовищем, а також здійснює регуляцію клітинного метаболізму. За хімічною природою клітинна мембрана – це бішарова структура, яка складається із ліпідних молекул з включенням гідрофобних білків. Ліпідам відводиться досить важлива роль в формуванні біологічних мембран. Взаємодія ліпідів між собою і з молекулами білка забезпечує мембранам достатню міцність. Від складу і співвідношення ліпідів суттєво залежить стабільність мембранного бішару [7, 11]. Ліпіди виконують запасаючу, ізолюючу і захисну функції, є переносниками деяких вітамінів, регуляторами транспорту води і солей та регуляторами активності ферментів, передатчиками біологічних сигналів. Вони забезпечують існування організмів в стресових умовах [9].

Функціональна активність і фізико-хімічні властивості ліпідів залежать від складу жирних кислот. Від ступеня ненасиченості жирнокислотних радикалів залежить рухливість, текучість ліпідного бішару мембран [1, 2].

Адаптаційні властивості рослин багато дослідників пов'язують з особливостями складу та метаболізму ліпідних компонентів мембран [8, 10]. Ліпіди є досить лабільними компонентами мембран рослинної клітини в силу своїх хімічних властивостей і структури. Вплив факторів середовища зумовлює зміни рівня ненасиченості жирних кислот та довжини їхніх ацильних ланцюгів, молекулярних різноманітностей ліпідів, індукцію синтезу ферментів, які беруть участь у процесах адаптації стійких рослин або розщепленні ліпідів у чутливих видів, підвищення пероксидації насичених жирних кислот [9]. Швидкість перебудови ліпідів визначається наявністю подвійних зв'язків, з чим пов'язане пристосування рослин до дії стресових факторів [6].

Вивчення складу жирних кислот ліпідів може дати багато корисної інформації для розуміння процесів адаптації рослин до біогенних та абіогенних стресів. Однак, при визначенні жирнокислотного складу ліпідів зелених тканин рослин дослідники стикаються з проблемою ефективного розділення ліпідів та хлорофілів.

Метою нашої роботи було розроблення підходів до визначення жирних кислот ліпідів, отриманих із зелених тканин рослин на прикладі цукрових буряків.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були пробірочні рослини цукрових буряків триплоїдних гібридів Перла, Олександрія. Рослини-регенеранти вирощували із апікальних меристем на середовищі Мурасіге – Скуга [13], доповненому 2 мг/л індолілмасляною кислотою + 0,05 мг/л 6-бензиламінопурином + 2,5 мг/л гібереловою кислотою, при температурі +25°C освітленні 4 клк і 16-ти годинному фотоперіоді [5].

Із зелених тканин рослин ліпіди екстрагували 2 мл ізопропілового спирту, потім суспендували в 4 мл суміші хлороформ – метанол (1:2) і екстрагували протягом 3 годин збовтуючи на качалці при температурі 20°C, потім центрифугували при 2 тис.об/хв протягом 30 хв. Надосадову рідину зливали, до осаду додавали 5 мл суміші хлороформ – метанол – вода (1:2:0,8) і екстрагували протягом години збовтуючи на качалці при температурі 20°C, потім центрифугували за тих же умов. Надосадові рідини об'єднували, додавали по 2,5 мл води і хлороформу, потім центрифугували при 2 тис.об/хв протягом 40 хв. Після цього збирали хлороформний шар та висушували його на вакуумному роторному випарювачі [4].

Жирнокислотний склад ліпідів зелених тканин вивчали методом газорідинної хроматографії їхніх метилових ефірів [3, 12]. Для одержання метилових ефірів жирних кислот висушені ліпіди суспендували в 5 мл метанолу, що містив 1,5% H₂SO₄. Метилування здійснювали в запаяних ампулах при 80°C протягом 1 год. Метиллові ефіри жирних кислот екстрагували 3 мл суміші ефір-гексан (1:1). Проби перемішували 3 хв, після їхнього розшарування відбирали верхню фракцію, яка містить метиллові ефіри жирних кислот. Екстракцію здійснювали тричі. Одержані екстракти об'єднували і упарювали на вакуумному роторному випарювачі.

Розділення метилових ефірів жирних кислот та хлорофілів проводили на пластинках з силікагелем у системі розчинників гексан:діетиловий ефір:оцтова кислота (90:10:1), екстрагування метилових ефірів жирних кислот гексаном.

Аналіз метилових ефірів жирних кислот здійснювали методом хромато-маспектрометрії на газовому хроматографі Agilent 6890N з маспектрометричним детектором 5973 inert (Agilent Technologies). Газовий хроматограф було обладнано капілярною колонкою HP-5MS (J&W Scientific, USA) (30m × 0,25mm × 0,25μm). Пробу об'ємом 1 мкл вводили в режимі split. Газ-носії гелій, швидкість потоку 1,0 мл/хв. Початкова температура колонки 150°C з наступним градієнтом 4°C/хв до 250°C, яка витримувалась впродовж 3 хв. Температура інжектора 250°C, температура інтерфейсу 280°C. Аналіз проводили в режимі іонізації електронним ударом, енергія іонізації 70 еВ. Температура джерела іонів 230°C, мас-аналізатора

150°C. Детекцію здійснювали в режимі SCAN. Обробку даних та ідентифікацію метилових ефірів жирних кислот виконали за допомогою програми ChemStation, бази даних NIST02 та стандарту метилових ефірів жирних кислот (Supelco).

Результати і обговорення

У разі вивчення жирнокислотного складу ліпідів екстрагованих із зелених частин рослин у дослідників виникає проблема ефективного розділення ліпідів та хлорофілів, які екстрагуються разом із ліпідами. Проби, які містять хлорофіли не можуть бути розділені на колонці газового хроматографу, оскільки хлорофіли забруднюють колонку та псують її. Для екстрагування ліпідів із зелених пробіркових рослин цукрового буряку нами було використано найрозповсюдженіший метод із використанням ізопропілового спирту, хлороформу та метанолу [4]. Для з'ясування наявності в пробах ліпідів хлорофілу знімали спектри поглинання на спектрофотометрі фірми Vekman. У пробах ліпідів із зелених рослин цукрового буряку спостерігали два піки при довжині хвилі $\lambda=667,5$ та $\lambda=607,5$, які відповідають хлорофілу а і b. Для позбавлення хлорофілу нами було випробувано різні способи екстрагування ліпідів і їхнього розділення на фракції, але позбавитися від хлорофілів нам не вдалося – приготувані для аналізу проби метилових ефірів жирних кислот містили хлорофіли.

Для вирішення цієї проблеми нами було використано наступну схему підготовки проб до аналізу жирнокислотного складу: ліпіди із зелених рослин цукрового буряку, що містять хлорофіли, гідролізували у метанолі, який містив 1,5% H_2SO_4 . З розчину екстрагували метилових ефірів жирних кислот (разом з якими екстрагувалися хлорофіли), а потім здійснювали розділення метилових ефірів жирних кислот та хлорофілів на пластинках з силікагелем у системі розчинників гексан:діетиловий ефір:оцтова кислота (90:10:1) та екстрагували метилові ефіри жирних кислот із силікагелю гексаном.

За розділення хлорофілів і метилових ефірів жирних кислот на пластинках з силікагелем на старті залишалися хлорофіли, а метилові ефіри жирних кислот утворювали пляму в середній частині пластини (рис. 1). Метилові ефіри жирних кислот елювали з пластинок гексаном. Отриманий розчин не містив домішків хлорофілу і був придатний для подальшого аналізу жирнокислотного складу.

Використовуючи такий підхід в складі зелених тканин цукрових буряків гібридів Перла, Олександрія були виявлені жирні кислоти з числом вуглецевих атомів від C_{15} до C_{24} . Було ідентифіковано насичені: пентадеканова, гексадеканова, гептадеканова, октадеканова, ейкозанова, докозанова, тетракозанова; мононенасичені: 7-гексадецена, 9-гексадецена, цис-октадецена, транс-октадецена, 13-доказанова; диненасичену: 9,12-октадекадієнова жирні кислоти. Сумарний вміст насичених жирних кислот для гібриду Перла становив 33,1%, мононенасичених – 34,9%, диненасиченої

кислоти – 32%, для гібриду Олександрія 34,1%, 37,6% та 28,3% відповідно. Серед насичених жирних кислот переважала гексадеканова кислота, кількісний вміст якої для гібрида Перла склав 28,5%, Олександрія – 29,6%. Основною кислотою серед мононенасичених є цис-октадеценева кислота, кількість якої для гібрида Перла – 33,4%, Олександрія – 35,6%.

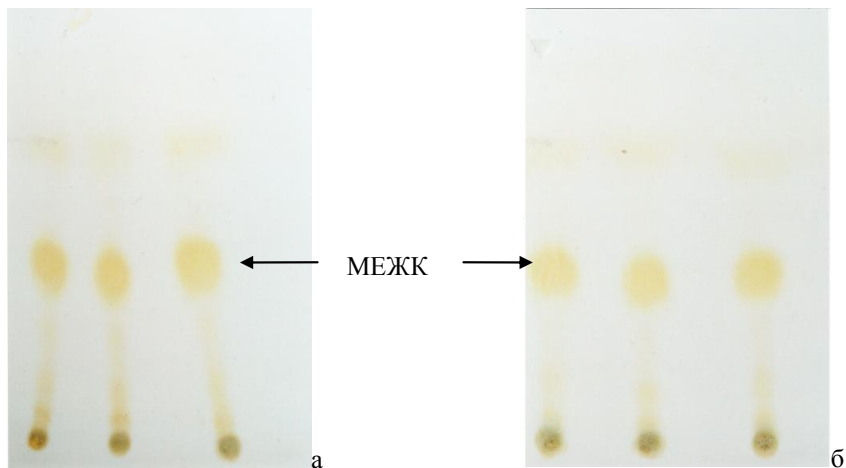


Рис. 1. Хроматограми розділення хлорофілів і метилових ефірів жирних кислот зелених тканин триплоїдних гібридів цукрових буряків: а – Перла, б – Олександрія.

Ліпіди із калюсних тканин цукрових буряків гібридів Перла, Олександрія мали такий же якісний склад жирних кислот порівняно з ліпідами із зелених тканин і відрізнялися лише за їх кількісним вмістом. Сумарний вміст насичених жирних кислот для гібриду Перла становив 38,0%, мононенасичених – 32,9%, диненасиченої кислоти – 29,1%, для гібриду Олександрія 29,8%, 35,4% та 34,8% відповідно.

Висновки. Таким чином, запропоновано підхід, що дозволяє відділити хлорофіли і визначити жирні кислоти зелених органів рослин. Встановлено кількісний та якісний склад жирних кислот триплоїдних гібридів Перла та Олександрія.

Література.

1. Алаудинова Е.В., Миронов П.В., Репях С.М. Жирные кислоты мембранных липидов живых тканей почек лиственницы сибирской // Химия растительного сырья. – 2000. – №2. – С. 41 – 45.
2. Бейли Дж, Оллис Д. Основы биохимической инженерии. Пер. с англ. в 2 частях. – М.: Мир, 1989. – 692 с.
3. Жеребило О.Е., Вишталюк Н.М. Жирные кислоты общих липидов некоторых представителей рода других энтеробактерий // Микробиол. журн. – 1987. – 49, №6. – С. 83 – 85.

4. *Keimc M.* Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. – М.: Издательство «МИР», 1975. – 332 с.

5. *Коломієць Ю.В.* Метаболіти бактерій роду *Pseudomonas* як селективний фактор стійкості цукрових буряків до бактеріальних хвороб: Автореф. дис. ... канд. біол.наук. – Київ, 2006. – 23 с.

6. *Новицкая Г.В., Зверкова О.А., Соколова И.А.* Липидный состав листьев и узлов кукурузы озимой ржи при закаливании к морозу // Физиология растений. – 1986. – 33, №5. – С. 997 – 1004.

7. *Новицкая Г.В., Суворова Т.А., Трунова Т.И.* Липидный состав листьев в связи с холодоустойчивостью растений томатов // Физиология растений. – 2000. – 47, №6. – С. 829 – 835.

8. *Носов А.М.* Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. – 1999. – 46, №6. – С. 837 – 844.

9. *Таран Н.Ю.* Адаптаційні зміни ліпідних компонентів мембран хлоропластів за дії на рослини факторів довкілля // Укр. біохім. журн. – 2000. – 72, №1. – С. 21 – 31.

10. *Таран Н.Ю.* Адаптаційний синдром в умовах посухи: Автореф. дис. ... д-ра. біол. наук. – Київ, 2001. – 37 с.

11. *Чиркова Т.В.* Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – №9. – С. 12 – 17.

12. *Brian B.L., Gardner E.W.* Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gasliquid chromatography // Appl. Microbiol. – 1967. – 15, № 6. – P. 1499 – 1500.

13. *Murasige T., Scoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. plant. – 1962. – 15. – P. 473 – 497.

Резюме

Нами запропоновано спосіб визначення жирних кислот ліпідів із зелених тканин рослин, який базується на отриманні МЕЖК, а потім розділенні МЕЖК та хлорофілів на пластинках з силікагелем у системі розчинників гексан:діетиловий ефір:оцтова кислота (90:10:1), екстрагуванні МЕЖК із силікагелю гексаном з подальшим визначенням жирних кислот методом газорідної хроматографії. Встановлено, що ліпідні зелені тканини цукрових буряків триплоїдних гібридів Перла, Олександрія характеризувались наявністю жирних кислот з числом вуглецевих атомів від C_{15} до C_{24} .

Нами предложено способ определения жирных кислот из зеленых тканей растений, который основывается на получении МЭЖК, а потом разделении МЭЖК и хлорофиллов на пластинках с силикагелем в системе растворителей гексан:диэтиловый эфир:уксусная кислота (90:10:1), экстрагировании МЭЖК из силикагеля гексаном с подальшим определением жирных кислот методом газожидкостной хроматографии. Установлено, что липиды зеленых тканей исследованных генотипов характеризовались наличием жирных кислот с числом углеводородных атомов от C_{15} до C_{24} .

We have offered the method of determination of fatty-acids from green tissues of plants, which is based on the receipt of MEFA, and then division of MEFA and chlorophylls on plates with silica gel in the system of solvents hexane:diethyl ether:acetic acid (90:10:1), extracting of MEFA from silica gel hexane with determination of fatty acids by the method of gas-liquid sorptography. It is established, that green tissue lipids of

the investigated genotypes were characterized by presence of fatty acids with number of hydrocarbon atoms from C₁₅ up to C₂₄.

КОСТЕНКО В.В., ТОЛОКНЕЕВА А. А., ГЛЯНЬКО Е.В., ВОРОБЬЕВА Л.И.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: kostenkoviktoria88@rambler.ru

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ АЛЛЕЛЕЙ ЛОКУСА *WHITE* И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ФОНА НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ *DROSOPHILA* *MELANOGASTER*

Используемый в данной работе ген *white*, характеризуется сложной аллельной структурой [1]. Известно, что ген *white* кодирует трансмембранный ABC-переносчик, который осуществляет перенос 3-гидроксикинурина – предшественника глазного пигмента оммохрома – в пигментные гранулы глаза. Этот транспортный белок – один из двух компонентов системы переноса, т.е. при функциональной нормальности и постоянстве второго компонента интенсивность пигментации будет зависеть от функциональной активности именно продукта гена *white* [2]. У дрозофилы биосинтез оммохромов является одним из путей обмена триптофана и блокировка его на промежуточных этапах приводит к накоплению в организме промежуточных метаболитов или к сдвигам в других путях обмена триптофана. В частности, избыток кинурина и 3-гидроксикинурина может привести к накоплению антраниловой и ксантуреновой кислот, токсичных продуктов азотистого обмена. Кроме того, некоторые предшественники образования пигментов служат одновременно источником синтеза нейроактивных веществ [3]. В основном, многие исследователи уделяли большое внимание изучению влияния нарушения пигментации на поведенческие признаки, прежде всего на локомоторную и половую активность [4; 5]. Поэтому целью данной работы было изучить влияние аллелей локуса *white* и генетического фона на адаптивно важные компоненты приспособленности *Drosophila*.

Материалы и методы

В качестве исходного материала для исследований были использованы следующие линии из коллекции кафедры генетики и цитологии ХНУ:

Canton-S (C-S), *Oregon (Or)* – линии дикого типа, и мутантные линии: *white (w¹)*, *white^{tinged} (w^t)*, *white^{apricot} (w^a)* и *white^{satsuma} (w^{sat})*.

Для изучения влияния данных мутаций на признаки приспособленности проводили насыщающие скрещивания по схеме в условиях направленного отбора на маркерную мутацию:

Для каждой исходной мутантной линии было проведено по 6 насыщающих скрещиваний с линией *C-S* и с линией *Or*. Таким образом линии

были выравнены по генотипу (далее по тексту M_{C-S} – линия, в которой мутация переведена на генетический фон дикого типа $C-S$; M_{Or} – линия, в которой мутация переведена на генетический фон дикого типа Or) [6].

Исходные линии и линии, выравненные по генотипу, содержали в стандартных лабораторных условиях. В эксперимент брали только виргинных особей. Для наркотизации использовали диэтиловый эфир.

Жизнеспособность линии определяли по количеству потомков, доживших до стадии имаго, полученных от одной пары особей. Плодовитость линии определяли как общее количество пупариев в потомстве одной родительской пары. Гибель на стадии куколки оценивали по проценту пупариев, из которых не вышли мухи, на момент завершения периода выхода имаго. Доминантные летальные мутации (ДЛМ) определяли по общепринятой методике [7], оценивая частоту ранних и поздних доминантных летальных мутаций (рДЛМ и пДЛМ) – по проценту соответственно светлых и желтых неразвившихся яиц.

Полученные в ходе эксперимента данные были обработаны статистически. Для оценки влияния особенностей генотипа на компоненты приспособленности использовали дисперсионный анализ. Силу влияния оценивали по методу М. Снедекора. Для оценки корреляционных связей между исследуемыми признаками и степенью пигментации глаз применяли коэффициент корреляции рангов К. Спирмена [8]. Для статистической обработки данных использовали программу STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

Для получения выравненных по генотипу линий нами были выбраны две линии дикого типа $C-S$ и Or , которые отличаются между собой по ряду количественных признаков поведения (локомоторная активность, половое поведение, фототаксис) [9]. Как видно из таблицы 1 данные линии дикого типа также являются контрастными и по признакам приспособленности ($p < 0,05$).

Таблица 1.

Средние значения ($\bar{x} \pm \bar{x}$) признаков приспособленности

Генотип	Жизнеспособность		Плодовитость	% леталей	рДЛМ	пДЛМ
	самки	самцы				
$C-S$	18,3±1,595	17,7±1,324	40,8±3,226	27±1,245	3,8±0,812	0,243±0,125
Or	20,9±0,723	22,4±0,78	50,1±1,5*	13,3±1,159	7,5±1,553	3,6±0,877
w_{C-S}	13,7±1,158	14,6±1,199	36,4±1,955	23,6±3,173	11,4±0,881	4,1±0,535
w_{C-S}^f	13,3±1,488	11,5±1,451	29,3±2,759	14,5±1,689	22,3±4,412	5,3 ±1,571
w_{C-S}^a	13,4±0,544	14,3±0,795	36,8±1,43	24,5±2,419	13,9±2,847	2,6 ±0,733
w_{C-S}^{sat}	16,5±0,96	17,8±1,041	46,2±2,352	25,8±1,963	14,1±0,535	2,5±0,622
w_{Or}	18,9±0,814	16,4±0,643	43,6±1,709	18,2±1,801	1,7±0,767	1,4±0,608
w_{Or}^f	13,5±0,886	12,9±0,689	33,2±1,996	19,2±2,366	9,6 ±2,238	4,1±1,073
w_{Or}^a	20,6±0,997	16,6±0,768	47,8±1,897	21,7±1,728	2,1±0,929	0,5±0,227
w_{Or}^{sat}	13,5±0,964	12,2±1,086	31,7±2,045	19,4±2,613	2,2±1	2,4±1,256

Анализ жизнеспособности самок и самцов мутантных линий, выравненных по общему генетическому фону показал, что максимальным уровнем изучаемого признака по самкам характеризуется линия $w^{a_{Or}}$, а по самцам – w^{sat}_{C-S} ($p < 0,05$). Для линии w^t_{C-S} были установлены наименьшие значения данного признака как для самок, так и у самцов ($p < 0,05$).

Изучение плодовитости мутантных линий показало, что максимальным уровнем изучаемого признака характеризуется линия w^a_{Or} ($47,76 \pm 1,897$), а наименьшим w^t_{C-S} ($29,25 \pm 2,759$) ($p < 0,05$).

Как видно из табл.1, минимальный уровень смертности на стадии куколки среди M_{C-S} по сравнению с $C-S$ наблюдается в линии w^t_{C-S} ($p < 0,05$), в то время как остальные линии по своим значениям приближаются к уровню дикого типа. мутантные линии M_{Or} не имеют статистически значимой разницы по данному признаку между собой, но характеризуются достоверно более высоким показателем по сравнению с диким типом Or ($p < 0,05$).

При анализе показателей рДЛМ и пДЛМ было установлено, что линии w^t_{C-S} и w^t_{Or} отличаются повышенным уровнем обоих показателей как по сравнению с соответствующими линиями дикого типа $C-S$ и Or ; так и с линиями с синтезированными генотипами M_{C-S} и M_{Or} соответственно ($p < 0,05$).

Корреляционный анализ показал наличие прямой связи между степенью пигментации глаз и проценту гибели на стадии куколки для особей линий M_{C-S} ($r_s = 0,29$, $t = 3,027$, $p < 0,05$) и плодовитостью M_{C-S} ($r_s = 0,49$, $t = 5,56$, $p < 0,05$). Также прямая связь установлена между степенью пигментации глаз и жизнеспособностью особей для самок M_{C-S} ($r_s = 0,26$, $t = 2,63$, $p < 0,05$) и самцов M_{C-S} ($r_s = 0,33$, $t = 3,4$, $p < 0,05$). Корреляционный анализ между степенью пигментации глаз и частотой поздних эмбриональных леталей выявил отрицательную связь для M_{C-S} ($r_s = -0,415$, $t = -3,061$, $p < 0,05$).

Полученные нами данные двухфакторного дисперсионного анализа показывают достоверное влияние аллельного состояния гена *white* для всех изученных нами компонентов приспособленности ($p < 0,05$). Однако, что касается силы влияния генетического фона на признаки приспособленности, то нами не обнаружено достоверных его значений для ряда компонентов (жизнеспособность для самцов, процент леталей на стадии куколки, рДЛМ и пДЛМ).

Приспособленность является важным адаптивным свойством организма. Вероятность дать потомство определяется многими свойствами организма – его жизнеспособностью, временем достижения репродуктивного возраста, способностью к скрещиванию, плодовитостью и т.д. Оценка приспособленности является сложной задачей, так как этот интегральный показатель складывается из многочисленных компонентов, связанных между собой и вносящих разный вклад в общую приспособленность; общепринятым способом оценки приспособленности является изучение ее отдельных компонентов, из которых наиболее показательны плодовитость, жизнеспособность

способность, процент гибели на стадии куколки, а также доминантные летальные мутации [10, 11].

Изучение основных компонентов приспособленности у мутантных линий, выравненных по общему генетическому фону, показало неоднозначные результаты. Полученные данные для линий дикого типа *C-S* и *Or* свидетельствуют о том, что выбранные нами линии являются контрастными по всем изучаемым признакам приспособленности (см. табл. 1). Для линий M_{C-S} и M_{Or} характерны статистически значимые половые различия по признакам жизнеспособности, а именно для мутантных линий с генетическим фоном *C-S* показано, что самцы обладают большей жизнеспособностью по сравнению с самками, в то время как, для линий M_{Or} наблюдается противоположный эффект. Вероятно это связано с тем, что на показатель жизнеспособности для самок больше влияние оказывает именно генетический фон ($F=13,931$, $p<0,05$), а для самцов – это влияние обуславливают аллели локуса *white* ($F=15,036$, $p<0,05$). Установлено, что введение единичной мутации в определенный генетический фон, замещение хромосом и другие изменения генотипа у *D. melanogaster* могут приводить к изменениям функционального состояния ген-энзимных систем, а также свойств аллозимов ферментов, например АДГ [12], что подчеркивает важность контроля генетического фона при анализе влияния аллельного состояния гена на жизнеспособность.

Анализ плодовитости показал, что максимальным значением изучаемого признака характеризуется линия w_{Or}^a , которая приближается к значению линии дикого типа *Or*. Максимальным значением данного признака на генетическом фоне *C-S* обладает линия w_{C-S}^{sat} , которое превышает показатели линии дикого типа *C-S*. Известно, что мутация w^{sat} характеризуется тем, что уровень дрозоптерина составляет 4% от уровня дикого типа, а ксантоматина – 79%, поэтому фенотипически мы наблюдаем коричневый цвет сложных фасеточных глаз имаго. Более того, данный фенотип образуется в результате нарушения обмена гуанина. Мутация w^a имеет только 3% пигмента дрозоптерина от 100% уровня дикого типа, однако, ксантоматин не обнаружен, что говорит о нарушении обмена триптофана [1]. Возможно, повышенная плодовитость данных линий связана с изменением уровня в организме мух серотонина, дофамина, гистамина и других нейроактивных веществ, которые затрагивают молекулярно-генетические и биохимические процессы, обеспечивающие нормальную приспособленность вида в целом и нормально-функциональное воспроизводство потомства [13]. Плодовитость, как показатель, может определяться частотой ДЛМ и % леталей на стадии куколки, за счет которых происходит отбор особей еще на этих стадиях развития. В наших исследованиях было установлено, что в большей степени на долю рДЛМ оказывает влияние генетический фон ($F=47,314$, $p<0,005$), однако, на долю пДЛМ влияние обусловлено действием аллелей ($F=2,886$, $p<0,005$).

Таким образом, исходя из полученных результатов можно сделать вывод о том, что контрастный генетический фон, в котором находятся аллели локуса *white* может оказывать разнонаправленное влияние на некоторые компоненты приспособленности.

Литература

1. <http://flybase.org/reports/FBgn0003996.html>
2. Ewart G.D., Howells A.J. *Drosophila* eye pigmentation ABC transporters // *Methods in enzymology*- 1998- Vol.292- P. 213.
3. Кайданов Л.З., Лучникова Е.М. Принципы генетического анализа поведения // *Физиологическая генетика и генетика поведения*. – Л.: Наука, 1981. – С.21-78.
4. Волкова Н.Е., Воробьева Л.И. Влияние генных мутаций хромосом 1 и 2 на половое поведение *Drosophila melanogaster* // *Вісник ОНУ*, Т.10, вип.5, 2005, С. 115-124.
5. Григорьев Д.С., Воробьева Л.И. Локомоторная активность линий *Drosophila melanogaster*, полученных из популяций разного географического происхождения // *Вестник ХНУ*, серия: биология, Вып.11, № 905, 2010, С. 77-83.
6. Никоро З.С., Васильева Л.А. Проблема изменчивости и отбора по количественным признакам на примере популяции *Drosophila melanogaster* / В кн.: *Дрозофила в экспериментальной генетике*. – Новосибирск, «Наука», 1978. – С. 196-243.
7. Тихомирова М.М. Генетический анализ. Учеб. пособие.- Л. :Изд-во ЛГУ.1990. – 280с.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. – Москва: «Высшая школа», 1990. – 351 с.
9. Волкова Н.Е., Немчук Н.В., Воробьева Л.И. Влияние возраста родителей на половое поведение *Drosophila melanogaster* // *Вестник ХНУ*, серия: биология, Вып. 1-2, №709, 2005, С. 77-84.
10. Готов Н.В., Тишкин В.В., Кузнецов О.В., Рахман М.И. Изучение вкладов отдельных компонентов в общую приспособленность популяций дрозофилы // VI Всесоюз. совещ. по проблемам биологии и генетики дрозофилы. Тез. докл. – Одесса, 1989. – С. 101-102.
11. Shirley M.D.F., Sibly R.M. Genetic basis of a between-environmental trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster* // *Evolution (USA)*. – 1999. – Vol.53, №3. – P. 826-836.
12. Тоцкий В.Н., Хаустова Н.Д., Алишбли Н.М., Сечняк А.Л. Генетико-биохимические механизмы онтогенетической и филогенетической адаптации // *Цитология и генетика*. – 2002. – № 3. – С. 69-75.
13. Лопатина Н.Г., Зачепило Т.Г., Чеснокова Е.Г., Савватеева-Попова Е.В. Мутации структурных генов ферментов метаболизма триптофана по кинурениновому пути в модуляции звеньев сигнального каскада – рецепторы глутамата-актин цитоскелета // *Генетика*. – 2007. – Т. 43, № 10. – С.1396–1401.

Резюме

Изучено влияние аллелей локуса *white* и генетического фона на формирование основных компонентов приспособленности *Drosophila melanogaster*. Установлено достоверное влияние аллелей локуса *white* и в ряде случаев генетического фона на такие признаки как плодовитость, жизнеспособность, процент смертности на стадии куколки, рДЛМ и пДЛМ.

Вивчено вплив алелів локусу *white* та генетичного фону на формування основних компонентів пристосованості *Drosophila melanogaster*. Встановлено достовірний вплив алелей локусу *white* та в ряді випадків генетичного фону на такі ознаки як плодючість, життєздатність, відсоток загибелі на стадії лялечки, рДЛМ і пДЛМ.

The effects of allelic locus *white* and genetic background on the formation of the main components of fitness of *Drosophila melanogaster* had been studied. A statistically significant effect of *white* locus alleles, and in some cases, the genetic background on such traits as fecundity, viability, percentage of mortality at the pupal stage, and eDLM and IDLM had been specified.

КОЦАРЕНКО Е.В., ЛЫЛО В.В., МАЦЕВИЧ Л.Л., ЛУКАШ Л. Л.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина, 03680, Киев, ул. Ак. Заболотного, 150, e-mail: kotsarenko_k@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА РЕПАРАТИВНОГО ЭНЗИМА MGMT В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Репаративный энзим O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза (MGMT) играет важную роль в восстановлении повреждений ДНК, вызванных алкилирующими соединениями [1]. Алкилирование ДНК может происходить в разных сайтах, однако наиболее выраженный канцерогенный, цитотоксический и мутагенный потенциал имеет появление алкильных групп в O⁶-позиции гуанина [2]. MGMT репарирует O⁶-алкилгуанин в одношаговой реакции, перенося алкильную группу с ДНК на собственный активный цистеиновый остаток. При этом ДНК восстанавливается, а метилтрансфераза необратимо инактивируется [1, 3].

По данным литературы, репаративный энзим MGMT человека имеет молекулярную массу около 22-24 кДа [1]. Согласно работам некоторых зарубежных авторов, при Вестерн блот анализе с использованием анти-MGMT антител выявляется также белок с молекулярной массой в области около 48 кДа. Однако природа этого более тяжелого белка авторами не поясняется. В наших опытах мы также часто наблюдали наличие этой формы белка. Белок с молекулярной массой 48 кДа мы условно обозначили как модифицированная форма энзима. Нами было выдвинуто предположение, что этот белок может быть димером канонической формы MGMT, который образовался за счёт сильных ковалентных дисульфидных связей между остатками цистеинов. Наше предположение подтверждает также ряд работ, в которых показана теоретическая возможность образования белок-белкового комплекса MGMT [4, 5]. Также известно, что самоассоциация белков с образованием димеров и олигомеров более высокого порядка является весьма распространенным явлением в клетке. При этом встречаются как гомодимеры, построенные из одинаковых субъединиц, так и гетеродимеры, построенные из разных субъединиц [6]. Недавние структурные и биофизические исследования показали, что димеризация и/или олигомеризация яв-

ляется одним из ключевых факторов в регуляции различных белков, таких как ферменты, ионные каналы, рецепторы и транскрипционные факторы, к тому же самоассоциация помогает свести к минимуму размер генома [7]. Поэтому в нашей работе мы провели поиск возможностей разрушения белкового комплекса с целью дальнейшего его изучения. Несмотря на то, что применение таких денатурирующих условий, как β -Mercaptoethanol, SDS, а также 5 мин кипячения, при электрофорезе белков, как правило, приводит к разрушению интер- и интрамолекулярных дисульфидных связей, существуют стабильные белковые комплексы, для разрушения которых необходимы дополнительные дестабилизирующие факторы (pH, денатурирующие агенты, высокое давление, высокая ионная сила, изменение температуры и др.) [8, 9]. Некоторые из этих факторов мы использовали в нашей работе.

Материалы и методы

В данной работе использовали культуры клеток человека: 4BL6 – линия фибробластоподобных клеток из крови взрослого донора, полученная в нашей лаборатории и стандартная клеточная линия Нер-2 (рак гортани). Клеточные лизаты получали согласно описанному ранее методу [10]. SDS-электрофорез полученных белковых экстрактов проводили в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [11]. Для разрушения димеров белковые экстракты перед проведением SDS-электрофореза обрабатывали несколькими способами: в стандартном буфере для образцов 2X (250 mM TrisHCL (pH 6.8), 2 % SDS, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,5% Bromphenol-blau, 20% Glycerol) с 5-минутным кипячением на водяной бане, а также добавляли 0,5 М ДТТ вместо β -Mercaptoethanol при разной длительности обработки, 8 М мочевины, и длительное кипячение (1 час). Изучение наличия двух форм белка MGMT мы исследовали с помощью Вестерн блот анализа согласно методическим указаниям фирмы-изготовителя моноклональных антител против человеческого MGMT (клон 23.2) «Novus Biologicals, Littleton, Co», США [12]. В качестве вторичных антител использовали видоспецифические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma»). Для контроля нанесения проводили Вестерн блот анализ с использованием моноклональных антител к белку GAPDH («Sigma»).

Результаты и обсуждение

Для выявления экспрессии гена *MGMT* мы использовали стандартные условия проведения SDS-электрофореза белков [11] и Вестерн блот анализа [12]. На рис. 1. показана типичная картина уровня экспрессии исследуемого гена в культурах клеток 4BL6 и Нер-2 на протяжении одного пассажа при 24-96 ч. культивирования.

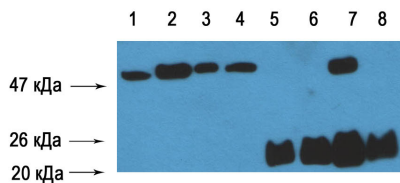


Рис. 1. Вестерн блот анализ зависимости уровня экспрессии гена *MGMT* от длительности культивирования клеток линии 4BL6 и Hep-2: 1 – 4BL6 (24 ч.), 2 – 4BL6 (48 ч.), 3 – 4BL6 (72 ч.), 4 – 4BL6 (96 ч.), 5 – Hep-2 (24 ч.), 6 – Hep-2 (48 ч.), 7 – Hep-2 (72 ч.), 8 – Hep-2 (96 ч.).

Как видно из рис. 1. в клетках 4BL6 белок MGMT находится в модифицированной форме, а в клетках Hep-2 присутствуют обе формы белка – модифицированная и немодифицированная.

Исходя из данных литературы, в которых показано существование стабильных белковых комплексов, которые не разрушаются при обычном SDS-электрофорезе, мы использовали дополнительные методы обработки белковых экстрактов, полученных при лизировании клеток линий 4BL6 и Hep-2. На рис. 2 показано воздействие различных дестабилизирующих агентов на белок MGMT.

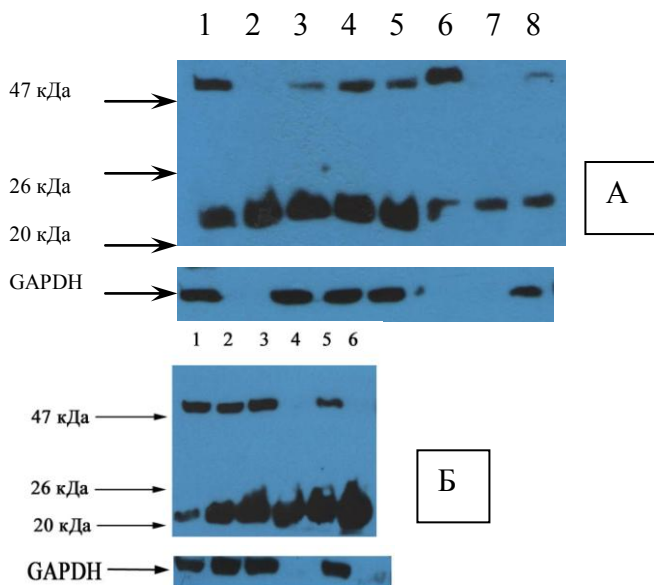


Рис. 2 Изменение соотношения модифицированной и немодифицированной формы белка MGMT в белковых экстрактах под действием температурной и химической обработки

На рис.2 показаны следующие варианты обработки:

рис.2А:

1. Нер-2, 5 мин кипячения в стандартном буфере для образцов (рН 6.8).
2. Нер-2, 60 мин кипячения в стандартном буфере для образцов (рН 6.8).
3. Нер-2, 4 часа инкубации в буфере для образцов (рН 6.8) с добавлением 0,5 М Dithiothreitol, 5 мин кипячения.
4. Нер-2, 4 часа инкубации в буфере для образцов (рН 8.0) с добавлением 0,5 М Dithiothreitol, 5 мин кипячения.
5. Нер-2, 60 мин инкубации в буфере для образцов (рН 6.8) с добавлением 8 М мочевины, 5 мин кипячения.
6. 4BL6, 5 мин кипячения в стандартном буфере для образцов (рН 6.8).
7. 4BL6, 4 часа инкубации в буфере для образцов (рН 6.8) с добавлением 0,5 М Dithiothreitol, 5 мин кипячения.
8. 4BL6, 4 часа инкубации в буфере для образцов (рН 8.0) с добавлением 0,5 М Dithiothreitol, 5 мин кипячения.

рис.2Б:

1. Нер-2 + стандартный буфер для образцов (рН 6.8) с β -MetOH, 5 мин кипячения
2. Нер-2 + буфер для образцов (рН 6.8) без β -MetOH, с 0,5 М ДТТ, ночь при 25° С, 5 мин кипячения
3. Нер-2 + буфер для образцов (рН 6.8) без β -MetOH, с 0,5 М ДТТ, 5 час при 25° С, 5 мин кипячения
4. Нер-2 + буфер для образцов (рН 6.8) без β -MetOH, с 0,5 М ДТТ, 4 часа при 25° С, 1 час кипячения
5. Нер-2 + буфер для образцов (рН 6.8) без β -MetOH, с 0,5 М ДТТ, 2 часа при 37° С, 5 мин кипячения
6. Нер-2 + буфер для образцов (рН 6.8) без β -MetOH, с 0,5 М ДТТ, 1 час кипячения

Результаты эксперимента, представленные на рис.2а, показали, что воздействие выше перечисленных факторов на белковые экстракты привело к полному (дорожка № 2, 7) или частичному (№ 3–5, 8) разрушению модифицированной формы (48 кДа) белка MGMT и увеличению количества белка в немодифицированной форме (24 кДа). Результаты, представленные на рис. 2б также подтвердили, что длительное кипячение способствует разрушению белкового комплекса MGMT, а немодифицированная форма при этом не разрушается, что свидетельствует о высокой термостабильности белка по сравнению, например, с белком контроля – GAPDH.

Таким образом, полученные нами данные о разрушении белкового комплекса MGMT с молекулярной массой 48 кДа при термической и химической обработке белковых экстрактов, в результате чего образуется белок с молекулярной массой 24 кДа, свидетельствуют в пользу предположения о возможном формировании в клетках стабильного гомодимера, т.е. белок-белкового взаимодействия между двумя молекулами белка MGMT. Мы за-

планировали дальнейшее изучение обеих форм белка на молекулярно-генетическом уровне.

Выводы

Определены условия, которые способствуют разрушению белково-го комплекса MGMT. Показано наличие белок-белкового взаимодействия между молекулами MGMT в клетках человека *in vitro*. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о том, что модифицированная форма белка является гомодимером MGMT.

Литература

1. *Pegg A.E.* Multifaceted Roles of Alkyltransferase and Related Proteins in DNA Repair, DNA Damage, Resistance to Chemotherapy, and Research Tools // *Chem. Res. Toxicol.* – 2011. – V. 24, №5. – P. 618–639.

2. *Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W.* MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents // *DNA Repair.* – 2007. – V. 6. – P. 1079–1099.

3. *Fang Q., Noronha A.M., Murphy S.P., Wilds C.J., Tubbs J.L., Tainer J.A., Chowdhury G., Guengerich F.P., Pegg A.E.* Repair of O6-G-alkyl-O6-G interstrand cross-links by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47, № 41. – P. 10892–10903.

4. *Adams C.A., Melikishvili M., Rodgers D.W., Rasimas J.J., Pegg A.E., Fried M.G.* Topologies of Complexes Containing O6-Alkylguanine–DNA Alkyltransferase and DNA // *J. Mol. Biol.* – 2009. – V. 389. – P. 248–263.

5. *Duguid E.M., Rice P.A., He C.* The Structure of the Human AGT Protein Bound to DNA and its Implications for Damage Detection // *J. Mol. Biol.* – 2005. – V. 350. – P. 657–666.

6. *Traut T.W.* Dissociation of Enzyme Oligomers: A Mechanism for Allosteric Regulation // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* – 1994. – V. 29, № 2. – P. 125–163.

7. *Marianayagam N.J., Sunde M., Matthews J.M.* The power of two: protein dimerization in biology // *TRENDS in Biochemical Sciences.* – 2004. – V.29, № 11. – P. 618–625.

8. *Henriksen U., Fog J. U., Litman T., Gether U.* Identification of Intra- and Intermolecular Disulfide Bridges in the Multidrug Resistance Transporter ABCG2 // *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* – 2005. – V 280, № 44. – P. 36926–36934.

9. *Kolodziejewski P.J., Rashid M.B., Eissa N.T.* Intracellular formation of “undisruptable” dimers of inducible nitric oxide synthase // *PNAS.* – 2003. – V. 100, № 24. – P. 14263–14268.

10. *Morton E.N., Margison G. P.* Increased O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in Chinese hamster V-79 cells following selection with chloroethylating agents // *Carcinogenesis.* – 1988. – V. 9, № 1. – P. 45–49.

11. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // *Nature.* – 1970. – V. 227, № 5259. – P. 680–685.

12. http://www.novusbio.com/MGMT-Antibody-MT-232_NB100-168.html

Резюме

Были проведены исследования по установлению природы белка с молекулярной массой 48 кДа, специфически связывающего антитела против репаративного

ензима MGMT. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения, что этот белок представляет собой гомодимер; подобраны оптимальные условия, позволяющие разрушить его.

Були проведені дослідження зі встановлення природи білка з молекулярною масою 48кДа, що специфічно зв'язує антитіла проти репаративного ензиму MGMT. Отримані дані свідчать на користь припущення, що цей білок являє собою гомодимер; підібрані оптимальні умови, що дозволяють зруйнувати його.

Research has been carried out to establish the nature of 48 kDa protein specifically binding to anti-MGMT repair enzyme antibodies. The data suggested that this protein is likely to be MGMT homodimer; the optimal conditions that enable to destroy the protein complex were chosen.

КУНАХ В.А.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,

Україна, 03627, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: kunakh@imb.org.ua

ДЕЩО ПРО ПЛАСТИЧНІСТЬ ГЕНОМУ ЯК ОСНОВУ АДАПТИВНОСТІ РОСЛИН

Вищі рослини, які є прикріпленими організмами, виробили потужні й ефективні, а подекуди – й унікальні механізми адаптації до мінливих умов довкілля.

Дослідження молекулярних механізмів адаптації показали, що за ці реакції відповідають переважно епігенетичні системи, які є частиною естафети від фіксації «відчуття» зміни в довкіллі до зміни генної експресії. Здатність епігенетичних систем змінюватися швидко й ефективно, зберігаючи при цьому потенціал стабільної «пам'яті» впродовж багатьох клітинних поколінь, пояснює гнучкість реакції рослин на умови довкілля. Залежно від умов існування продукт реалізації генотипу – фенотип може бути різним. Наприклад, один із видів роду *Ficus* у лісі – це ліани, а на відкритому просторі – дерева. Або класичний приклад з рослиною стрілиця *Sagittaria* L., що утворює різні відмінні форми листків: підводні (нитчасті), плаваючі (сучільні серцевидні) і надводні (стріловидні). Ці й багато інших даних свідчать про те, що епігенетичні системи рослин є складними і містять низку унікальних складових.

В основі відомих клітинних і молекулярних механізмів захисту рослин від стресових чинників, адаптивності і гомеостатичності на рівні окремого організму лежить, на нашу думку, таке основоположне явище, як висока пластичність геному соматичних клітин, його т. зв. «динамічність», яка чітко виявляється в онтогенезі. Пластичність геному рослин зумовлює тотипотентність (переключення морфогенетичних програм, наприклад, з метою відновлення пошкоджених органів чи організму в цілому) і регульовану (адаптивну) мінливість геному в онтогенезі (у тому числі появу генотрофів), а також високу частоту, на перший погляд, ненаправлених геномних

змін в умовах впливів, що виходять за межі норми реакції генотипу (стресових впливів).

Молекулярні механізми пластичності в організації геному, що змінюється залежно від потреб клітини і умов її функціонування і, особливо, за відхилень, викликаних непередбачуваними стресовими умовами, що дозволяє клітині ефективно уникати загибелі, детально розглянуто у низці книг і оглядів (1-7). У цих працях описані, переважно, «класичні» складові епігенетичної системи рослин, а саме так звані «три стовпи» епігенетики:

- метилювання ДНК (цитозинових і аденінових залишків);
- модифікації хроматину (метилювання і ацетилювання гістонових білків і їх посттранскрипційні модифікації);
- світ РНК (перш за все обидва типи малих РНК – малих інтерферуючих РНК (siRNA) і мікроРНК (miRNA)).

Останнім часом багато уваги приділяється таким перебудовам геному, у тому числі й у соматичних клітинах в онтогенезі, як кількісні зміни ДНК, її окремих фракцій (последовностей і повторів), проте мало враховуються зміни геному соматичних клітин на цитологічному рівні, зокрема хромосомні зміни, які відіграють у процесах адаптації й еволюції не менше важливу роль.

Розглянемо такі явища детальніше, оскільки саме вони забезпечують пластичність геному рослин, що виявляється як у процесі нормального розвитку (у нормі), так і за впливу різних біотичних і абіотичних факторів довкілля, адаптивність онтогенетичних геномних перетворень і можливість передачі адаптивних змін, що виникли в соматичних клітинах, у статевих поколіннях. Обмежимося аналізом мінливості лише ядерного геному.

Впродовж онтогенезу у соматичних клітинах рослин відбуваються закономірні зміни геному, спрямування і ступінь прояву яких модифікуються різними чинниками довкілля і залежать від генотипу. Це, зокрема:

- подвоєння і подальша мультиплікація ядерного геному у переважній більшості клітин за їх диференціювання, що приводить до полісоматії організмів;
- зміни кількості хромосом, що приводить до міксоплоїдії тканин;
- зміни числа копій різних повторюваних, а інколи – й «унікальних» последовностей, що приводить до генетичної гетерогенності клітинних популяцій і диференційованих тканин (химеризму).

Геномна мінливість соматичних клітин є результатом, перш за все, програми диференціювання. Поліплоїдизація клітин в онтогенезі – це наслідок наростаючої спеціалізації і різкого посилення специфічних синтезів у процесі реалізації програми розвитку. При цьому вибіркова реплікація ДНК (амплікація) і недореплікація певних последовностей, які відбуваються, як правило, у період зміни фаз росту і репродукції, порушують рівновагу між генами і контролюючими последовностями, що може зумовити формування нових співвідношень між активностями різних генів. У такому

стані клітини набувають характерних особливостей, відсутніх у диплоїдних клітин. Наявність таких особливостей створює нові передумови і можливості дії чинників природного добору як на рівні організмів, так і на клітинному (внутрішньорганізменому) рівні.

В основі механізмів, що забезпечують перебудови геному клітин за їхнього диференціювання в онтогенезі, а також за індукції дедиференціювання клітин (і редиференціювання) як *in vivo*, так й *in vitro* найчастіше лежать наступні процеси:

- додатковий, часто доволі значний синтез ДНК;
- ампліфікація окремих послідовностей;
- ендоредуплікація, інші форми ендомітозу;
- екструзія (викидання ядерного матеріалу за межі клітини);
- димінуція хроматину;
- цитоміксіс;
- зміна кількості В-хромосом, особливо тканиноспецифічних;
- фрагментація ядер (амітоз);
- аномалії мітозу і цитокінезу, зокрема, утворення синцитіїв;
- злиття ядер у багатоядерних клітинах;
- утворення мікроядер за відсутності аберантних анафаз;
- сегрегація ядерного матеріалу у профазах і метафазах не лише поліплоїдних, а й диплоїдних клітин, що веде до редукції числа хромосом;
- поява, а потім і зникнення політенних хромосом (зникнення може відбуватись, очевидно, поступово, шляхом зменшення кількості ниток у вихідних політенних хромосомах);
- соматичний мейоз і косинговер тощо.

На нашу думку, здатність до такої відповіді, що у деяких випадках (зокрема, в умовах культури тканин) приводить геном клітинних ядер вихідних диференційованих і високоспеціалізованих клітин у «дедиференційований» стан (до стану ядерного геному, характерного для «стовбурових» клітин), лежить в основі властивого для багатьох рослин циклу розвитку диференціювання– дедиференціювання – редиференціювання.

У відомому огляді особливостей виникнення і основних характеристик генотрофів (8) підкреслюється, що значна частина захисних реакцій рослин є фізіологічними і спрямована на подолання короточасних стресів. Вони не приводять до змін геному, які могли б передаватися наступним статевим поколінням. Спадкові зміни, тобто виникнення власне генотрофів, можуть відбуватися двома способами, це:

- епігенетичні зміни, такі як парамутації і точкові мутації, індуковані повторами (repeat-induced point mutations – RIP);
 - швидкі спадкові модифікації геному, що виникають у процесі розвитку рослин у стресових умовах.
- Їхніми механізмами є:
 - кількісні зміни повторюваної ДНК;

- метилювання ДНК;
- ексцизії та інсерції мобільних генетичних елементів;
- ампліфікація та/або делеція генів;
- ацетилювання гістонів.

Таким чином, у багатьох організмів за їхнього зіткнення з несприятливими умовами, до взаємодії з якими вони не пристосовані, може відбутися реорганізація геному, яка дозволяє організмам вижити. Нові варіанти, що виникли внаслідок такої реорганізації, випробовуються у стресорних умовах і краще пристосовані мають більшу вірогідність для подальшого розвитку, утворення меристеми і розмноження. Ця схема припускає можливість добору на клітинному рівні всередині меристеми між варіантами, що виникли у процесі реакції на стрес, які потім беруть участь у створенні наступного покоління.

Істотним у стратегії адаптивності рослин є те, що у них флоральна меристема і репродуктивні органи закладаються, як правило, на порівняно пізніх етапах онтогенезу, після десятків і сотень послідовних клітинних поділів соматичних клітин, які, безсумнівно, пройшли сито клітинного добору і можуть містити адаптивні відселектовані зміни геному. Така особливість рослин відіграє ключову роль у реалізації можливості успадкування адаптивних ознак (реорганізацій геному), що виникли у процесі онтогенезу.

Складна ієрархічна будова рослинних популяцій і самих рослин є додатковим джерелом мінливості, яке визначає варіації репродуктивної стратегії рослин. Зокрема, мінливість у популяціях соматичних клітин супроводжується мінливістю у популяціях генеративних клітин: одночасно з клітинами з гаметичним числом хромосом трапляються клітини зі зміненням, часто з соматичним числом хромосом. Онтогенетичні варіації числа хромосом у соматичних клітинах (міксоплоїдія) здатні впливати на репродуктивні властивості рослин і дозволяють їм переходити у випадку необхідності за певних умов від статевої репродукції до партеногенезу чи від вегетативного розмноження до статевої репродукції (деталі і посилання див. (9, 10)), що безперечно, ще більше сприяє можливості передавати набуті в онтогенезі адаптивні ознаки у поколіннях. Існує обґрунтована думка, що саме стресові умови існування рослин є фактором, що дестабілізує систему насінневого розмноження, а сама дестабілізація системи розмноження має адаптивний характер для популяцій і видів рослин (11).

Нещодавно ми проаналізували особливості прояву пластичності геному соматичних клітин рослин, що виявляються, перш за все, у змінах числа хромосом, кількості ДНК, її окремих фракцій, повторів і послідовностей у нормі та за впливу різних біотичних і абіотичних факторів довкілля, адаптивності геномних перетворень, що відбуваються в онтогенезі, і можливість передачі адаптивних змін, що виникли у соматичних клітинах, у статевих поколіннях (9, 10). Упевнилися, що принцип факультативності ге-

ному, розроблений М. Голубовським, і нещодавно викладений у завершеному і цілісному вигляді (12), дійсно віддзеркалює загальний принцип організації життя і еволюції живого – єдність цілого і свободу частин. Коротко ця гіпотеза і її наслідки є наступними.

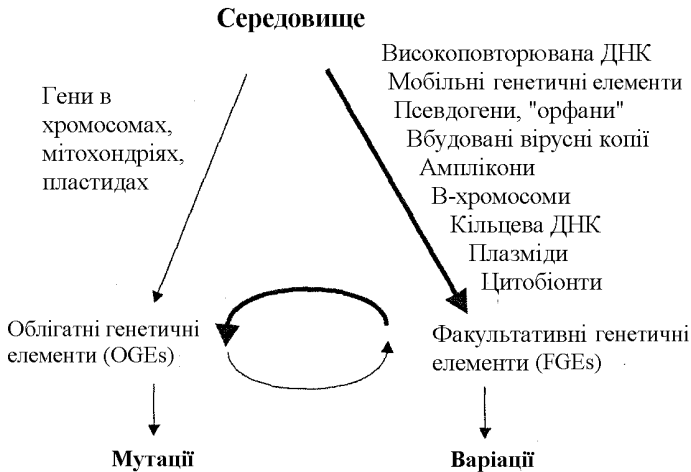


Рисунок. **Облігатні (OGEs) і факультативні (FGEs) генетичні елементи та два типи спадкових змін – мутації і варіації.** Стрілки вказують на зв'язки, а товщина стрілок – на інтенсивність їхньої сили (*intensity of their forces*) (за: Golubovsky, 2011, з доповненнями).

Геном зберігає і передає спадкову інформацію як структурно, так і динамічно. Він представляє собою ансамбль як облігатних, так і факультативних елементів. Матричні процеси (реплікація, транскрипція і трансляція) і основні генетичні процеси (репарація, рекомбінація і сегрегація) здатні до факультативної функціональності і динамічних (епігенетичних) модифікацій. Автор пропонує розрізняти три типи спадкових змін: мутації, варіації та епігенетичні модифікації. Факультативність структури геному виражається у поділі клітинних ДНК і РНК на дві підсистеми: облігатні генетичні елементи (OGEs) і факультативні генетичні елементи (FGEs). До FGEs автор відносить різні типи повторюваних послідовностей, мобільні генетичні елементи (МГЕ), амплікони, вставлені вірусні і чужинні ДНК, В-хромосоми, плазміди і цитобіонти (рис.). Кількість і внутрішня топографія FGEs різні у різних клітинах, тканинах та індивідах. Зміни структури і порядку OGEs відповідають класичним мутаціям. Для різних змін кількості чи клітинної/тканинної топографії FGEs автор вважає слушним застосовувати термін варіації. Мутації і варіації значно відрізняються за характером свого розповсюдження. Варіації можуть траплятись одночасно у багатьох клітинах/індивідах й індукуються не мутагенними чинниками. Спонтанні спад-

кові зміни в природі зазвичай виникають у системі ДОВКІЛЛЯ – FGEs – OGEs двохетапним шляхом. Першими на дію внутрішніх і зовнішніх умов реагують FGEs. Потім їх активація індукує генні/хромосомні мутації. Як варіації, так і епігенетичні зміни (епіваріації та епімутації) можуть мати не-менделівські властивості, іноді нагадуючи успадкування набутих ознак (12).

Література

1. Колотова Т.Ю., Стегний Б.Т., Кучма І.Ю., Дубинина Н.В., Головка А.Н., Чайковский Ю.Б., Волянський Ю.Л. Механізми і контроль перестроек генома еукариот. – Харків, Коллегиум – 2004. – 264 с.
2. Яблонка Е., Лэмб М. Епігеном в еволюції: за межами сучасного синтезу // Вісн. Укр. тов.-ва генетиків і селекціонерів. – 2008 – Т. 6, № 2. – С. 337-355.
3. Arnold-Schmitt B. Stress-induced cell reprogramming. A role for global regulation. // – Plant Physiology – 2004 – V. 136. – P. 2579-2586.
4. Grant-Downton R.T., Diskinson H.G. Epigenetics and its implication for plant biology. 1. The epigenetic network in plants // Annals of Botany – 2005 – V. 96. – P. 1143-1164.
5. Grant-Downton R.T., Diskinson H.G. Epigenetics and its implication for plant biology. 2. The «epigenetic epiphany»: epigenetics, evolution and beyond // Annals of Botany – 2006 – V. 97. – P. 11-27.
6. Miller R., Kim Y., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B., Zhu J. Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress // FEBS Letters. – 2006 – V. 580 – P. 6537-6542.
7. Патрушев Л.И., Минкевич И.Г. Проблема размера геномов эукариот // Успехи биологической химии – 2007 – Т. 47 – С. 293-370.
8. Каллис Х.А. Среда как генератор адаптивных изменений // В сб.: Современные концепции эволюционной генетики, Новосибирск, Ин-т цитологии и генетики СО РАН – 2000 – С. 168-176.
9. Кунах В.А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений. // Молекулярная и прикладная генетика, Минск. – 2011. – Т.12.- С.7-14.
10. Кунах В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений. // Жебраковские чтения III, Минск: Право и экономика, 2011. – 56 с.
11. Каушин А.С. Гаметофитный апомиксис как неустойчивая система семенного размножения у цветковых – Саратов, Научная книга. – 2006. – 310 с.
12. Golubovsky M.D. The unity of the whole and freedom of parts: facultativeness principle in the hereditary system // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2011 – Т. 15, №2. С. 423-431.

Резюме

Проаналізовано причини, клітинні і молекулярні механізми онтогенетичної мінливості геному, виникнення генотрофів, адаптивність таких змін, а також можливість успадкування набутих ознак.

Проанализированы причины, клеточные и молекулярные механизмы онтогенетической изменчивости генома, возникновения генотрофов, адаптивность возникающих изменений, а также возможность наследования приобретенных признаков.

The reasons, cell and molecular mechanisms for developmental variability of plant genome, genotroph appearance, adaptability of arising changes as well as possibility for inheritance of acquired characters have been analyzed.

¹КУНДА-ПРОНЬ І.В., ²КОЗЕРЕЦЬКА І.А., ²ПРОЦЕНКО О.В.,
²ДЕМІДОВ С.В.

¹Дрогобицький державний педагогічний університет імені І.Я.Франка,
м.Трускавець, вул.В.Івасюка,11

e-mail ira-kunda@yandex.ua

²ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса
Шевченка

e-mail iryna.kozeretska@gmail.com

СПОНТАННИЙ МУТАЦІЙНИЙ ПРОЦЕС У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

Дослідження закономірностей спонтанного мутаційного процесу є важливим для розуміння популяційно-генетичних аспектів та еволюційних подій у популяціях різних видів. Історично *Drosophila melanogaster* є об'єктом для дослідження спонтанного мутаційного процесу. Продемонстровано, що дрозофіла характеризується високим спонтанним мутаційним рівнем [1], але оцінки із застосуванням різних методів суттєво різняться [2, 3].

Дослідження природних популяцій *D. melanogaster* на території колишнього Радянського Союзу показало, що мутаційний процес у цих популяціях характеризувався хвилеподібним зростанням частоти мутацій у різні періоди [4]. У результаті цих досліджень були описані характерні для природних популяцій «моди на мутації»[5, 6, 7]. Після 1991 року такі дослідження систематично не проводилися і були відновлені на території України лише з 2005 року [8].

Дослідження природних популяцій *D. melanogaster* України протягом 2005-2009 років продемонстрували, що всі популяції, які були залучені до аналізу, не характеризуються подіями типу «мутаційного спалаху» [8, 9], хоча кожній з них притаманні певні спадкові зміни.

Метою роботи було проаналізувати частоту виникнення та спектр спонтанних мутацій у 12 природних популяціях *D. melanogaster* із різних регіонів України. Аналіз проводили протягом п'яти поколінь лабораторного розведення ізосамкових ліній. За період розведення нащадків 12 природних популяцій 2010 року збору спостерігали різні мутації забарвлення очей, пігментації тіла, а також за формою та орієнтацією крил відносно тіла.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували особини із природних популяцій *D. melanogaster* різних регіонів України, а саме міст Києва, Одеси, Умані, Варви, Ялти (Магарач), Дрогобича, Пирятини, селищ Поліське і Мотовилівка та Чорнобильської зони відчуження. Збір мух проводили в серпні, вересні 2010 року. У зоні відчуження після аварії на Чорнобильській АЕС були зібрані представники двох популяцій із територій з різним рівнем радіаційного забруднення (0,4 мР/год (яблуневий сад), 2,5-5 мР/год (водойма охолоджувач), 30 мР/год (околиця Рудого лісу). Відрізнялись і біотопи збору матеріалу. Так, в Києві, Чорнобилі, Дрогобичі, Пирятині, Поліському, Мотовилівці та Одесі мух збирали у фруктових садах на задалегідь приготованих приманках, а в Умані, Варві та Ялті (Магарач) відбір проводили на територіях заводів по переробці фруктів.

Увесь природний матеріал було проаналізовано під бінокулярним стереоскопом МБС-10 на наявність видимих фенотипових змін. З кожної популяції відбирали по 30 самок, із яких було отримано ізосамкові лінії. Кожна популяція досліджувалась на наявність видимих фенотипових змін протягом 5 поколінь лабораторного розведення. Виявлених особин із фенотиповими відхиленнями вилучали із подальших схрещувань та досліджували на здатність передавати встановлені фенотипові зміни нащадкам.

Мух утримували на стандартному середовищі при кімнатній температурі [10]. Статистичну обробку результатів проводили за стандартними методами [11].

Результати та обговорення

У ході досліджень було проаналізовано 67210 нащадків у п'яти поколіннях запліднених у природі самок із 12-ти популяцій *D. melanogaster* із різних регіонів України. Вихід видимих мутацій спостерігався практично у всіх досліджуваних популяціях, окрім м. Одеси. Було зафіксовано різноманітні мутації за кольором очей, забарвлення тіла та формою і орієнтацією крил, зміною жилкування крила. Більшість із виявлених мутацій раніше не зустрічалися у природних популяціях України, окрім мутації *yellow*, добре вивченої у популяції м. Умані [4]. Так, нащадки із жовтим забарвленням тіла були виявлені у популяціях м. Києва у четвертому поколінні (2 особини із 632, частота мутації склала 0,31%) та м. Варва у п'ятому поколінні (1 особина із 1396 нащадків, відповідно частота становила 0,07%). Комплементативний тест засвідчив, що обидві отримані мутації алейного гену *yellow* ($y:1-0,0$) [12]. Також окрім мутації «жовте тіло» було знайдено нащадків із темною пігментацією тіла у чотирьох популяціях, а саме: в четвертому поколінні популяції м. Чорнобиля (яблуневий сад) частота даної мутації склала 0,29% (3 особини із 1030); у четвертому і п'ятому поколіннях с. Поліське було знайдено 1 самку із 1335 нащадків і 2 самки на 1534 нащадків (частота мутації становила 0,07% і 0,13% відповідно); у п'ятому поколінні м. Умані виявили 3 особини із даним фенотипом на 1263 нащадки

і частота мутації становила 0,24%; у популяції Магарач (м. Ялта) в п'ятому поколінні було знайдено 1 самку із темним тілом із 1222 нащадків (частота мутації склала 0,08%). Стійко передавали свій фенотип у спадок лише нащадки м. Умані. Було встановлено, що мутація локалізується у 2-й хромосомі та алель на гену *black*.

У нащадків популяції Дрогобича, Києва, Поліського, Мотовилівки і Варви були виявлені особини із крилами, розташованими відносно тіла під кутом у 45°. Схожа мутація спостерігалася у популяції м. Києва у 2009 році [13]. Проте, отримати нащадків із даним фенотиповим проявом вдалося лише від мутантів із популяції Варва. Мутація виявилася не алельною такої 2009 року збору. Таким чином можна зробити припущення, що дане фенотипове відхилення, яке спостерігалось у всіх інших популяціях є модифікацією.

У ході досліджень найбільш різноманітними за спектром виявилися мутації, пов'язані із кольором очей. Мутація «темно-коричневі (шоколадні) очі» була знайдена тільки серед нащадків популяції м. Умань. Частота цієї мутації у другому, третьому і четвертому поколіннях відповідно становила 0,88%, 1,07% і 0,15%. Мутація локалізується у 3-й хромосомі. Також у процесі культивування серед нащадків цієї популяції виникли особини з яскраво-червоними очима, як виявилось, вони були гомозиготними за геном *cinnabar* (*cn:2-57,5*) [12]. Тільки серед нащадків популяції м. Пирятини у третьому поколінні було виявлено мутантів із «червоно-маговими очима» і частота даної мутації склала 0,51% (6 особин із 1173 нащадків). У процесі культивування в даній лінії виникли особини з яскраво-червоними очима, замістивши усіх вихідних мутантів. За комплементарним тестом особини з яскраво-червоними очима несуть алель гену *cinnabar* (*cn:2-57,5*). Найбільшу кількість мутантних мух було виявлено у популяції м. Ялти (Магарач). У першому поколінні частота мутації «яскраво-червоні очі» становила 0,99% (25 особин на 2523 нащадків), у другому – 0,57% (8 особин на 1400 нащадків), у третьому – 1,65% (21 особина на 1276 нащадків), у четвертому – 0,74% (9 особин на 1222 нащадків). Мутація локалізується у 3-й хромосомі. Також серед нащадків цієї ж популяції у першому поколінні було знайдено 1 самця із 2523 особин із дисплазованими фасетками очей (частота мутації склала 0,04%). Самки, гомозиготні за цією мутацією виявилися стерильними. Мутація локалізується у X хромосомі та алельна гену *lozenge* (*lz: 1-27,7*). Серед нащадків природної популяції, яка мешкає на березі водойми-охолоджувача Чорнобильської АЕС лише у п'ятому поколінні було знайдено мух із «темно-червоними очима» (5 особин із 1416, частота мутації становила 0,35%). Мутація локалізується у 3-й хромосомі. Серед нащадків двох різних самок з популяції м. Дрогобич було виокремлено особин з «яскраво-червоними очима», одна з мутацій виявилася алельною гену *cinnabar* (*cn:2-57,5*), інша *scarlet* (*st:3-44,0*) [12]. З ізосамкових ліній популяції м. Варва було виділено мутацію «яскраво-червоні очі», яка алель-

на гену *cinnabar* (*cn*:2-57,5). Серед нащадків природної популяції м. Києва в четвертому поколінні було виявлено мутацію «білі очі» та «зрізаний край крила» (відповідно 1 та 2 особини із 632 нащадків, частота мутацій становила 0,16% і 0,32%), а також було виявлено 3 особини із подвійною мутацією «білі очі» та «зрізаний край крила» (відповідно 3 особини із 632 нащадків, частота мутації 0,47%). Мутація «білі очі» виявилася аельною гену *white* (*w*:1-1,5), а «обрізаний край крила» гену *cut* (*ct*:1-20,0).

Окрім описаних вище мутацій лише у популяції м. Чорнобиль (яблуневий сад) було виявлено мутацію «сепієвидні очі» і частота даної мутації склала у другому поколінні 0,09% (одна особина на 1090 нащадків).

За формою крила окрім мутації «зрізаний край крила» (популяція м. Києва) було знайдено мух із хвилястими вирізками по краю крила у п'ятому поколінні нащадків популяції м. Умані (1 самка на 1263 нащадки, частота мутації 0,08%) та у четвертому і п'ятому поколінні популяції м. Ялта (3 самці із 1222 особин і 5 самців із 1156 особин, відповідно частота цієї мутації становила 0,25% і 0,43%). У потомстві ізосамки з популяції м. Умань були знайдені особини з перерваною жилкою L2, мутація виявилася аельною гену *radius incompletus* (*ri*:3-47,0) [12]. Серед нащадків усіх ізосамкових ліній популяції околиці Рудого лісу з частотою 4,75%, що є найбільшим показником серед усіх досліджуваних популяцій, зустрічалися особини з порушенням розвитку жилки C2, мутація локалізована у 4-й хромосомі. За комплементацийного тесту з геном *cubitus interruptus* (*ci*:4-0,0) у першому поколінні всі особини характеризувалися диким типом, що свідчить про те, що дана мутація, можливо, не аельна гену *ci*. Проте, сьогодні у 4-й хромосомі не описано іще генів, які б відповідали за розвиток жилки C2, тому можна передбачити, що дана мутація все ж аельна гену *ci*, але у гетерозиготі з алелем, який використовувався в схрещуванні (*ci*¹), спостерігається явище міжалельної комплементатії.

Слід зазначити, що мутації зустрічаються з різною частотою у різних ізосамкових лініях. Так, в одній із ізосамкових ліній популяції м. Умань виникли три різні мутації, а саме *cn*, *ri*, та мутація *b*.

При порівнянні частоти виходу мутацій у досліджуваних природних популяціях 2010 року збору можна відмітити, що найвищою вона була у популяції з околиці Рудого лісу, 4,75%. Досить високою частота була також у популяції з м. Ялти (Магарач) і у третьому поколінні становила 1,65%. Достатньо високою частота мутацій була у нащадків популяції м. Умані (1,07% у третьому поколінні) та м. Києва (1,27% у четвертому поколінні). В інших досліджуваних популяціях даний показник коливався в межах 0,07%-0,51% і, відповідно, був незначним як за частотою подій, так і за кількістю поколінь, у яких вони були зафіксовані.

Висновки

У результаті проведених у 2010 році досліджень можна зробити висновки, що частота мутаційних подій має тенденцію до збільшення при по-

рівнянні із даними спостережень попередніх років [8, 9, 13]. Це, можливо, свідчить про початок чергового мутаційного спалаху у природних популяціях *D. melanogaster* на території України. Також слід відмітити певні зміни в спектрі видимих мутацій, виявлених у досліджуваних природних популяціях *D. melanogaster*. Проте, встановлення генної приналежності усіх виявлених мутацій потребує подальших досліджень.

Література

1. Mukai T., Chigusa S.I., Mettler L.I., Crow J.F. Mutation rate and dominance of genes affecting viability in *Drosophila melanogaster* // Genetics.- 1972.- vol.72, № 2.- P. 335-355.
2. Charlesworth B., Borthwick H., Bartolome C., Pignatelli P. Estimates of the genomic mutation rate for detrimental alleles in *Drosophila melanogaster* // Genetics.- 2004.- vol.166, № 2.- P.815-826.
3. Fry J.D. On the rate and linearity of viability declines in *Drosophila* mutation-accumulation experiments: genomic mutation rates and synergistic epistasis revisited // Genetics.- 2004.- vol. 166, № 2.- P.797-806.
4. Захаров И.К. Мутации и мутационный процесс в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени доктора биологических наук. – 1995.- 48с.
5. Голубовский М.Д., Иванов Ю.Н., Захаров И.К., Берг Р.Л. Исследование синхронных и параллельных изменений генофондов в природных популяциях плодовых мух *Drosophila melanogaster* // Генетика.- 1974.- Т. 10, № 4- С.72-83.
6. Гершензон С.М. Аналитический обзор исследований по популяционной генетике, проведенных в Национальной академии наук Украины. – Киев.- 1996.- 72с.
7. Берг Р. Л. Мутация «желтая» (*yellow*) в популяции *Drosophila melanogaster* г. Умани // Вестник Ленинградского ун-та. Сер. биология.- 1961.- № 3, Вып. 1.- С.77-89.
8. Козерецька И.А., Проценко А.В., Афанасьева Е.С., Рушковский С.Р., Чуба А.И., Мюссо Т.А., Моллер А. Мутационные процессы в природных популяциях *Drosophila melanogaster* и *Heirundo rustica* с радиационно загрязненных территорий // Цитология и генетика.- 2008.- № 4.-С.63-68
9. Проценко А.В., Кунда-Пронь И.В., Козерецакая И.А. Мониторинг мутационных событий в природных популяциях *Drosophila melanogaster* Украины // Збірник наукових праць. Фактори експериментальної еволюції організмів.- Київ.- 2010.- Т. 8.- С.212-215.
10. Roberts D.B. *Drosophila* a practical approach – Oxford.- 1986.- 350p.
11. Апраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии. – Горловка. – 2008.- 247с.
12. Tweedie S., Ashburner M., Falls K., Marygold S., Millburn G., Osumi-Sutherland D., Schroeder A., Seal R., Zhang H., and The FlyBase Consortium. FlyBase; Gene Report (2010) <http://flybase.org/reports/FBgn0003996.html>
13. Kozeretka I.A., Kunda-Pron' I.V. Protsenko A.V., Mousseau T.A. The spectrum of mutations in natural populations of *Drosophila melanogaster* from Ukraine // The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine.- 2011.- vol. 9, №1.- P.17-21.

Резюме

Проаналізовано вихід спонтанних мутацій у п'яти поколіннях інбредного розведення самок із 12 природних популяцій *Drosophila melanogaster* України 2010 року збору. У ході досліджень було виділено різні мутації забарвлення очей, пігментації тіла, а також форми та орієнтації крил відносно передньозадньої осі тіла.

Проанализировано выход спонтанных мутаций в пяти поколениях инбредного разведения самок из 12 природных популяций *Drosophila melanogaster* Украины 2010 года сбора. В ходе исследований было выделено разнообразные мутации пигментации глаз, тела, а также формы и ориентации крыл относительно переднезадней оси тела.

We analyzed phenotypic deviations in five generations of laboratory cultured *Drosophila melanogaster* isofemale lines established in 2010 from 12 natural populations from Ukraine. Cultured progeny of the wild-caught flies were investigated for phenotypic deviations in eye coloration, body pigmentation, as well as the form and orientation of the wings relative to the body.

ЛІСОВСЬКА Т.П.¹, ВОЙТЮК В.П.¹, КУЗЬМІШИНА І.І.¹, СТРАТУ Л.С.²

¹Волинський національний університет імені Лесі Українки,

Україна, 43025, Луцьк, вул. Потапова, 9, e-mail: Tlisovska@ukr.net

² Інститут генетики, Молдова, Кишинев, вул. Лісова, 18

РЕКОМБІНАЦІЙНІ І РЕПАРАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ ДВОХ МЕЙОТИЧНИХ МУТАНТІВ ТОМАТУ

Виділення і вивчення значного числа мейотичних мутантів дозволило сформувати уявлення про генетичний контроль окремих етапів мейозу [5]. Мейотичні мутації, що виявляються за порушенням нормального ходу мейозу і стерильності продуктів мейозу, часто контролюють основні процеси метаболізму ДНК, такі як рекомбінація і репарація [5, 7]. Так, мутації, що викликають порушення синапсису або розходження гомологічних хромосом в першому поділі мейозу, можуть впливати на частоту і розподіл кросоверних обмінів [5, 7-11].

Зв'язок рекомбінації і репарації виходить із спільності окремих ферментативних етапів цих процесів, показаних на *Escherichia coli* [9], деяких грибах [5] і дрозофілі [7]. На рослинах подібні дослідження не проводилися. Між тим, вивчення взаємодії процесів рекомбінації і репарації у вищих рослин важливе для розуміння контролю окремих етапів генетичної рекомбінації і можливого керування процесом вивільнення генетичної мінливості [3].

Наша робота присвячена вивченню впливу двох нових мейотичних мутантів томату на процеси генетичної рекомбінації і репарації.

Матеріали і методи

Робота виконана на двох мейотичних мутантах томату, відібраних в польових посівах томату сорту Глорія. Мутант *dsm₁* є синаптичним

із середнім ступенем десинапсису [4], мутант *sti* характеризується порушенням конденсації мейотичних хромосом. Обидві мутації виявили моногенний рецесивний характер успадкування і не алельні між собою.

Дослідження впливу мей-генів на частоту рекомбінації проводили з використанням ліній, які містили маркерні гени у 2-ій (*wv*, *aw*, *d*), 4-ій (*e*, *ful*), 6-ій (*m-2*, *c*) і 11-ій (*hl*, *a*) хромосомах.

Частоту кросинговеру (*rf*) розраховували за методом добутків. У зв'язку з майже повною чоловічою стерильністю досліджуваних мейотичних мутантів, у гомозигот за мей-генами оцінку величини *rf* проводили на підставі даних аналізуючого схрещування, в яких рослини, гомозиготні за мей-генами, були материнською формою. Для коректного порівняння у гетерозигот *Dsm₁ / dsm₁* і *Sti / sti* та вихідного сорту Глорія також оцінювали величину *rf* у мегаспорогенезі (жіночому мейозі).

Вплив мейотичних мутацій на репарацію оцінювали за частотою спонтанних і індукованих Х-променями хромосомних аберацій (ХА) в кореневій меристемі. У зв'язку з неможливістю отримання насіння від самозапилення мутантних рослин, викликаного високою стерильністю рослин, гомозиготних за мей-генами, дослідження проводили на корінцях, що утворюються при вкоріненні живців рослин, попередньо ідентифікованих цитологічно. Коли корінці досягали довжини 0,5-1 см, живці поміщали на холод (+4°C) на 16-18 годин для зупинки клітинних поділів в G₁ – S періодах інтерфази [1]. Корінці опромінювали через 1-2 години після повернення в нормальні умови (+20°C). Джерелом Х-променів був рентгенівський апарат РЕІС-І. Фіксацію матеріалу проводили через 22-25 годин після холодової обробки. З урахуванням затримки мітозов, викликану холодовою обробкою і опромінюванням, час фіксації найімовірніше припадає на другі мітози. Підрахунок частоти ХА (враховували аберації обмінного типу) проводили на давлених препаратах, зафарбованих пропіонлакмоїдом по стандартній методиці. У випадках дуже малої або рівної нулю частоти хромосомних аберацій розраховували довірчі інтервали за спеціальними формулами [2].

Результати і обговорення

Вплив мей-мутацій на репарацію

В якості первинної оцінки репараційних властивостей мейотичних мутантів використовували визначення частоти хромосомних аберацій. Враховували переважно мости і множинні мости з фрагментами в ана-телофазі кореневої меристеми в нормі і після рентгенівського опромінювання. Аналіз рівня спонтанних аберацій хромосом у рослин, гомозиготних за мутаціями *dsm₁* і *sti*, а також у вихідного сорту Глорія (норма) показав, що мутант *sti* значно перевищує норму за частотою клітин з мостами і множинними мостами з фрагментами

(табл. 1). Загальна частота клітин з порушеннями становила для dsm_1 , sti і Глорії $1,84 \pm 0,40$ %, $7,37 \pm 0,91$ % і $1,30 \pm 0,53$ %, відповідно.

Таблиця 1

Частота спонтанних і індукованих аберацій хромосом в мітозі у мейотичних мутантів dsm_1 і sti томату

Генотип	Клітин всього	Частота порушень, %		
		всього	мости	множинні мости з фрагментами
Контроль (без опромінювання)				
sti / sti	819	$7,37 \pm 0,91^{++}$	$5,19 \pm 0,78^{++}$	$0,51 \pm 0,36^+$
dsm_1 / dsm_1	1145	$1,84 \pm 0,40$	$1,17 \pm 0,32$	$0,00 \leq \pi \leq 0,003$
Глорія	462	$1,30 \pm 0,53$	$0,87 \pm 0,43$	$0,00 \leq \pi \leq 0,006$
Опромінювання (Х-промені, 3 Гр)				
sti / sti	386	$10,4 \pm 0,55^{++}$	$6,55 \pm 1,25^{++}$	$0,69 \pm 0,42$
dsm_1 / dsm_1	258	$4,65 \pm 1,31^*$	$3,88 \pm 1,20^*$	$0,00 \leq \pi \leq 0,012$
Глорія	476	$3,57 \pm 0,85$	$2,52 \pm 0,72^*$	$0,17 \leq \pi \leq 0,25$
Опромінювання (Х-промені, 6 Гр)				
sti / sti	464	$16,79 \pm 1,73^{***}$	$11,37 \pm 1,47^{***}$	$1,79 \pm 0,62^+$
dsm_1 / dsm_1	782	$6,69 \pm 0,89^{**}$	$5,31 \pm 0,80^{**}$	$0,26 \leq \pi \leq 0,32$
Глорія	319	$8,46 \pm 1,56^{**}$	$6,27 \pm 1,36^{**}$	$0,28 \leq \pi \leq 0,34$

*, ** – відмінності від спонтанного рівня аберацій істотні при $P \leq 0,05$ і $P \leq 0,01$, відповідно ⁺, ⁺⁺ – відмінності від вихідного сорту Глорія істотні при $P \leq 0,05$ і $P \leq 0,01$, відповідно

Дослідження чутливості мей-мутантів до Х – опромінювання проводили при двох дозах – 3 і 6 Гр. Опромінювання дозою 3 Гр викликало збільшення кількості порушень в клітинах меристеми, проте відмінності від спонтанного рівня аберацій в контролі були недостовірні. Істотне збільшення частки клітин із мостами викликала доза 6 Гр. Мутант dsm_1 за рівнем індукованих порушень, так само, як і спонтанних, був близький до контролю, а мутант sti значно їх перевершував (див. табл. 1). Загальна частота аберацій хромосом складала при 6 Гр для контролю $8,46 \pm 1,56$ %, для dsm_1 / dsm_1 $6,69 \pm 0,89$ % і для sti / sti $16,79 \pm 1,73$ %.

Вплив мей-мутацій на гомологічну рекомбінацію

Результати оцінки частоти гомологічної рекомбінації (rf), одержані на підставі розщеплення за маркерними ознаками у потомстві від аналізуючого схрещування свідчать, що гомо- і гетерозиготні за синаптичною мутацією dsm_1 генотипи не відрізнялись істотно від вихідного сорту (табл. 2).

Гетерозиготні за геном *sti* рослини виявили зростання *gf* у одній із двох досліджених зон геному – зоні *aw-d* (дистальна частина довгого плеча 2-ої ядерцеутворюючої хромосоми). Мутація *sti* у гомозиготному стані значно – у 1,5 і 2,5 рази – збільшує частоту кросинговеру в обох досліджених зонах (рис.).

Таблиця 2

Вплив мейотичних мутацій томату у гомо- і гетерозиготному стані на частоту рекомбінації у мегаспорогенезі (за даними аналізуючого схрещування)

Генотип	<i>gf</i> , % в зонах			
	<i>e – ful</i>	<i>hl – a</i>	<i>aw – d</i>	<i>m-2 – c</i>
Глорія	42,77 ± 4,98	8,08 ± 2,74	11,94 ± 1,27	27,17 ± 1,70
<i>Dsm₁ / dsm₁</i>	42,72 ± 2,96	12,90 ± 1,93	–	–
<i>dsm₁ / dsm₁</i>	–	11,38 ± 2,00	–	–
<i>Sti / sti</i>	–	–	17,38 ± 1,51*	29,46 ± 3,55
<i>sti / sti</i>	–	–	29,50 ± 2,93**	37,88 ± 3,00*

*, ** – відмінності від контролю істотні при $P \leq 0,05$ і $P \leq 0,01$, відповідно

Величина *gf* для зони *aw-d* дорівнює 29,50 ± 2,93 % у *sti/sti* і 11,94 ± 1,27 % у вихідного сорту Глорія (норма); для зони *m2-c* – 37,88 ± 3,00 % у *sti/sti* і 27,17 ± 1,70 % у контролі. У цьому експерименті моногенні співвідношення в розщепленні були близькі до 1:1 в потомстві від аналізуючого схрещування і не могли, отже, вплинути на оцінку величини *gf*.

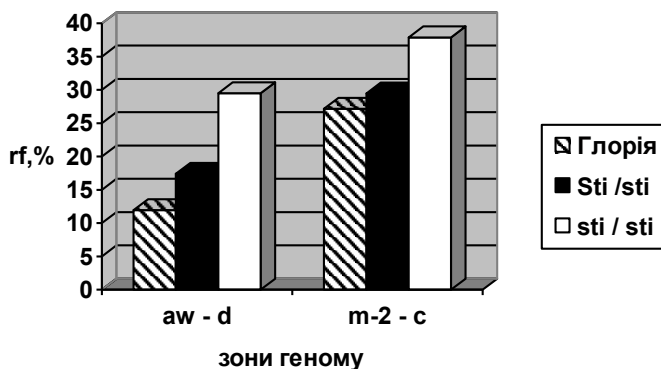


Рис. Частота кросинговеру в маркованих зонах геному у гомозиготі і гетерозиготі за мутацією *sti* та вихідного сорту Глорія

Наші дані свідчать, що мутація *dsm₁* у гомо- і гетерозиготному стані виявляє частоту кросинговеру близьку до норми – вихідного сорту Глорія, що підтверджує десинаптичну природу даної мутації. За рівнем спонтан-

них і індукованих хромосомних аберацій мутантні рослини також не відрізнялися від вихідного сорту. Мейотична мутація *sti*, на відміну від синаптичного мутанта *dsm₁*, істотно підвищує частоту кросинговеру у гетерозигот і, більш значно, у гомозигот за цим геном. Гомозиготи *sti/sti* виявляють істотно вищий від сорту Глорія рівень спонтанних та індукованих хромосомних аберацій в мітозі. Хоча за цитологічним виявом мутації *dsm₁* і *sti* були віднесені нами до повністю рецесивних, одержані дані дозволяють зробити висновок про неповну рецесивність мутації *sti* за впливом на кросинговер.

Необхідно відмітити значну подібність за цитологічним виявом мейотичних мутацій томату *as₄* і *sti*. За повідомленням Моенса, мутант *as₄* підвищує частоту одинарних обмінів і, найбільш значно, в 7 разів, подвійних – в 2-ій хромосомі [3, 10]. За нашими даними, ці мутації є неалельними. З огляду на те, що у мутантних рослин *sti / sti* цитологічно виявляється множинна фрагментація і негомологічні асоціації хромосом, ми передбачаємо, що зростання величини кросинговеру у цих мутантів може бути пов'язано з дефектами репарації.

У подібного до *sti* мейотичного мутанта кукурудзи *st* також були виявлені порушення в мітозі, хоча і менш значні ніж в мейозі [6].

Різноманітні ефекти мейотичних мутацій свідчать, що мейотичний кросинговер, мітотична рекомбінація, система репарації і багато інших фундаментальних клітинних процесів здійснюються за допомогою однакових ферментативних систем.

Автори висловлюють вдячність проф. Королю А.Б., під керівництвом якого були розпочаті ці дослідження.

Висновки

Мейотична мутація *sti* з порушенням конденсації хроматину, на відміну від синаптичної мутації *dsm₁*, істотно підвищує частоту кросинговеру у гетерозигот і, більш значно, у гомозигот за цим геном. Гомозиготи *sti/sti* виявляють істотно вищий від контролю рівень спонтанних та індукованих хромосомних аберацій в мітозі.

Література

1. Бендорайтме Д.И. Влияние γ -излучения и этиленмина на митотический цикл и структурные мутации хромосом ячменя. Автореф. дис. канд. биол. наук. М. – 1979. – 19 с.
2. Закс Л. Статистическое оценивание. – М.: Статистика, 1976. – 598 с.
3. Жученко А.А., Король А.Б. Рекомбинация в эволюции и селекции. – М.: Наука, 1985. – 400 с.
4. Лісовська Т. П., Войтюк В. П., Кузьмішина І. І. Цитологічний і генетичний аналіз мейотичної мутації томату *dsm₁* // Науковий вісник ВНУ ім. Лесі Українки. Біологічні науки. – 2010. – № 12. – С. 105 – 111.
5. Baker B.S., Carpenter A.T.C., Esposito M.S.et. al. The genetic control of meiosis // Annu. Rev. Genet., 1976. – Vol. 10. – P. 53-134.

6. *Beadle G.W.* A gene for sticky chromosomes in *Zea mays* // *Z. Indukt. Abstamm. Vererbungsl.*– 1932. – Vol. 63. – P. 195–217.

7. *Carpenter A. T. C.* Meiotic roles of crossing-over and of gene conversion // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* – 1984. – P. 4–9.

8. *Cornu A., Farcy E., Mousset C.* A genetic basis for variation in meiotic recombination in *Petunia hybrida* // *Genome.* – 1989. – Vol. 32.– P. 46-53.

9. *Kuzminov A.* Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage λ // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999. – Vol. 63, № 4. – P. 751-813.

10. *Moens P. B.* Genetic and cytological effects of three desynaptic genes in the tomato // *Canad. J. Genet. and Cytol.*, 1969. – Vol. 11, № 4.– P. 857-859.

11. *Rattray B., Rose A.* Increased intragenic recombination and non-disjunction in the Rec-1 strain of *Caenorhabditis elegans* // *Genet. Res.* – 1988, Vol. 51.– P. 89-95.

Резюме

Мейотическая мутация *sti*, характеризующаяся нарушением конденсации хроматина, в отличие от синаптической мутации *dsm₁*, достоверно увеличивает частоту кроссинговера в маркированных зонах генома, а также уровень спонтанных и индуцированных хромосомных aberrаций в митозе.

Мейотична мутація *sti*, яка характеризується порушенням конденсації хроматину, на відміну від синаптичної мутації *dsm₁*, істотно підвищує частоту кроссинговеру в маркованих зонах геному, а також рівень спонтанних та індукованих хромосомних aberrаций в мітозі.

Meiotic mutation *sti*, characterized by impaired chromatin condensation, in contrast to the synaptic mutation *dsm₁*, significantly increases the frequency of crossing-over in the labeling of areas of the genome, as well as the level of spontaneous and induced chromosome aberrations in mitosis.

МАЛЕЦКИЙ С.И.

Институт цитологии и генетики СО РАН, пр. Акад.Лаврентьева, 10, г. Новосибирск, 630090, Россия, e-mail: stas@bionet.nsc.ru

ГЕОМЕТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ У РАСТЕНИЙ

Наследственность – свойство организмов обеспечивать материальную и функциональную преемственность между поколениями; воспроизводство потомками признаков родителей, реализуемых через системы морфогенетических и физиологических процессов. Морфогенез у растений – это становление формы, образование структур в процессе развития. «Процессы морфогенеза упорядочены, строго закономерны и при том тенденциозны» [7]. Общепринятой теории морфогенеза пока не существует. «Морфогенез – это разворачивающейся в пространстве-времени континуальный процесс. Даже если принять, что каждый шаг морфогенеза связан с активацией или репрессией определенных генов, то пространственно временное расписание активации/репрессии генов должно определяться не ими сами-

ми, а эпигенетическими факторами, прямо или косвенно связанными с морфогенезом» [1].

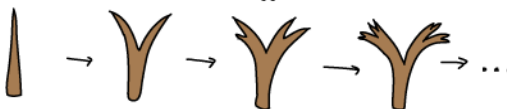
В рамках научной традиции предметная целостность исторически присуща геометрическому способу описания явлений. «В биологии издавна существует иное, геометрическое континуальное видение организмов – как целостных форм. Законы телосложения организмов воплощены не только в их внешней форме, но и в структурных элементах – органах, клетках, органеллах и макромолекулах. ... Каждая из них наделена симметрией и связана отношением симметрии с другими биоморфами («симметрия симметрий»). Это видение биоморф представляет в биологии традиции геометрии» [1]. Описанию морфоэпигенеза растений вполне соответствует лексика фрактальной геометрии. «Для морфологического описания и получения количественных характеристик биологических систем различных уровней организации, от молекул до экосистем, все шире применяется язык фрактальной геометрии, дающий возможность корректного и сжатого описания структур и процессов, не доступного для традиционного используемого в биологии языка евклидовой геометрии» [3].

Фракталом называют структуру, состоящую из частей, которые в каком-то смысле подобны целому. Эта структура «получается в случае многократного применения генерирующего преобразования ко всё более мелким масштабам фигуры. Основное свойство фрактала самоподобие, т.е. это фигуры, части которых по форме совпадают или похожи по форме на фигуру в целом (рис). Например, «маленькая ветвь дерева по форме напоминает большую, а та, в свою очередь, похожа по форме на всё дерево целиком. Симметрия фрактала – это симметрия, не учитывающая размеры вещи и её частей, она сопоставляет формы, не взирая на их масштаб» [9]. Построение фрактальных структур при морфогенезе порождает *итеративную изменчивость, определяемую числом событий при формировании отдельных тканей или частей растения.*

Генерирующее преобразование:



Этапы создания фрактала:



Цитогенетический фрактал. Базовый компонент цитоплазмы растительной клетки – хлоропласты – обладает собственным генетическим материалом и способностью к саморепродукции. Хлоропласты встречаются в клетках листьев, стеблей и в зелёных плодах растений, число которых на клетку варьирует от нескольких штук до нескольких десятков (чаще 10 – 50

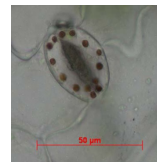
штук) [6]. Растительный эмбрион (семя) начинается с инициальной клетки, содержащей ядро и цитоплазму с некоторым числом пропластид, из которых формируются хлоропласты. После самоудвоения хлоропласты в ходе цитокинеза распределяются между дочерними клетками. Возможно два типа делений – симметричное и асимметричное. При симметричном распределении пластид на протяжении всех циклов клеточных делений каждая клетка взрослого растения содержала бы столько же органелл, сколько их имела инициальная. Однако, в клеточных популяциях число хлоропластов варьирует (эпипластомная изменчивость). Даже в клетках листа одного и того же растения число хлоропластов неодинаково. Варьирует не только число органелл в клетках разных тканей, но в клетках одной ткани [6, 8]. Обозначим две вероятные причины вариации числа органелл в цитоплазме. Во-первых, ассиметричный тип клеточных делений – дочерние клетки получают не равное число органелл. Во-вторых, на вариации числа хлоропластов в клетках оказывает размеры (объем) клеточных ядер (эпигеномная изменчивость). Для свеклы присуща спонтанная миксоплоидность (эпигеномная изменчивость), т.е. в тканях листа присутствуют клетки с различным набором хромосом в ядрах [9], что ведет к изменчивости и числа органелл в цитоплазме. Например, в тетраплоидных клетках число хлоропластов существенно выше, чем в диплоидных. Два фактора – спонтанность клеточных делений и вариация числа геномов на ядро определяют вариативность числа пластид в клеточных популяциях.

Цель настоящего сообщения – описать у самоопыленных потомств, межлинейных гибридов и популяции сахарной свёклы цитогенетические параметры: а) изменчивость числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц; б) изменчивость числа пластотипов в клеточных популяциях; в) размерность фрактала, сформированного из замыкающих клеток устьиц; г) фрактальное строение цветковых структур свеклы.

Геометрическая модель клеточной популяции. В качестве модели использована фигура, состоящая из большого числа однородных частей (фрактал). Фракталы – удобная абстракция при моделировании естественных процессов. Они позволяют описывать сложные природные системы, формируемые под действием очень небольшого числа простых закономерностей. С математической точки зрения «фракталом называется множество, размерность Хаусдорфа-Базикевича, для которого строго больше его топологической размерности» [5]. В евклидовой геометрии под размерностью понимают число координат, определяющих положение точки в пространстве. Различают одно-, двух- и трехмерные объекты. Особенность фракталов в том, что их размерность не укладывается в привычные представления. Фракталы – это геометрические объекты с *дробной размерностью* и представляют собой фигуры, которые занимают нишу между линией и поверхностью (*размерность от 1 до 2*) или поверхностью и трехмерной фигурой (*размерность от 2 до 3*). Иными словами, фракталы – это и

не линия, и не поверхность, и не трехмерный объект, а нечто среднее между ними (фрактальная размерность таких объектов больше топологической размерности – $D_f > D_t$). Множество генеалогически связанных между собой клеток ткани листа можно описать двумя цитогенетическими параметрами: числом *пластотипов в ткани (Pt)* и *средним числом органелл на клетку (M)*. Среднее число органелл (M) и число пластотипов в ткани листа связаны формулой (1) – $M = Pt^D$, где D – фрактальная размерность. Тогда фрактальную размерность клеточных популяций можно найти по формуле (2)– $D = \ln M / \ln Pt$.

Средние значения числа хлоропластов (фото 1) и числа пластотипов в замыкающих клетках устьиц приведены в таблице. Всего в эксперименте учтено 7550 клеток у 151 растения. Число хлоропластов на клетку, с одной стороны, зависит от уровня пloidности генома, а с другой, от репродукции растений (самоопыление или скрещивание). Так у диплоидных гибридов среднее число хлоропластов составило 13,4 штук на клетку, тогда как у триплоидного гибрида это число составило чуть более 18 штук. Число пластотипов у диплоидных гибридов в среднем составило 7,8, у триплоидного – 9,4. У синтетической популяции (PHC) среднее число хлоропластов на клетку равно 15,3, а число пластотипов – 11,7. Средние значения числа хлоропластов в клетках у разных образцов свеклы всегда статистически достоверны [10, 11].



Из таблицы видно, что числа хлоропластов и пластотипов зависят как от плоидности ядер, так и от состояния генома: у самоопыленных потомств (эффект инбредной депрессии) цитопараметры клеток имеют большую изменчивость (PHC-6 и PHC-10), чем у родительской популяции. Если среднее число хлоропластов в популяции PHC составило 15 штук на клетку, то у самоопыленных потомств (PHC-6 и PHC-10) – 19-20 штук.

Таким образом, увеличение числа хлоропластов в устьичных клетках эпидермы наблюдается: у полиплоидного (триплоидного) гибрида и инбредных потомств. Подобные закономерности изменения числа хлоропластов в клетках инбредных растений свеклы были описаны ранее в наших исследованиях [10, 11].

Сходный тип изменчивости присущ и числу пластотипов (Pt) в ткани эпидермы. Среднее число Pt в клеточных популяциях диплоидных гибридов составило 7,8, а у триплоидного гибрида это число равно 9,4. У диплоидной популяции PHC среднее число Pt на ткань составило 11,7, а у самоопыленных потомств (PHC – 6 и PHC-9) – 12,3 и 12,9 соответственно. На основе цитогенетических параметров M и Pt подсчитаем фрактальную размерность (D) генеалогического дерева замыкающих клеток эпидермы листа (формула 2). У исследованных образцов среднее значение показателя D варьирует от 1,17 до 1,31. Оно различно у самоопыленных потомств и у гибридов. Наименьшее значение D (1,17) отмечено у инбредных растений, наибольшее –

Таблица.

Число хлоропластов, число пластотипов и фрактальная размерность замыкающих клеток устьиц сахарной свеклы.

п/п	Обозначение образцов	Число растений	Характеристики популяций хлоропластов					
			Среднее число хлоропластов на клетку		Число пластотипов в замыкающих клетках устьиц		Фрактальная размерность клеток	
			min – max	M	min – max	P	min – max	D
Синтетическая популяция								
1	PHC (2x)	18	14-19	15,3	8-12	11,7	1,09-1,42	1,23
Самоопыленные потомства								
2	PHC-6 (2x)	19	17-23	19,8	10-16	12,9	1,07-1,38	1,21
3	PHC-10 (2x)	12	14-22	18,8	11-15	12,3	1,21-1,25	1,17
Гибриды								
4	диплоидные	60	11-17	13,4	5-10	7,8	1,11-1,55	1,27
5	триплоидный	5	17-19	18,1	7-11	9,4	1,18-1,51	1,31

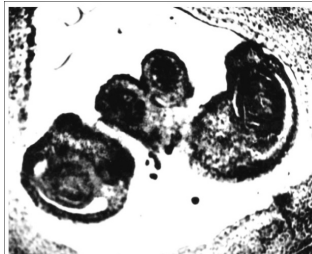
у гибридов (1,27 и 1,31). Средневзвешенное значение D для самоопыленных потомств близко к величине 1,21. Средневзвешенное значение D для 14 гибридных потомств (60 растения) составило 1,27 (точнее 1,272). Размерность замыкающих клеток устьиц в ткани эпидермы листа, равная 1,272, вероятно, является одной из *цитогенетических констант эпидермальной ткани листа свёклы*.

Фрактальная структура репродуктивных признаков сахарной свеклы. Морфогенез цветочных структур в рамках евклидовой геометрии можно представить как рост числа клеток в ходе развития растений и отдельных морфоструктур цветков (зародышевый путь клеток). В рамках традиционных исследований подчеркивается, что в цветках свеклы в завязи формируется всегда одна семязпочка с одним зародышевым мешком, и это заключение как будто бы подтверждается четкими эмбриологическими препаратами.

Фрактальность репродуктивных признаков начинается на уровне генома при переключении с одной программы развития на другую программу («switch genes»), что меняет эпигенотип клеток. Эмбриогенез начинается делением одной клетки (зиготической или апозиготической), а потому смена способа семенной репродукции берет свое начало с изменения ее эпигенотипа. Если клетка зародышевого мешка делится до слияния с мужской гаметой (до оплодотворения), то развивается апозиготический эмбрион (беспыльцевой способ семенной репродукции), если после оплодотворения – зиготический эмбрион. Представление о фрактальном строении цветочных и эмбрио структур не предусматривает линейной однозначности, а

представляется как непрерывное ветвление (почкование) структур цветка при эмбриогенезе. Становление цветковых фракталов во времени следует из хрестоматийного описания морфогенеза цветков и соцветий свеклы, определяющих формирование одно- и многосемяпочковости [3].

Закладке нескольких семян в завязи сопутствует формирование на растениях цветков с многолопастным рыльцем пестика. Это в свою очередь предопределяет формирование плодов с одним-двумя-тремя и четырьмя семенами в отдельном плоде. Множественность (ветвление) семян в отдельном цветке (фото 2) позволяет предполагать различные пути семяобразования – реализуется как зиготический, так и апозиготический способы репродукции. Кроме многосемяпочковости цветков, у свеклы встречается и полиэмбриия (в семечке развиваются два зародыша) [4].



Если цветок – это видоизмененный побег, то внутри цветков имеет место изотомический (дихотомический) тип ветвления, а внешним тканям (цветоложу) и цветоносным побегам присущ анизотомический (моноподиальный) тип. В процессах морфогенеза цветков и соцветий реализуются различные типы ветвления, определяющие «рисунки» конечных фракталов (цветков и соцветий), а также архитектуру растения в целом [3].

Сахарная свекла с генетически различными мегаспорами в завязях цветков, а также склонностью генеративных клеток к партеногенезу (гаметофитная агамоспермия), представляет собой на сегодня уникальный объект с гаметным типом сегрегации по маркерным признакам на уровне растений. Показано, что в апозиготических потомствах свёклы наблюдается автосегрегация по любым маркерным локусам, числовые значения которых радикально отличаются от менделевских пропорций [13].

Настоящая работа выполнялась при финансовой поддержке гранта РФФИ 10-04-00697а (2010-2012гг.) и гранта Президиумов СО РАН и НАНБ №3 (2012-2014 гг.).

Литература

1. Белоусов Л.В. //Вестник ВОГиС, 2009, том 13, №1, с. 29-35.
2. Заренков Н.А. Биосимметрия. М.: Книжный дом «Либроком», 2009, 320 с.
3. Исаева ВВ. // Труды зоологического института РАН. Прилож. №1, 2009, с. 199-218.
4. Малецкая Е.И. Энциклопедия рода: биология, генетика и селекции свёклы. Новосибирск: издательство «Сова», 2010, с.290–301.
5. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. Москва, Ижевск, Институт компьютерных исследований, НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2010, 656 с.
6. Мокроносов А.Т., Федосеева Г.П. Популяционно-генетические аспекты продуктивности растений. Новосибирск, 1982, изд-во «Наука», с.45–62.

7. *Соболев Д.Н.* Начала исторической биогенетики. Симф.: изд-во Украины, 1924. 204 с.

8. *Струк Т.И., Осипова З.А.* Популяционно-генетические аспекты продуктивности растений. Новосибирск: Наука, 1982. С. 77–87.

9. *Уфимцев Р.* Метафизика метафоры. Калининград, изд-во «Оттокар», 2010, 294 с.

10. *Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И.*// Генетика, 2002, т. 38, №1, с.72 – 78.

11. *Юданова С.С., Малецкая Е.И., Малецкий С.И.*// Генетика, 2004, т. 40, № 7 с. 930 – 939.

12. *D'Amato F.* CRC Crit. Rev. Plant Sci. 1985. V. 3. № 1. P. 73–112.

13. *Малецкий С.И.* // Генетика. 1997. Т. 33. № 10. С. 1333–1340.

Резюме

На примере популяций замыкающих клеток устьиц (изменчивость числа хлоропластов и пластотипов) и строения цветков у сахарной свеклы рассмотрена геометрическая структура морфогенеза у сахарной свёклы

The using of the populations of stomata guard cells (the variability of chloroplast number and plastotype number) and the texture of flowers in sugar beet the geometrical structure of morphogenesis were analyzed.

МАМЕДОВА А.Д.

Институт Генетических ресурсов НАН Азербайджана,

Азербайджан, AZ 1106, Баку, пр. Азадлыг, 155, e-mail: afet.m@mail.ru

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ ЛИСТА ГЕТЕРОЗИСНЫХ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ И ИХ ИСХОДНЫХ ФОРМ

Гетерозис или гибридная сила – давно известное и широко распространенное общебиологическое явление, изучение которого представляет большой практический и теоретический интерес. В настоящее время установлен факт увеличения содержания нуклеиновых кислот в соматической клетке гетерозисных гибридов пшеницы [1], кукурузы [5], томатов [7], сахарной свеклы [9] и других сельскохозяйственных культур.

Эффект гетерозиса, обуславливающий более высокую мощность гибридных растений, связан с повышенной интенсивностью фотосинтеза [3]. В исследованиях ряда авторов у гетерозисных организмов, в сравнении с родительскими формами, отмечалась более высокая фотохимическая активность хлоропластов [4,8]. Второй системой, вносящей существенный вклад в общий энергетический потенциал клетки, является система окислительного фосфорилирования, локализованная в митохондриях. В литературе имеются сведения об обнаружении явления комплементации митохондриального аппарата клетки по эффективности фосфорилирования [2].

Изменение генетического материала в цитоплазматических органеллах клетки (митохондриях и хлоропластах) при гибридизации позволяет

оценить энергоёмкость изучаемых систем. Хотя основное количество нуклеиновых кислот, безусловно, содержится в ядре, цитоплазматическим генетическим факторам также принадлежит большая роль в регуляции процессов жизнедеятельности клетки. Учитывая вышесказанное, нам представлялось важным изучить изменения в содержании нуклеиновых кислот в ядрах и субклеточных структурах, несущих генетический материал (митохондрии, хлоропласты), у пшеницы в связи с гетерозисом.

Материал и методика

Исследования проводили в ядрах клеток молодых верхушечных листьев гетерозисных гибридов пшеницы. Пробы листьев брали в начале фазы колошения. В отличие от общепринятого объекта для цитофотометрирования – кончика корня, мы проводили опыты на листьях и столкнулись с рядом трудностей. В результате поиска установили, что при расчленении листа гребешкообразно происходит быстрое его обесцвечивание, равномерная и интенсивная фиксация, гидролиз и окрашивание.

Материал фиксировали в смеси Карнуа (3:1), выдерживали в спиртах нисходящей концентрации и доводили до воды. В предварительных опытах установлено, что оптимальное время гидролиза для интенсивной реакции Фельгена у листьев пшеницы составляло 12 мин (1 н. НСІ) при 60° С. После гидролиза листья окрашивали раствором Шиффа в течение 1,5 ч, промывали 3 раза сернистой водой, а затем проточной водой. Готовили давленные препараты в глицерин-желатине. Содержание комплекса ДНК-фуксина в ядрах измеряли по длине волны $\lambda=530$ нм. Определяли интегральную оптическую плотность ядра, пропорциональную общему содержанию ДНК. В каждом варианте опыта фотометрировали 100 ядер. Содержание ДНК выражали в относительных единицах.

Выделение митохондрий из листьев осуществляли методом дифференциального центрифугирования на холоду при +4°С в среде, содержащей сахарозу 0,5 М; ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты) 0,005 М; калий фосфатный буфер 1/15 М рН 7,4. Полученный осадок митохондрий суспензировали в среде: сахароза 0,5 М, калий-фосфатный буфер 1/15 М, рН 7,0. Суспензию митохондрий использовали для определения нуклеиновых кислот.

Хлоропласты выделяли в среде, содержащей 0,4 М сахарозы; 0,05 М Трис-НСІ буфер (рН 7,4); 0,01 М NaCl и 0,03 М MgCl₂. Чистоту выделенных хлоропластов контролировали под световым микроскопом

Содержание нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах определяли методом спектрофотометрии по Шмидту-Тангаузере в модификации Конарева [6].

Результаты и обсуждение

Цитофотометрический анализ содержания ДНК в интерфазных ядрах гетерозисных гибридов и их родительских форм представляет интерес для быстрого прогнозирования эффекта гибридной мощности.

Как показали результаты исследований, гибриды пшеницы первого поколения в определенной степени отличались от своих родительских форм по содержанию ДНК-фуксина (табл. 1). Гибриды, в сравнении с родительскими сортами, характеризуются увеличением содержания ДНК-фуксина в клеточных ядрах листа.

Таблица 1

Содержание ДНК-фуксина в клеточных ядрах листа гетерозисных гибридов пшеницы и их исходных формах

Комбинация скрещивания	Средняя плотность ДНК-фуксина на одно ядро, усл.ед.			Увеличение содержания ДНК гибридов по сравнению с родительскими формами, %
	P ₁	F ₁	P ₂	
Гюргяна х Зардаби	0,500	0,548	0,457	14,5
Зардаби х Гюргяна	0,457	0,527	0,500	10,1
Зардаби х Лютесценс 10	0,457	0,543	0,523	10,8
Лютесценс 10 х Зардаби	0,523	0,528	0,457	7,8
Зардаби х Эритроспермум 9	0,457	0,542	0,480	15,7
Эритроспермум 9 х Зардаби	0,480	0,528	0,457	12,7
Зардаби х Карабах	0,457	0,524	0,524	6,8
Карабах х Зардаби	0,524	0,528	0,457	7,6
Бирлик х Лютесценс ФРГ	0,411	0,563	0,470	27,7

Самым низким содержанием ДНК в ядрах отличались сорта Бирлик и Зардаби, в ядрах которых содержалось 0,411 и 0,457 усл. ед. ДНК. Однако, в сравнении с другими, у гибрида Бирлик х Лютесценс ФРГ увеличение содержания ДНК по сравнению с родительскими формами максимальное и составило 27,7%.

Высокий процент увеличения содержания ДНК в сравнении с родителями отмечается у гибридов Гюргяна х Зардаби и Зардаби х Эритроспермум 9 – 14,5 и 12,7%, соответственно. У гибрида Зардаби х Карабах наименьшее в сравнении с другими гибридами увеличение содержания ДНК-фуксина по сравнению с родительскими формами – 6,8%.

В таблице 2 представлены данные по изучению содержания нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах гибридов пшеницы в связи с гетерозисом.

Гибриды пшеницы по содержанию митохондриальной РНК и ДНК заметно отличаются от исходных сортов. Так, например, у гетерозисного гибрида Лютесценс ФРГ х Бирлик содержание митохондриальной РНК составило 1948,3 мг%, ДНК – 750,1 мг%, у сорта Лютесценс ФРГ -1070,4 и 509,7 мг%, у сорта Бирлик -1009,8 и 556,3 мг% на сухую массу митохондрий, соответственно.

Таблица 2

Содержание нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах гибридов мягкой пшеницы (F₁) и их родительских форм (мг% на сухое вещество цитоплазматических оргanelл)

Сорта, гибриды	Митохондрии			Хлоропласты		
	РНК	ДНК	РНК/ДНК	РНК	ДНК	РНК/ДНК
Лютесценс ФРГ	1070,4	509,7	2,1	1426,2	306,9	4,7
Бирлик	1009,8	556,3	1,8	910,5	267,2	3,4
Лютесценс ФРГ х Бирлик	1948,3	750,1	2,6	1488,8	416,4	3,6
Бирлик х Лютесценс ФРГ	1617,3	910,9	1,8	1146,1	371,4	3,1
Лютесценс ФРГ	1070,4	509,7	2,1	1426,2	306,9	4,7
Лютесценс КСИ	1324,4	318,9	4,2	1297,5	138,9	9,3
Лютесценс ФРГ х Лютесценс КСИ	1134,1	779,6	1,5	1856,8	529,1	3,5
Лютесценс КСИ х Лютесценс ФРГ	1565,2	554,1	2,8	1419,2	315,8	4,5
Бирлик	1009,8	556,3	1,8	910,5	267,2	3,4
Безостая 1	880,6	662,9	1,3	1149,5	246,3	4,7
Бирлик х Безостая 1	1415,0	800,0	1,8	1138,8	305,1	3,7
Безостая 1 х Бирлик	1245,9	604,2	2,1	870,7	289,3	3,0

У всех изученных гибридных комбинаций отмечается активация синтеза нуклеиновых кислот в митохондриях. Исключение составили гибрид Лютесценс ФРГ х Лютесценс КСИ (по содержанию РНК) и гибрид Безостая 1 х Бирлик (по содержанию ДНК).

Изучение содержания нуклеиновых кислот в хлоропластах пшеницы показало, что все изученные гибридные комбинации по содержанию хлоропластной ДНК превосходили родительские формы. В отношении хлоропластной РНК определенной закономерности установлено не было. В одних случаях гибриды характеризовались активацией синтеза хлоропластной РНК по сравнению с родительскими сортами (Лютесценс ФРГ х Бирлик, Лютесценс ФРГ х Лютесценс КСИ), в других – уступали исходным компонентам (Бирлик х Лютесценс ФРГ, Лютесценс КСИ х Лютесценс ФРГ, Бирлик х Безостая 1, Безостая 1 х Бирлик).

Следует отметить, что из изученных гибридных комбинаций только гибрид Лютесценс ФРГ х Бирлик характеризовался увеличением содержания РНК и ДНК в митохондриях и хлоропластах.

Таким образом, в результате исследований установлено, что исследуемые гибриды пшеницы превосходили родительские сорта по содержанию ДНК-фуксина в ядрах, синтезу нуклеиновых кислот в цитоплазматических оргanelлах клетки.

Можно полагать, что когда и митохондриальная, и хлоропластная системы функционируют с повышенной нагрузкой, то в этом случае следует ожидать и высокий гетерозисный эффект у высокоурожайного гибрида, ко-

торый бы получил большее количество энергии от обеих систем для обеспечения более высоких процессов биосинтеза пластических веществ.

Литература

1. Али-заде М.А., Алиев Р.Т. Увеличение содержания ДНК в клетках гетерозисных гибридов пшеницы // Докл. АН АзербСССР. – 1973. – Т.29, №1. – С.72-74.

2. Горчакова Н.С., Лосева З.И. Гетерозис и митохондриальная комплементация // Актуальные исследования в генетике и практическая реализация их результатов. – 1982. – С.56.

3. Гончарова Ю.К. Наследование признаков, определяющих физиологический базис гетерозиса у гибридов риса // С.-х. биология. – 2010. – № 5. – С.72.

4. Алиев Р.Т., Мамедова А.Д., Азизов И.В. Содержание нуклеиновых кислот и активность фотохимических реакций у томатов в связи с гетерозисом // С.-х. биология. – 1986. – №4. – С.67-70.

5. Должицкая А.Г., Костышин С.С, Мойса И.И. и др. Изучение содержания нуклеиновых кислот и азота в проростках гетерозисных гибридов кукурузы и их исходных форм // Природа гетерозиса и пути его использования в растениеводстве. – Уфа. – 1982. – С.87-92.

6. Конарев В.Г., Тютерев С.Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений. – Л. – 1970. – 202 с.

7. Мамедова А.Д. Увеличение содержания ДНК в клетке гибридов томатов первого поколения в зависимости от уровня гетерозисного эффекта // Материалы IV съезда генетиков и селекционеров Азербайджана. – 1981. – С.52.

8. Рахманкулов С.А. Интенсивность работы фотосинтетического аппарата медвидовых гибридов хлопчатника в связи с хозяйственной продуктивностью // С.-х. биология. – 1980. – Т.15, №3. – С.374-378.

9. Чугункова Т.В., Шевцов И.А., Дубровная О.В. Содержание ДНК в инбредных линиях и гибридах сахарной свеклы в связи с селекцией на гетерозис // С.х. биология. – 1985. – №7. – С.31-37.

Резюме

Изучалось изменение содержания нуклеиновых кислот в ядрах, митохондриях и хлоропластах гетерозисных гибридов пшеницы. Установлено, что исследуемые гибриды пшеницы превосходили родительские сорта по содержанию ДНК-фуксина в ядрах и синтезу нуклеиновых кислот в цитоплазматических органеллах клетки.

It was studied the changes in nucleic acid content in the nuclei, mitochondria and chloroplasts of wheat hybrids. It is established that the investigated hybrids of wheat exceeded the parental forms of DNA-fuchsin content in the nuclei during heterosis and increased energy supply of cells may contribute either mitochondrial or chloroplast genetic systems.

МАТВЕЕВСКИЙ С.Н., КОЛОМИЕЦ О.Л.

ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, д.3, e-mail: sergey8585@mail.ru

ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ В ПРОФАЗЕ I МЕЙОЗА У ВИДОВ С РАЗНЫМИ ТИПАМИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА

Половой диморфизм в широком понимании означает любые различия мужских и женских особей одного биологического вида по внешним и внутренним признакам. Проблема полового диморфизма в мейозе не теряет своей актуальности уже более 100 лет. Особый интерес вызывает проблема регуляции мейоза и селекции мейотических клеток, отличных у особей разного пола (Forgeit, 1984; Tease, Hulten, 2004; Morelli, Cohen, 2005).

Хорошо известны кардинальные различия во времени начала мейотических событий у самцов и самок птиц и млекопитающих. У самцов мейоз начинается в период полового созревания, тогда как у самок профазы I мейоза начинается в период пренатального развития, останавливается на стадии диктиотены до наступления половой зрелости, и мейоз завершается только после оплодотворения. Установлено, что процессы рекомбинации, синапсиса и десинапсиса гомологов по-разному контролируются у самцов и самок животных (Morelli, Cohen, 2005).

Как правило, у эукариот один пол гомозиготен, а другой гетерозиготен по половым хромосомам. У курицы домашней (*Gallus domesticus*) гетерогаметным полом являются самки ($2n=78; ZW$). А гомозиготным – самцы ($2n=78; ZZ$). В кариотипе 78 хромосом, 16 из которых – макрохромосомы (в т.ч. и половые), 62 микрохромосомы (Wang, Shoffner, 1974). У подавляющего числа млекопитающих гетерогаметным является мужской пол. Однако в пределах Mammalia есть исключения из общего правила (см. Veughtnes et al., 2010). В пределах уникального рода *Ellobius* выделено 5 видов животных, 4 из которых отличаются нехарактерными для млекопитающих типами определения пола, лишь у афганской слепушонки (*Ellobius fuscocapillus*) описана типичная для системы определения пола (♂XY, ♀XX). У трех представителей этого рода – восточной (*E. tancrei*), обыкновенной (*E. talpinus*) и алайской (*E. alaicus*) слепушонок идентичные по длине и G-окраске половые хромосомы обнаружены и у самцов, и у самок (♂♀XX XX). У закавказской слепушонки (*E. lutescens*) – только одна половая хромосома выявлена у представителей обоих полов (♂♀XO) (Воронцов и др., 1969; Ляпунова, Воронцов, 1978).

Исследование начальных стадий мейоза часто осуществляется на основе анализа синаптонемного комплекса (СК). СК – нуклеопротеидная структура, специфичная только для профазы I мейоза. СК формируется между двумя гомологичными хромосомами, «застёгивая» их подобно «застежке-молнии», и принимает участие в процессах синапсиса, рекомбинации и десинапсиса хромосом.

Настоящая работа посвящена выделению половых различий в профазе I мейоза у видов с разными типами определения пола: у курицы домашней *G.domesticus* и слепушонки обыкновенной *E.talpinus* с изморфными половыми (XX) хромосомами у обоих полов.

Материалы и методы

Самцы и самки курицы домашней *G.domesticus* были получены на одной из подмосковных птицефабрик. Слепушонки *E.talpinus* отловлены из природных популяций и получены в результате многолетнего разведения в виварии сотрудниками ИБР РАН д.б.н. И.Ю. Баклушинской и проф. Е.А. Ляпуновой (см. Ляпунова и др., 2010). Материал для исследования женского мейоза получили из яичников эмбрионов на 14-17 дни инкубации или 1-3-дневных цыплят и самок слепушонок в течение первых суток после рождения. Материал для мужского мейоза получен от половозрелых петухов. Получение распластанных препаратов СК, их контрастирование, иммуноокрашивание и анализ проводили по ранее описанным методам (Kolomiets et al., 2010). Осевые элементы хромосом и латеральные элементы СК идентифицировали с помощью антител против белка SCP3. Центромеры выявляли с помощью антител против белка кинетохора CENP-A или поликлональными антицентромерными антителами АСА.

Результаты и обсуждение

На стадии пахитены у петухов *G. domesticus* электронно-микроскопически и иммуноцитохимически выявлено 34 полностью сформированных СК, у кур 33 СК и половой гетероморфный СК бивалент. Половой (ZZ) бивалент в сперматоцитах петухов идентифицировали на основе метода СК-кариотипирования по относительной длине этой пары хромосом. Морфологически половой (ZZ) бивалент ничем не отличается от аутосомных СК.

Половой (ZW) бивалент кур удается легко идентифицировать уже на стадии ранней пахитены: между этими хромосомами либо формируется короткий концевой участок СК с длинными асиаптированными осями, либо они остаются полностью асиаптированными, причем W-унивалент утолщен и не редко замкнут в «кольцо», тогда как в структуре более длинного Z-унивалент формируются многочисленные бреши. У кур в конце первой профазы хромосомы приобретают вид т.н. «ламповых щеток», воспроизводящих огромное количество РНК, синтезируемой на латеральных петлях, которые остаются в вытянутом состоянии на протяжении всего роста ооцита, вплоть до начала конденсации хромосом. Транскрипционная активность этого типа хромосом обусловлена необходимостью в дальнейшем формирования яйца с большим запасом веществ, необходимым для развития эмбриона (Flemming, 1882; Callan, 1986).

Интересны различия в деградации СК у кур и петухов на стадии диплотены: в ядрах у кур этот процесс начинается с отталкивания боковых элементов СК и распространяется от теломерного конца к интерстициальным участкам хромосом, а у петуха удаление белка SCP3 происходит пунктирно

еще до начала десинапсиса хромосом. У самцов и самок мышей *Mus musculus* с классическими половыми хромосомами ($2n=40$, ♂XY, ♀XX) ранее установлено аналогичное удаление SCP3 из СК, причем элиминация данного белка первоначально осуществляется в G-бэндах (Давтян, Коломиец, 2008).

Наиболее ранним проявлением полового диморфизма у *E. talpinus* (как и у *G. domesticus*) в профазе I мейоза было формирование ярко выраженной конфигурации «букета» хромосом в ооцитах и отсутствие его в сперматозоидах (Kolomiets et al., 2010). Фигура «хромосомного букета» впервые описана Дж. Гелеи в конце первого десятилетия XX в. у молочной планарии (по: Scheretan, 2001). «Букет» представляет собой специфическую для ранней профазы мейоза пространственную организацию хромосом, способствующую сближению гомологичных хромосом. Как правило, в женском мейозе «букет» сохраняется вплоть до стадии ранней пахитены, тогда как в мужском мейозе такая конфигурация исчезает в ранней зиготене или вовсе не формируется (Harper et al., 2004; Богданов, Коломиец, 2007).

Ранее установлено, что, как правило, СК самок длиннее СК самцов, несмотря на эквивалентный объем генома у обоих полов (Morelli, Cohen, 2005). У самок *E. talpinus* – 155 μm , у самцов – 119 μm (Матвеевский, 2011). То., наши данные коррелируют с результатами измерения длин СК других позвоночных животных и человека (Wallace, Hulten, 1985; Wallace, Wallace, 2003; Campos-Ramos et al., 2009; и др.)

У самцов *E. talpinus*, начиная со стадии поздней зиготены, половой (XX) бивалент постепенно выселяется на периферию ядра, вокруг него формируется облачко электронно-плотного материала. На стадии ранней пахитены четко идентифицируются два прителомерных фрагмента СК между XX хромосомами. В центральной части полового бивалента остается обширная зона асинапсиса. Таким образом, у самцов формируется закрытый половой бивалент. Характерной чертой асинаптированного участка является «размывание» структуры осевых элементов и формирование на этих участках одного ядрышкоподобного телеца. По мере продвижения пахитены наблюдается постепенная трансформация структуры полового бивалента – осевые элементы в зоне асинапсиса первоначально перекручиваются, формируя фигуру «восьмерки», далее осевые элементы могут формировать отростки и принимают форму клубка. Участки СК между теломерными участками хромосом постепенно укорачиваются. В целом, сценарий поведения полового бивалента самцов *E. talpinus* совпадает с таковым, описанным нами ранее у самцов *E. tancrei* (Kolomiets et al., 1991). СК самок *E. talpinus* морфологически ничем не отличается от аутосомных СК и идентифицируются с помощью СК-кариотипирования. У самок *E. talpinus* на стадии диплотены отталкивание боковых элементов СК аутосом распространяется с середины полового бивалента и движется к теломерным концам. В ядрах самцов *E. talpinus* удаление белка SCP3 происходит до начала десинапсиса хромосом.

С развитием новых цитогенетических и молекулярно-генетических методов, средств и приемов исследований стало очевидным, что процессы синапсиса, рекомбинации и десинапсиса гомологичных хромосом в мейозе, хотя и контролируются сходными молекулярными механизмами, однако различаются строгостью контрольно-пропускных пунктов мейоза у самок и самцов. Первоначально это было установлено для гетерозигот по хромосомным транслокациям. В настоящее время эта закономерность установлена и для носителей многих мейотических мутаций (Morelli, Cohen, 2005).

Однако, следует подчеркнуть, что строгость КПП профазы I мейоза (checkpoints) зависит не от пола, а прежде всего от того, какой из полов данного вида гетерогаметен по половым хромосомам. Т.е., правило Холдейна, которое гласит «если в потомстве межвидовых гибридов один из полов встречается реже, полностью отсутствует или стерилен, то этот пол является обычно гетерогаметным», нашло подтверждение уже на современном уровне исследования (Haldane, 1922).

Выводы

Начало формирования ооцитов и сперматоцитов в оогенезе различно. Профаза I мейоза у самок и самцов каждого вида различаются не только по времени течения, но и по морфологическим, морфометрическим характеристикам. В особенности представляется интересным различия на уровне работы КПП: мейоциты с гетероморфными половыми хромосомами (самки птиц и самцы млекопитающих) подвергается более строгому контролю.

Литература

1. *Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л.* Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. М: КМК. 2007. 358 с.
2. *Воронцов Н.Н., Ляпунова Е.А., Закарян Г.Г., Иванов В.Г.* Кариология и систематика рода *Ellobius* (Microtinae, Rodentia) // В сб. Мат-лы ко II Всесоюзному Советанию по млекопитающим. Млекопитающие, эволюция, кариология, систематика, фаунистика. Новосибирск. 1969. С. 127-129.
3. *Давтян А.Г., Коломиец О.Л.* Закономерности элиминации белков в процессе деградации синаптонемного комплекса в профазе I мейоза //12-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века» 10-14 ноября 2008 г. С. 18-19.
4. *Ляпунова Е.А. Воронцов Н.Н.* Генетика слепушонок (*Ellobius*, Rodentia). Сообщение 1. Кариологическая характеристика четырех видов рода *Ellobius* // Генетика. 1978. Т. 14. С. 2012-2024.
5. *Ляпунова Е.А., Баклушинская И.Ю., Саидов А.С., Саидов К.Х.* Динамика хромосомной изменчивости слепушонок *Ellobius tancrei* (Mammalia, Rodentia) в Памиро-Алае за период с 1982 по 2008 гг. // Генетика. 2010. Т. 46. № 5. С. 645–651.
6. *Матвеевский С.Н.* Половой диморфизм мейоза и изменчивость кариотипа у слепушонок рода *Ellobius* (Rodentia, Mammalia) // Автореф. диссертации на соискание уч. степени канд. биол. наук.- ИОГен им. Н. И. Вавилова.- М.- 2011.- 22 с.
7. *Callan H.G.* Lampbrush Chromosomes. Springer-Verlag. 1986. 255 p.

8. *Campos-Ramos R., Harvey S.C., Penman D.J.* Sex-specific differences in the synaptonemal complex in the genus *Oreochromis* (Cichlidae) // *Genetica*. 2009. V. 135. N. 3. P. 325-332.
9. *Flemming W.* Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung (FCW Vogel, Leipzig, 1882).
10. *Forejt J.* X-inactivation and its role in male sterility // *Chromosomes Today*. 1984. V. 8. P. 17-22.
11. *Haldane J.B.S.* Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals // *J. Genet.* 1922. V. 12. P.101-109
12. *Harper L., Golubovskaya I., Cande W.* A bouquet of chromosomes // *Journal of Cell Science*. 2004. V. 117. P. 4025–4032.
13. *Kolomiets O.L., Matveevsky S.N., Bakloushinskaya I.Yu.* Sexual dimorphism in prophase I of meiosis in mole vole (*Ellobius talpinus* Pallas) with isomorphic (XX) chromosomes in males and females // *Comparative Cytogenetics*.- 2010.- Vol.4.- №1.- P.55 – 66.
14. *Kolomiets O.L., Vorontsov N.N., Lyapunova E.A., Mazurova T.F.* Ultrastructure, meiotic behaviour, and evolution of sex chromosomes of the genus *Ellobius* // *Genetica*.- 1991.- V.- 847.- №3.- P.179–189.
15. *Morelli M.A., Cohen P.E.* Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis // *Reproduction*. 2005. V. 130 N. 6. P. 761-781.
16. *Scherthan H.* A bouquet makes ends meet // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. P. 621-627.
17. *Tease C., Hulten M.* Inter-sex variation in synaptonemal complex lengths largely determine the different recombination rates in male and female germ cells // *Cytogenet. Genome Res.* 2004.V. 107. P. 208-215.
18. *Veyrunes F., Chevret P., Catalan J., Castiglia R., Watson J., Dobigny G., Robinson T.J., Britton-Davidian J.* A novel sex determination system in a close relative of the house mouse // *Proc. Roy. Soc. B.* 2010. V. 277. P. 1049-1056.
19. *Wallace B.M., Hulten M.A.* Meiotic chromosome pairing in the normal human female // *Ann. Hum.Genet.* 1985. V. 49. N. 3. P. 215-226.
20. *Wallace B.M., Wallace H.* *Synaptonemal complex karyotype of zebrafish* // *Heredity*. 2003. V.90. P. 136–140.
21. *Wang N., Shoffner R.N.* Tripsin G- and C-banding for interchange analysis and sex identification in the chicken // *Chromosoma*. 1974. V.47. P. 61-69.

Резюме

Настоящее сообщение посвящено анализу полового диморфизма профазы I мейоза у видов с разными типами определения пола (*Gallus domesticus*: ♂ZZ, ♀ZW; *Ellobius talpinus*: ♂♀XX).

Це повідомлення присвячене аналізу статевого диморфізму профазы I мейозу у видів з різними типами визначення статі (*Gallus domesticus*: ♂ ZZ, ♀ ZW; *Ellobius talpinus*: ♂♀ XX).

The present communication is devoted to the analysis of sexual dimorphism in prophase I of meiosis in species with different types of sex determination (domestic fowl *Gallus domesticus*: ♂ ZZ, ♀ ZW; mole vole *Ellobius talpinus*: ♂♀ XX).

МИСЮРА А.К., КЛИМЕНКО В.В.

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: silkway@rambler.ru

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЗРЕЛОГО НЕОПЛОДОТВОРЕННОГО ЯЙЦА И УСПЕШНОСТЬ ПАРТЕНОКЛОНИРОВАНИЯ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Все достижения в области партеноклонирования базируются в конечном счете на методе термического амейотического партеногенеза разработанном Б.Л.Астауровым; причем главным достижением остается выведение путем селекции на гетерозиготность партеноклона P29, генотип которого выбрал в себя из генофонда тутового шелкопряда гены, обеспечивающие при термоактивации зрелого неоплодотворенного яйца выпадение из мейоза редукционного деления и образование диплоидного ядра дробления, не менее эффективного, чем в нормальном развитии промышленных гибридов [1,2].

Хотя способность клона P29 к полному термическому партеногенезу (СТП) является уникальной в плане эффективности, это не говорит о том, что сам метод термоактивации не обладает рядом факторов, которые могут ухудшать эту способность в неоплодотворенных яйцах иного генотипа, а в некоторых случаях и вовсе сводить её к нулю. С вылетом имаго физиологические процессы в зрелом ооците не прекращаются; вмешательство в них при подготовке к термоактивации лишь модифицирует их в условиях, которые созданы экспериментатором. Эти преактивационные модификации еще не изучены; их игнорирование иногда приводит к печальным результатам.

В работе изучены некоторые из преактивационных факторов, влияющих на успешность термического партеногенеза у тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. Изучение реакции на них клона P29 позволит в будущем целенаправленно улучшать классический метод Астаурова, расширяя спектр эффективно клонируемых генотипов, и получить клоны на материале, который ранее оставался вне партеноклонирования.

Материал и методы

В качестве материала использовали грену бабочек партеноклона P29 тутового шелкопряда *Bombyx mori* L. В методе термоактивации, грену после извлечения из бабочки обсушивают на воздухе в течении 8-12 часов при комнатной температуре (около 22°C).

Влияние возраста самки на СТП изучали на пяти группах имаго D0, D1, D2, D3, D4, вылетевших в один день (Dn – n суток с момента вылета). В каждом возрасте готовили 9 проб извлеченной грены и одну контрольную (активация грены в теле бабочки – K1). Время пребывания грены на воздухе после извлечения варьировали от 0 до 2 ч с интервалом в 15 мин. Пробы приготавливали каждые 15 минут, увеличивая тем самым экспозицию на

воздухе первой пробы до двух часов; после этого все пробы одновременно подвергали термоактивации, чтобы условия прогрева были одинаковыми для всех проб изучаемого возраста имаго. Невскрытых бабочек обрабатывали параллельно с опытными пробами в том же режиме. Спустя 3 суток при 16°C из них извлекали грену, которую далее хранили вместе с остальными пробами при комнатной температуре.

Влияние охлаждения (+5°C или +11°C) на способность к термоактивации (СТА) по ходу 8-ми часовой экспозиции на воздухе изучали, охлаждая пробы грены через каждый час в течении 1,2,3,4,5 и 6 часов в пределах 8-ми часового пребывания грены на воздухе. Отдельно изучали динамику СТА при увеличении периода охлаждения от одного до семи часов после 1ч обсыхания извлеченной грены на воздухе. Контролем служили пробы, активированные стандартным методом Астаурова (К).

Способность опытных и контрольных проб к термоактивации оценивали по проценту пигментированных яиц в пробе. Способность к полному термопартеногенезу оценивали по выходу личинок (мурашей) из пигментированных яиц.

Данные на графиках представлены с 95% доверительными интервалами.

Результаты и обсуждение

Изменение СТА в зависимости от срока хранения извлеченной грены изменяется волнообразно для каждого возраста бабочки, более того с довольно определенной периодичностью. Различия между кривыми, которые обнаруживаются на рис. 1., видимо, не очень существенны, так как после усреднения (кривая средних значений) сохраняет почти периодичный волнообразный характер. По-видимому, различия в возрасте приводят лишь к незначительным горизонтальным сдвигам соответствующих кривых активации.

Волнообразный периодический характер активационных процессов установлен в активированных яйцах млекопитающих и связан с периодическими изменениями в концентрации свободного кальция в ооплазме [3]. Только биохимические исследования могут установить природу обнаруженных колебаний в СТА у тутового шелкопряда. Однако можно предположить, что резкое изменение окружения яйца при извлечении его из овариолы может стимулировать в нем активационные процессы в форме сцинтилляций свободного кальция, оказывающих влияние на успешность термоактивации.

Возрасту проб в 30 мин соответствует самое низкое значение СТП. (рис.2) Это свидетельствует о том, что физиологический статус яйца к этому времени оказывается самым неблагоприятным для термоактивации. Затем яйцо выходит из этого «провала» и далее способность к СТП волнообразно изменяется с амплитудой значительно меньше, чем при 30 мин. При охлаждении часовых проб извлеченной грены в +5°C в течение 1-7 ч происходит быстрое падение СТА (таб.1). СТА контрольной пробы (К) остается максимальной.

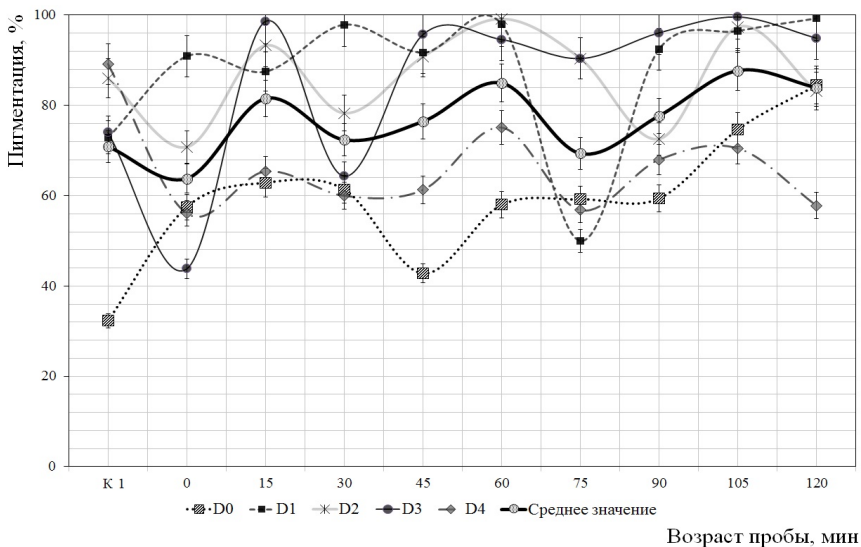


Рис. 1. Влияние возраста бабочек и возраста извлеченной из них гены на способность к термоактивации (СТА)

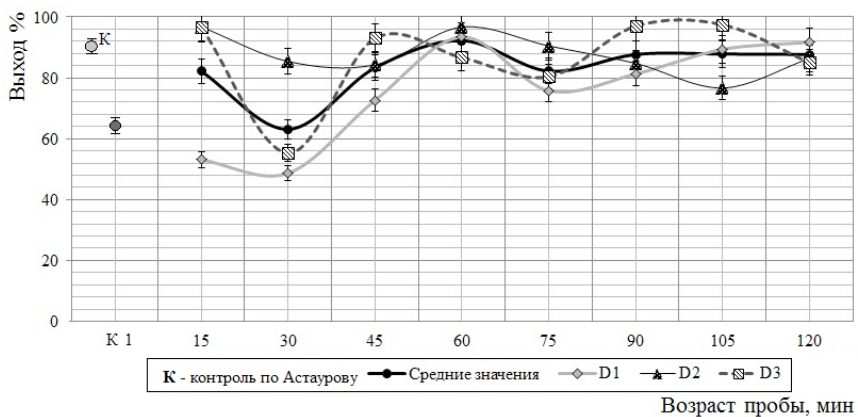
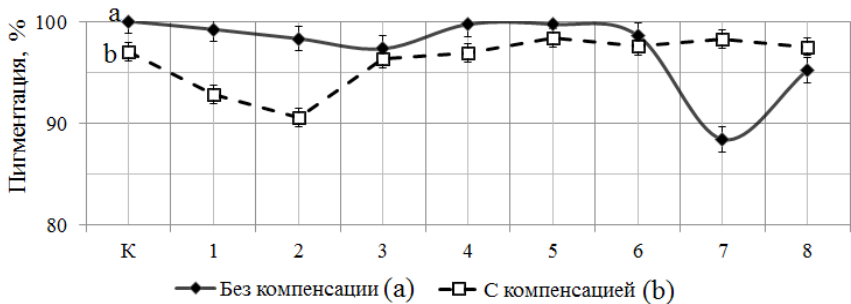


Рис.2. Способность к полному партеногенезу (СПП) в зависимости от времени пребывания гены на воздухе

В дополнительных опытах (рис.3) воздействовали пониженной температурой $+11^{\circ}\text{C}$ в течении часа в 8-ми часовом интервале (с компенсацией и без компенсации охлаждения в 1ч) и обнаружили, что в опыте без компенсации ухудшение способности к СТА приходится на седьмой час, а в опыте с компенсацией – на второй час.

СТА при последовательном увеличении часов в пониженной температуре

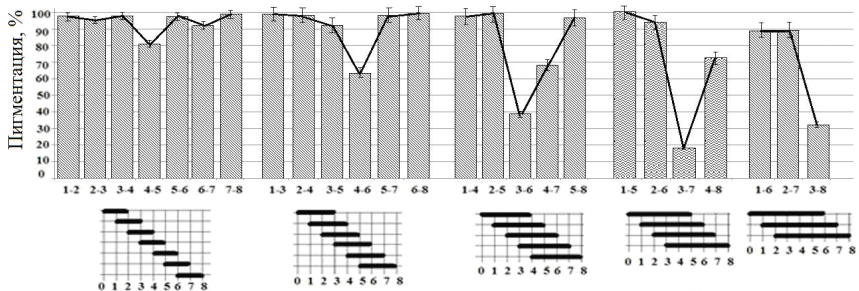
Длительность охлаждения, ч	Пигментация		Отсутствие пигментации, шт	Объем пробы, шт
	шт	%		
К	189	80,3	47	236
1	148	70,3	63	211
2	99	50,0	99	198
3	103	37,6	172	275
4	68	28,6	173	241
5	8	3,6	199	207
6	4	1,9	199	203
7	4	1,6	231	235



Начало часового охлаждения, ч

Рис.3. СТА в зависимости от некомпенсируемого (а) и компенсируемого (б) часового охлаждения, примененного в разные сроки преактивационного периода

При воздействиях холода $+5^{\circ}\text{C}$ длительностью 2-6 ч в период (8 ч) пребывания грены на воздухе СТА неизменно уменьшается, если интервал охлаждения включает срок в 4 ч после извлечения грены (рис.4.). Этот важный момент заслуживает изучения.



Время в холоде, ч

Рис.4. Влияния холода в период до активации на СТА (в %)

Выводы

1. Изменение СТА в зависимости от срока пребывания на воздухе извлеченной грены носят волнообразный характер в исследованном 8-ми часовом интервале времени, что, возможно, связано с периодическим изменением концентрации кальция в цитоплазме, вызванном извлечением яйца из овариолы на воздух.

2. Увеличение периода охлаждения в пределах 8-ми часового пребывания грены на воздухе приводит к быстрому снижению СТА.

3. При компенсируемом часовом охлаждении извлеченной грены падение СТА приходится на второй час после ее извлечения, при некомпенсируемом – на седьмой.

4. Резкое падение СТА наблюдается при охлаждении разной длительности, если оно включает 4-часовой возраст грены после ее извлечения.

5. Полученные результаты показывают «уязвимые места» термоактивации, в которых возможно усовершенствование астауровского метода для получения клонов тех генотипов, которые пока остаются вне клонирования.

Литература

1. *Астауров Б.Л.* Цитогенетика развития тутового шелкопряда и её экспериментальный контроль. – Москва.: Наука, 1968.– 102 с.

2. *Астауров Б.Л.* Партеногенез, андрогенез и полиплоидия. – Москва.: Наука, 1977.– 343 с.

3. *Ozil JP., Markoulaki S., Toth S., Matson S., Banrezes B., Knott JG., Schultz RM., Huneau D., Ducibella T.* Egg activation events are regulated by the duration of a sustained [Ca2+] signal in the mouse // *Dev Biol.*- 2005.- Jun 1, №282(1).- P.39-54.

Резюме

В работе представлены экспериментальные данные, выявившие возможность усовершенствования астауровского метода термического партеногенеза на тутовом шелкопряде с перспективой перенесения его на другие генотипы тутового шелкопряда и даже на другие типы животных.

У роботі наведені експериментальні дані, які виявили можливість удосконалення методу термічного партеногенезу Астаурова на шовковичному шовкопряді з перспективою перенесення його на інші генотипи шовковичного шовкопряду і навіть на інші види тварин.

The paper presents the experimental results that revealed some opportunities of improving the method of thermal parthenogenesis in the silkworm, with the prospect of transferring it to other genotypes of silkworm and even other species of animals.

МИХЕЕВ А.Н.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: mikhalex7@yahoo.com

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ УСИЛЕНИЕ МУТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ, ПОВЫШАЮЩЕЕ РАЗРЕШАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА

Среда обитания постоянно ставит перед организмами определенные «проблемы», которые они должны «решать». При этом решения могут быть как оперативными (онтогенетическими), так и долговременными (генетическими, наследуемыми, эволюционными). В последнем случае основным механизмом приспособления (генетической адаптации) является естественный отбор, специфика которого не может быть прояснена только с помощью понятий «случайности», «необходимости», «статистичности» и пр. (Борзенков, 2003). Принцип естественного отбора должен быть содержательно развит эволюционной наукой до такой степени, чтобы с его помощью решить основную проблему биологической науки – проблему возникновения (эволюции) сложности. Очевидно, что она также имеет два аспекта – онтогенетический и филогенетический (эволюционный). В данной статье нас будет интересовать второй аспект указанной проблемы с привлечением воззрений, касающихся онтогенеза.

Множество примеров наличия сложных качественных признаков (глаз млекопитающих, способность к эхолокации у летучих мышей, пропеллероподобный жгутик бактерий, защитные приспособления жука-бомбардира, ловчие устройства рыбы-брызгуна и др.), возникновение которых допускается биологами-эволюционистами эволюционным путем, тем не менее, зачастую порождает у них сомнение относительно возможности возникновения таких признаков путем постепенного улучшения исходной функции, сея у них креационистские настроения. С этих позиций, представляется невозможным постепенное (эволюционное на основе естественного отбора) улучшение системы-предшественника, поскольку любой предшественник системы (т.е. промежуточная стадия), сложность которой нередуцируема, будет нефункциональным. Фактически, проблема обоснования эффективности естественного отбора сводится к проблеме обоснования возможности «разложения» на жизнеспособные элементы системы, «доказавшей» свое эволюционное преимущество (адаптированность).

Кроме этого, сомнение в достаточной эффективности естественного отбора часто основываются на исчезающе малой вероятности возникновения сложных качественных признаков. В значительной степени данная проблема разрешается с помощью идеи нарастающего отбора, которую развивает Р. Докинз (Докинз, 1993), полагая, что «деятельность» естественного отбора обладает кумулятивным эффектом, т.е. памятью. Действительно, сутью эволюционного процесса является запоминание модификационных

изменений, имеющих фенотипический и/или генотипический характер, и которые обеспечивают определенные конкурентные преимуществ их обладателям.

Биологические системы, обладая способностью к размножению, не начинают каждый раз свою эволюционную «биографию» с чистого листа – их текущие модификации основываются или даже канализируются (направленность эволюции) предшествующими состояниями. При этом не происходит возврата в изначальное состояние, качественный характер которого, фактически, невозможно представить. Внешние воздействия «запоминаются» биологическим объектом (эпигенетический компонент) путем модификации предсуществующих программ (не только генетической) и в дальнейшем преопределяют (преформистский компонент) измененный характер активности, передаваемый в поколениях. При этом отпадает необходимость ждать завершения практически бесконечного процесса перебора приемлемых вариантов, что делает достижение целесообразных эволюционных результатов вполне обозримым по срокам.

При всей очевидной эффективности и убедительности подхода Р. Докинза остается ряд проблем, решение которых придало бы принципу естественного отбора дополнительную объяснительную мощь. В связи с этим, особо важными представляются две взаимосвязанные проблемы: разрешающая способность естественного отбора («замечает» ли отбор незначительные изменения и насколько они должны быть значительными для приобретения статуса адаптивно-значимых), о которой мы уже писали (см. Михеев, Гродзинский, 2007) и представление качественных скачков как совокупности мелких изменений – проблема эволюционной декомпозиции.

Зачастую сложность проблемы обусловлена неразработанностью метанаучных (например, системологических) подходов, методов и методик смежных наук, потому что любая проблема науки, занимающейся изучением систем определенного уровня организации, это, фактически, проблема и наук менее «организованных» и более «организованных» (метанаук). Решение указанных выше проблем становится возможным в свете новых данных и подходов.

Так, развитие радиобиологии обогатило общую биологию рядом фундаментальных понятий, среди которых принцип «усилителя» может иметь непосредственное отношение к решению ряда проблем эволюции. Существование биологических механизмов усиления обеспечивает преодоление факторами (в том числе эволюционными) соответствующих порогов чувствительности или устойчивости биологических систем, что являясь условием развития их реакций (переходных процессов, выражаясь языком биокibernетики), а также (при соответствующей дозе фактора) формирование состояния приспособленности к действию данного фактора (адаптации вообще и эволюционной в частности) (Михеев и др., 2005).

Функционирование системы биологического усилителя лежит в основе как повреждающего, так и регуляторного действия факторов. Разнообразные факторы могут индуцировать изменение экспрессии ряда генов и, в конечном итоге, приводить к усилению работы, например, ферментативных репарационных систем, что повышает устойчивость клетки к последующим стрессовым воздействиям. Механизм усиления лежит в основе реакций всех биологических объектов на действие различных экзогенных и эндогенных факторов, в регуляции всех их жизненных функций. Его реализация обеспечивается существованием систем трансдукции сигналов с участием ряда вторичных посредников. Задействование «сети» систем трансдукции сигналов может обеспечить значительное усиление первичного эффекта фактора (например, мутационного), его генерализацию и передачу на более высокие уровни интеграции, определяя их реагирование. В результате действия системы биологического усиления может происходить умножение и передача генетических сигналов, обеспечивая условия реализации генотипа в фенотип через ряд эпигенетических систем управления. Явление трансдукции сигнала проявляет себя в функционировании, росте и развитии биологических систем в нормальных и экстремальных условиях.

Кажется очевидным, что чем сложнее цепь передачи сигнала и чем больше вторичных посредников в ней задействовано, тем большим является усиление первичного сигнала. При этом каждый из компонентов этой цепи может служить независимой мишенью для регуляторного воздействия, что создает широкие возможности для управления реакцией биологических систем разных уровней интеграции.

Именно работа механизма биологического усиления обеспечивает, в конечном итоге, заметное фенотипическое проявление мутационного изменения. Это, в свою очередь, позволяет манифестировать биологической системе свое модификационное приобретение и продолжать участвовать в «эволюционном конкурсе».

С учетом того, что система биоусиления является неотъемлемой частью функционирования и развития живых систем, может быть проблема разрешающей способности естественного отбора преувеличена и любая потенциально полезная мутация благодаря работе механизмов эпигенетического усиления (а, собственно говоря, в организме все механизмы усиления – эпигенетические) способна в конечном итоге «породить» результат, который значимо (существенно, заметно, достоверно) и с необходимостью повышает шансы на выживание обладателя этого признака? Именно система биоусиления и позволяет реализоваться «полезной» мутации. Как, впрочем, и «вредной»...

Что же из собой представляют эпигенетические реакции. Понятие «эпигенотип» пришло в физиологическую генетику из эмбриологии («Физиологическая генетика», 1976; Ванюшин, 2009) При рассмотрении характера функционирования генома, среди общей совокупности генов разли-

чают облигатно неактивные гены, облигатно активный генетический материал, представленный генами, функционирующими во всех соматических клетках независимо от типа их дифференцировки, и факультативно активный генетический материал, который может находиться в клетках данного типа дифференцировки в активном и в неактивном состояниях в зависимости от стадии митотического цикла или факторов внешней и (или) внутренней среды. Если дифференцированные клетки сохраняют способность к делению, то спектр геной активности клеток данного типа наследуются в ряду клеточных поколений. Поскольку в данном случае речь идет о наследовании не только общей генетической программы, но и о наследовании спектра функционально активных генов, то имеет место эпигенетическое наследование. Считается, что факультативное (модификационное) изменение активности генов носят временный характер и не наследуются (точнее, не наследуется долго). Даже если это так, то следует учитывать возможное возрастание уровня мутирования активно транскрибируемых локусов (Корогодин, 1982). Хотя наследуемые эпигенетические изменения носят массовый характер, охватывающий большинство клеток, и отличаются от единичных мутационных изменений соматических или половых клеток, но не следует забывать, что мутации половых клеток животных или соматических клеток растений, рано или поздно благодаря работе эпигенетических систем усиления, проявят себя в фенотипе и будут влиять на жизнеспособность (конкурентоспособность и т.д.) их обладателя. Например, клетки стеблевой меристемы образуют вегетативные ткани стебля и флоральную меристему, из которой формируются репродуктивные структуры и клеточные линии, дающие начало гаметам. Вследствие этого соматические мутации могут переходить в гаметы, что делает такие изменения потенциально эволюционно значимыми (Шилина и др., 2006).

Достижения системного подхода позволяют подойти и к решению композиционной проблемы. Эволюционные «достижения» можно рассматривать как результат эволюционного (постепенного) системогенеза, порождающего новые (эмерджентные) качества. Яркой иллюстрацией этого может быть «история» с оценкой эволюционной роли молекулы ^{23}S -рРНК, которая осуществляет присоединение аминокислот к синтезируемой в рибосоме молекуле белка (Марков, 2012). Определяющая важность этой молекулы в синтезе белка позволила предположить, что происхождение (эволюция) рибосом началась именно с этой молекулы. Однако молекула ^{23}S -рРНК слишком сложна, чтобы можно было представить ее появление одновременно, т.е. в готовом виде. Другими словами, необходимо было представить эволюцию молекулы ^{23}S -рРНК как цепь, *постепенно* сменяющих друг друга молекул-предшественниц, каждая из которых способна достаточно эффективно выполнять свою функцию. Действительно, оказалось, что молекулу ^{23}S -рРНК можно представить как систему, состоящую из 60 самостоятельных структурных блоков (элементов) и, что са-

мое важное, как систему, поддающуюся последовательной «разборке» без поломки остающихся элементов. Таким образом, удалось выделить фрагмент, составляющий 7 % от общей массы молекулы и представляющий каталитический центр молекулы. Р. Докинз, рассматривая последовательные стадии эволюции глаза, фактически, тоже производил своеобразную декомпозицию такого сложного образования, одномоментное возникновение которого (как, например, результат макромутации) представить невозможно. Важно также отметить, что эволюционная «сборка» упомянутого молекулярного агрегата и глаза осуществляется на разных структурно-функциональных уровнях из элементов, возникновение которых (субъединиц или тканей с новыми качествами) может произойти одномоментно. Фактически, эволюция «сводит» решение крупных задач (о существовании которых она, кстати, и не «подозревает») к последовательному (постепенному) решению ряда мелких.

Таким образом, постепенность, как одно из проявлений естественного отбора, кроме всего прочего (механизмов усиленной мутабельности функционально активных генетических локусов, генетической ассимиляции эпигенетических изменений, элементов эволюционной канализованности и др.) обеспечивается эпигенетическими механизмами усиления мутационных изменений и возможностью «эволюционного» существования промежуточных стадий на всех структурно-функциональных уровнях организации, которые случайно и/или неслучайно достраиваются новыми структурами, повышающими их конкурентоспособность. Более того, следствием принципа естественного отбора является требование возможности декомпозиции наличных качественных признаков до более простых. Если же это условие не соблюдается, то приходится констатировать либо неполноту палеонтологической летописи (вечная проблема «недостающего звена») либо неспособность исследователей осуществить такую декомпозицию спекулятивно (теоретически).

Литература

1. *Борзенков В.* Телеология в современной биологии // Высшее образование в России. – 2003. – № 4, с. 145-151.
2. *Докинз Р.* Слепой часовщик. М: Мир, 1993. – 317 с.
3. *Корогодин В.И.* Радиотаксоны и надежность генома // Радиобиология, 1982, Т. 22, в. 2, с. 147-154.
4. *Марков А.* Рождение сложности. Эволюционная биология сегодня: неожиданные открытия и новые вопросы. – М.: Астрель: CORPUS, 2012. 527 с.
5. *Михеев А.Н., Гродзинский Д.М.* О понятии «биологический отбор» (об экзогенной и эндогенной селекции) / В зб. наук. праць. Досягнення і проблеми генетики, селекції. – К.: Логос, 2007. с. 149-153
6. *Михеев А.Н., Гуца Н.И., Малиновский Ю.Ю.* Эпигенетические реакции клеток на действие ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиоэкология., 1999, т. 39, в. 5, с. 548 – 556.

7. Михеев А.Н., Шилина Ю.В., Гуца Н.И. Механизмы биологического усиления у растений и микроорганизмов в норме и патологии // Проблемы безопасности атомных электростанций і Чернобиля, 2005, вип. 3, частина 2, Парадигми сучасної радіобіології, с. 29 – 35.

8. *Физиологическая генетика.* /Под ред. М.Е. Лобашева и С.Е. Инге-Вечтомова/ Л.: Наука, 1976. 472 с.

9. Шилина Ю.В., Михеев А.Н., Гуца Н.И., Овсянникова Л.И., Дяченко А.И. Связь эволюционного формирования растений с особенностями стресс-индуцированных перестроек их геномов / В сб. наук. праць «Фактори експериментальної еволюції. Т. 3» – К.: Логос, 2006. с. 57-61.

Резюме

В статье проблема обоснования эффективности естественного отбора сводится к проблеме обоснования возможности «разложения» на жизнеспособные элементы системы, «доказавшей» свое эволюционное преимущество (адаптированность). Показано, что работа механизма биологического усиления обеспечивает, в конечном итоге, заметное фенотипическое проявление мутационных изменений, что, в свою очередь, позволяет биологической системе проявить свое модификационное «приобретение» и продолжать участвовать в «эволюционном конкурсе».

У статті проблема обґрунтування ефективності природного добору зводиться до проблеми обґрунтування можливості «розкладання» на життєздатні елементи системи, що «довела» свою еволюційну перевагу (адаптованість). Показано, що робота механізму біологічного підсилення забезпечує, зрештою, помітний фенотипічний прояв мутаційних змін, що, в свою чергу, дозволяє біологічній системі проявити своє модифікаційне «придбання» і продовжувати брати участь в «еволюційному конкурсі».

In the article the problem of grounding of efficiency of natural selection is taken to the problem of grounding of possibility of «decomposition» on the viable elements of the system, «proving» the evolutionary advantage (adaptability). It was shown that work of mechanism of the biological strengthening provides, in the end, the noticeable phenotypical effect of mutational changes, which allows to the biological system to show the modification acquisition and continue the participating in an «evolutional competition».

ПАСТЕРНАК С. Л., АНДРИЕВСКИЙ А. М.

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,

Украина, 65058, Одесса, пер. Шампанский, 2, e-mail: uruz-pas@mail.ru

ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ И ЭКСПРЕССИЯ АЛЛЕЛЕЙ ЛОКУСА β -EST В ЛАБОРАТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *DROSOPHILA MERCATORUM*

Использование искусственно созданных популяций в качестве объектов изучения полиморфизма по каким-либо генным локусам удобно по причине того, что все особи в этих популяциях находятся примерно в равных условиях и по частоте встречаемости какого-либо аллеля можно судить о его адаптивной ценности в данных условиях. А так как, искусственные

популяции, как правило, поддерживаются при оптимальных для данного организма условиях, то увеличение частоты встречаемости соответствующего аллеля, по сравнению со стандартным распределением 1 : 1, характерным для идеальной равновесной популяции, будет свидетельствовать о том, что этот аллель является доминантным и даёт организму адаптивное преимущество. То же самое касается и генотипов – чем чаще в популяции встречается тот или иной генотип, тем более жизнеспособны его носители.

Удобным методом определения частот встречаемости аллелей в популяции и, как следствие, их адаптивного значения является метод нативного электрофореза белков с последующим гистохимическим выявлением уровня экспрессии изучаемого фермента [4]. Используя эти методы, можно установить не только частоты встречаемости аллелей и генотипов, но и их функциональную активность – генотипические особенности экспрессии. При этом можно ожидать, что у наиболее часто встречаемых аллелей и генотипов уровень экспрессии будет выше, что также будет свидетельствовать о доминантности.

Исходя из этого, целью данной работы было определить частоты встречаемости аллелей локуса β -*Est* и генотипические особенности экспрессии аллозимов β -эстеразы в лабораторной популяции *Drosophila mercatorum*. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: 1) определить частоты встречаемости аллелей по локусу β -эстеразы; 2) определить частоты соответствующих генотипов; 3) определить уровень экспрессии каждого из аллозимов гомо- и гетерозигот; 4) сравнить суммарную экспрессию аллозимов гетерозигот с экспрессией аллозимов гомозигот.

Материалы и методы

Объектом исследования служила лабораторная популяция *Drosophila mercatorum* (Patterson et Weeler, 1942), культивируемая в Лаборатории физико-химических методов исследования ОНУ имени И. И. Мечникова на протяжении года (мухи выделены из природной популяции *Drosophila melanogaster* «Приозёрная» (Чернобыльская зона отчуждения) Андриевским А. М.). Развитие мух проходило при стабильной температуре +25 °С на стандартной четырёхкомпонентной питательной среде [5].

Полиморфизм β -эстеразы и экспрессию её аллозимов изучали методом нативного электрофореза в полиакриламидном геле с последующим гистохимическим выявлением ферментных фракций. Для этого отдельно взятых имаго гомогенизировали в 10 мкл 0,1 М глицин-NaOH буфера pH 9,0, содержащего 1 % тритона X-100. Гомогенаты центрифугировали при 10 000 g в течении 15 мин на холоде. Далее, полученные экстракты смешивали с 5 мкл 0,01 % бромфенолового синего, приготовленного на 60 % растворе сахарозы, вносили в слоты гелевого блока и проводили электрофорез при силе тока 50 мА. После электрофоретического разделения ферменты, находящиеся в гелевом блоке, обнаруживали с помощью β -нафтилацетата и соли диазония. Затем гели сканировали при высоком разрешении и по-

лученные электрофореграммы денситометрировали с помощью специальной компьютерной программы «TotalLab». Значения площадей пиков электрограммы использовали как меру экспрессии фермента, исходя из того, что площадь каждого пика прямо пропорциональна количеству образовавшегося продукта реакции в зоне локализации фермента [4].

Кроме того, используя полученные электрофореграммы, устанавливали фенотипы и соответствующие им генотипы по наличию либо отсутствию в гелевом блоке тех или иных продуктов аллельных генов локуса β -эстеразы. Ожидаемые частоты генотипов и аллелей по локусу β -эстеразы в выборке $n = 40$ находили, пользуясь уравнением Харди – Вайнберга. Соответствие наблюдаемого расщепления признаков теоретически ожидаемому оценивали с помощью метода χ^2 [6].

Результаты и обсуждение

Гистохимическое выявление аллозимов β -эстеразы после их электрофоретического разделения показало наличие у имаго *Drosophila mercatorum* трёх форм этого фермента. Электрофоретически наиболее подвижная форма (F) характеризуется величиной Rf , равной 0,360, наименее подвижная (S) имеет $Rf = 0,320$. Также имеется и третья форма, с $Rf = 0,340$. Все три электроморфы на электрофореграммах хорошо проявляются при использовании в качестве субстратов нафтоловых эфиров уксусной кислоты, что даёт возможность безошибочно идентифицировать эти формы фермента как самостоятельные продукты разных аллелей локуса β -Est. Кроме β -эстеразы, β -нафтилацетат способна расщеплять также ацетилхолинэстераза, но она имеет значительно меньшую величину Rf и легко идентифицируется [1]. Судя по данным литературы [7], β -эстераза *D. mercatorum*, вероятно, представляет собой димер. Это может объяснять наличие трёх электроморф (аллозимов), два из которых (S и F) образуются в результате гибридизации продуктов одного аллеля (гомодимеры), а третий (M) – двух (гетеродимер). Таким образом, фракция S -аллозима в гелевом блоке соответствует генотипу SS , фракция F -аллозима – генотипу FF , а фракция S -, M - и F -аллозимов – генотипу SF (рис. 1).

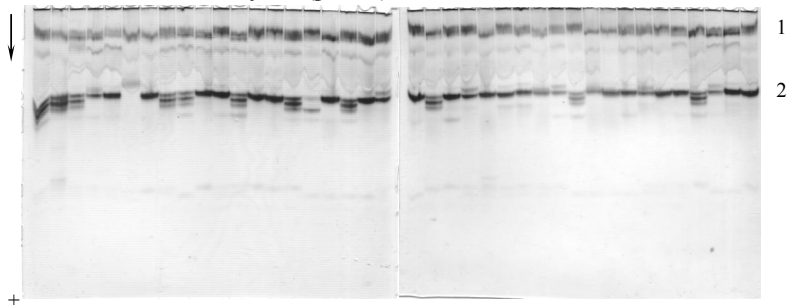


Рис. 1. Экспрессия эстераз у *Drosophila mercatorum*: Субстрат – β -нафтилацетат. 1 – ацетилхолинэстераза; 2 – β -эстераза

Как видно из рисунка 2, частоты встречаемости генотипов сильно отличаются от ожидаемого распределения 1 : 2 : 1, которое могло бы наблюдаться, если бы оба аллеля имели одинаковое адаптивное значение. В данной выборке ($n = 40$) преобладают гомозиготы по аллелю S – их 70 %, что в 2,8 раза превышает ожидаемую частоту для идеальной популяции. Гетерозигот FS – 27,5 %, а гомозигот FF – всего 2,5 %, что соответственно в 1,8 и в 10 раз ниже ожидаемых частот в случае селективной равноценности аллелей. Найденное значение χ^2 (44,55) значительно превышает табличное значение (5,99) при уровне значимости 0,05 и двух степенях свободы. Всё это свидетельствует о том, что в исследуемой популяции действует отрицательный отбор, направленный на фенотипы, характеризующиеся наличием F -аллозимов. В то же время, наблюдаемое соотношение разных генотипов в экспериментальной популяции практически совпадает с теоретически ожидаемым распределением гомозигот и гетерозигот в многочисленной реальной панмиктической популяции. Рассчитанный показатель χ^2 составил в этом случае 0,017, что значительно ниже табличного значения (5,99). Следовательно, процесс, вызывающий асимметрию генетической структуры экспериментальной популяции по данному признаку можно считать закономерным [3].

По всей видимости, гомозиготы по F -аллелю значительно менее жизнеспособны, чем гетерозиготы и гомозиготы по S -аллелю. Таким образом, можно говорить о том, что S -аллель является условно доминантным, а F -аллель – условно рецессивным. Частоты встречаемости S - и F -аллелей составляют соответственно 0,842 и 0,158.

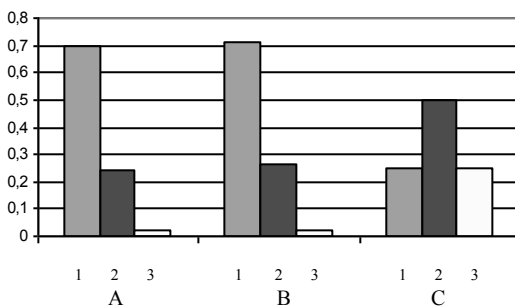


Рис. 2. Соотношение генотипических классов в экспериментальной, равновесной и идеальной популяциях *Drosophila mercatorum*, полиморфных по локусу β -эстеразы: По вертикали – частота встречаемости генотипов в долях от единицы. По горизонтали: А – наблюдаемое распределение генотипов в исследуемой популяции, В – ожидаемое распределение генотипов в равновесной популяции с экспериментально найденным соотношением аллелей, С – распределение генотипов в идеальной популяции. 1 – гомозиготные доминанты, 2 – гетерозиготы, 3 – гомозиготные рецесивы

Как показано на рисунке 3, у гетерозигот *D. mercatorum* наиболее выражен гетеродимерный аллозим *M*, являющийся генопродуктом обоих аллелей, а наименее – аллозим *F*. По всей видимости, аллозим *M* сильнее выражен по причине того, что продукты разных аллелей чаще гибридизуются, чем продукты одного аллеля. Несколько менее вероятное объяснение большей выраженности *M*-аллозима – это изменение четвертичной структуры гетеродимера, повышающее его сродство к субстрату.

У гомозигот доминантных *S*-аллозим значительно более выражен, нежели *F*-аллозим у гомозигот рецессивных. В то же время суммарная экспрессия аллозимов гетерозигот в 1,4 раза превышает таковую у гомозигот доминантных, что, говорит о гетерозисном эффекте [2].

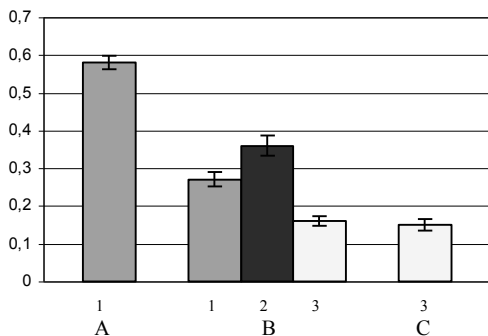


Рис. 3. Уровни экспрессии аллозимов β -эстеразы у носителей разных генотипов: По вертикали – уровень экспрессии в относительных единицах. По горизонтали: А – гомозиготы доминантные; В – гетерозиготы; С – гомозиготы рецессивные. 1 – *S*-аллозим, 2 – *M*-аллозим, 3 – *F*-аллозим

Выводы

У *Drosophila mercatorum* *S*-аллель β -эстеразного гена встречается с частотой 0,842, а *F*-аллель – с частотой 0,158. По всей видимости, в исследуемой популяции имеет место естественный отбор, направленный против носителей *F*-аллеля.

Наиболее часто в исследуемой популяции встречается гомозиготнo-доминантный генотип *SS* (70 %), наиболее редко – генотип *FF* (2,5 %).

У гомозигот наиболее выражен *S*-аллозим, у гетерозигот – *M*-аллозим.

Суммарная экспрессия аллозимов гетерозигот в 1,4 раза превышает таковую гомозигот доминантных, что говорит о гетерозисном эффекте.

Литература

1. Андреевский А. М. Влияние химических реагентов на проявление активности карбоксиэстераз *Drosophila melanogaster* // Мат. II Междунар. конф. «Дрозофила в экспериментальной генетике и биологии». – Одесса: Печатный дом, 2010. – С. 8 – 16.

2. Андриевский А. М. Генотипические особенности экспрессии аллозимов β -специфичной гидролазы эфиров карбоновых кислот у *Drosophila melanogaster* дикого типа // Цитология и генетика. – 2008. – № 6. – С. 34 – 42.

3. Андриевский А. М., Тоцкий В. Н. Генетическая структура экспериментальной популяции *Drosophila melanogaster*, полиморфной по локусу β -фильной эстеразы // Цитология и генетика. – 2006. – № 6. – С. 3 – 10.

4. Гааль Э., Медьешин Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических молекул. – М.: Мир, 1982. – 446 с.

5. Медведев Н. Н. Практическая генетика. – М.: Наука, 1968. – 294 с.

6. Рокицкий П. Ф. Введение в статистическую генетику. – Минск: Вышэйшая школа, 1978. – 448 с.

7. Ferreira S. M., Magalhaes L. E., Toledo S. A., Mogolowkin-Cohen Ch. A study of esterase isozymes in *D. mercatorum pararepleta* (*Drosophila*, Diptera) // Rev. Brasil. Genet. – 1981. – Vol. 4, N. 3. – P. 309 – 316.

Резюме

Изучали частоты встречаемости и экспрессию аллелей по локусу β -эстеразы (β -Est) в лабораторной популяции *Drosophila mercatorum*. После проведения щелочного электрофореза в полиакриламидном геле с последующим гистохимическим выявлением ферментов методом компьютерной денситометрии определяли уровень экспрессии S-, M- и F-аллозимов β -эстеразы. Установлено, что аллели и генотипы по локусу β -Est сильно различаются по частоте встречаемости и экспрессивности.

Вивчали частоти зустрічальності та експресію алелів за локусом β -эстеразы (β -Est) у лабораторній популяції *Drosophila mercatorum*. Після проведення лужного електрофорезу у поліакриламідному гелі з наступним гістохімічним виявленням ферментів методом комп'ютерної денситометрії визначали рівень експресії S-, M- та F-алозимів β -эстеразы. Встановлено, що алелі і генотипи за локусом β -Est сильно розрізняються за частотою зустрічальності та експресивністю.

The frequency of occurrence and expression of β -esterase alleles in laboratory population of *Drosophila mercatorum* has been investigated. The expression level of S-, M- and F-allozymes of β -esterase was established by computer densitometry after their electrophoretic separation and histochemical detection. Found that the alleles and genotypes at locus β -Est very differ in frequency of occurrence and expressivity.

**ПІСКУН Р.П., МОЛЧАН І.М., КОЛОМІЄЦЬ Н.Г., ВАЩУК А.А.,
ШЕВЧУК Т.І., ГОРБАТЮК С.М.**

Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова України, 21018
Вінниця, вул. Пирогова 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru

ЕПІГЕНЕТИЧНІ ПРИНЦИПИ ЕВОЛЮЦІЇ – ІСТОРІЯ І СУЧАСНІСТЬ

Сучасна синтетична теорія еволюції переживає стан глибокої кризи та вже не є парадигмою, що об'єднує біологічні знання. В умовах екологічної катастрофи, що наближається, в результаті використання в народному господарстві дійсно найбільших досягнень (логічної, але бездуховної) науки, ми починаємо переосмислювати наукову парадигму, звертати свою увагу

до витоків формування науки та розуміти, що історія науки – найважливіше джерело знань не лише про минуле, але і про майбутнє.

Матеріали і методи

Епігенетикою називають розділ біології про причини взаємодії між генами і їх продуктами, що формують фенотип. При епігенетичному формуванні відбувається спадковий прояв нової ознаки в результаті зміни структури хроматину без зміни первинної структури ДНК. Сучасні уявлення молекулярної біології дозволяють зробити законною, але відкинутою до теперішнього часу, логіку міркувань Ж.Б. Ламарка про успадкування набутих ознак [2, 4, 7]. Ось чому важливо сьогодні повернутись до джерел зародження еволюційної теорії Ламарка, яка органічно включає в себе біосферно-космічні механізми виникнення зміни, відтворення та виживання організмів.

Результати і обговорення

Завдо до народження наук «еволюція» і «генетика» Ж. Ламарк звернув увагу на феномени мінливості, відбору і спадковості: «Природа, що є, непорушним порядком речей, являє собою дійовий початок, вічно активний, який створює все, що ми здатні помічати, всі явища, які ми здатні спостерігати. Тіла, які б вони не були, зобов'язані їй своїм виникненням, своїми змінами, своїм руйнуванням, відтворенням і т. д., і, так як прояви цієї могутності підкоряються постійним законам, вона діє, як показує спостереження, завжди одноманітно, при одних і тих самих обставинах». «До тих пір поки вид буде існувати в одних і тих же умовах, він завжди збережеться незмінним» [8].

Пов'язавши причину мінливості з умовами існування, Ж. Ламарк висловив думку про вирішальну роль умов середовища (обставин) в порівнянні з генетично визначеним порядком речей (природою) в цій мінливості: «Дійсно, не можна обійти тут мовчанням причину, могутність якої безмежна і перевищує навіть могутність самої природи, бо причина ця керує всіма діями останньої. Цією причиною є... влада обставин, їх здатність видозмінювати всі дії природи та примушувати останню безперервно змінювати ті закони, які вона застосувала якби не було цих обставин, – влада обставин, яка взагалі визначає всі особливості кожного з її створінь, так, що саме цій причині слід приписувати надзвичайну їх різноманітність» [8].

Еволюція (за Ж. Ламарком) починається із зміни в довіллі та закінчується в генотипі (організації): «Все, що було придбане, зафіксоване або змінене в організації індивідумів протягом їх життя, зберігається шляхом розмноження та передається новим індивідуумам, які походять від індивідуумів, які зазнали цих змін [8].

Механізм спадкового закріплення змін, викликаних зовнішніми умовами, Ж. Ламарк уявляв наступним чином: «Оскільки речовини, підготовлені для споживання, є асимільованими частками, які представляють стільки різноманітних родів, скільки в тілі існує різноманітних частин, то поєднан-

ня цих різних часток, які не можуть бути використані ні для споживання, ні для росту, доставляють елементи для утворення надзвичайно малого за розмірами організованого тіла, цілком подібного тому, від якого воно походить».

Як видно в розумінні механізму спадковості погляди Ж.Ламарка та Ч.Дарвіна суттєво розрізнялися. Якщо Ч. Дарвін в своїй гіпотезі спадковості (пангенезису) передбачав зосередження в зародкові готових матеріальних зачатків (геммул) зі всіх частин особини; то Ж. Ламарк звертав увагу на зосередження у зародку різних регуляторних чинників зовнішнього середовища, що визначають реалізацію інформації про ці органи.

Голографічна природа космосу та кожного організму; формоутворююча значущість умов середовища, які «визначають фактично те, чим кожне тіло може бути» передбачають при вивченні та розробці методів управління формоутворенням звертати увагу не стільки на локалізацію, комбінування або зміну структурних генів (генетику спадковості), скільки на реалізацію генетичної інформації (фізіологію спадковості), що володіє «величезними можливостями «прояву» [8].

Всяка ознака, всяка властивість, «всяка здатність, – постійно підкреслював Ж. Ламарк, – є прояв сили, що дозволяє щось виконувати або виробляти; цей прояв сили, що властивий тілу, або органу, або системі органів, в яких він існує, до тих пір, поки не буде знищений порядок речей, що його обумовлює» [8]. Саме такий напрямок досліджень, пов'язаних, перш за все з обміном речовин, тобто фізіологією спадковості і мінливості мав на увазі В. Бетсон, запропонувавши виділити особливу дисципліну і дав їй назву «генетика».

Регуляторні генетичні механізми лежать і в основі видоутворення. Природа (по Ламарку) створила лише найпростіші організми, «щоб потім впродовж тривалого часу і за допомогою сприяючих тому обставин, спонукати до життя всіх інших». Як видно Ж. Ламарк стояв у витоків епігенетичної теорії еволюції, що розвивається в даний час, добре пояснює факти, які не в змозі пояснити синтетична еволюція, яка включає дарвінізм і менделізм на основі зміни генного складу популяцій і заміщення алелей.

Епігенетична теорія еволюції поширюється і на селекцію, яка є по суті еволюцією, що направляється волею людини у відповідності із законами природи. «Те, що природа здійснює впродовж тривалого часу, – відмічав Ж.Ламарк, – ми самі робимо щоденно, мимоволі змінюючи для будь-якої рослини ті умови, в яких вона зустрічається ...Кожному ботаніку відомо, що рослини, перенесені з їх батьківщини в сади з метою розведення, поступово настільки змінюються тут, що стають, в кінці кінців, невпізнаними ... Чи не людина надала посівній пшениці той стан, в якому ми зустрічаємо цю рослину зараз?... А скільки різноманітних порід домашніх курей і голубів створили ми шляхом виховання в різних умовах і в різних країнах!»

В даний час стає зрозумілим, що поняття «виховання», як і «навчання» відноситься до групи набутих ознак, поза зв'язком із зміною структурних генів. Мічурінське розуміння виховання використовується в сучасній генетиці в термінах епігенетичної і сигнальної спадковості [2,3].

Як «не всяке відчуття породжує уявлення, а лише відчуття помічене», так і не всякі сигнали зовнішнього середовища, а лише сприйняті, ведуть до мінливості індивідуума. Лише речовини «які, будучи асимільованими, приєднуються до останнього і стають його частиною», – вважав Ж.Ламарк [8]. Необхідною умовою генетичної асиміляції є чутливість (компетентність) реагуючої системи, здатної сприймати лише визначені сигнали навколишнього середовища та відповідати формоутворюючим процесом, в результаті активації генів, що раніше мовчали [6].

На сучасному етапі наукових досліджень епігенетичними називають зворотні зміни активності генів у процесі індивідуального розвитку організмів, які не пов'язані з порушенням нуклеотидної послідовності ДНК, але призводять до збереження стабільного (неактивного або активного) стану генів в ряду клітинних поколінь. В деяких випадках втрату генами активності (утворення гетерохроматину) пояснюють метилуванням ДНК і, навпаки, деметилування може спричинити активацію гена. Як відомо, метилування – це тимчасова хімічна модифікація нуклеотидної послідовності без порушення кодуючої властивості ДНК. У такому випадку зворотнє метилування розглядається як епімутація. На відміну від мутації, яка спричиняє зміну нуклеотидної послідовності, епімутація нуклеотидної послідовності не змінює, в той же час аномальне метилування в промоторній області може спричинити нездатність гена до експресії. Незважаючи на загрозу (можливість мутацій) при метилуванні, воно зберігається в процесі еволюції хребетних, тобто підтримується природним добром. Це пояснюється тим, що зворотнє метилування є одним з механізмів, що спричинює програмовану активацію генів. Уже встановлено, що порушення епігенетичних систем зворотнього метилування може змінювати нормальний онтогенез і спричиняти небажані наслідки. Так, порушення метилування спричинює активацію протоонкогенів, тому впливає на онкогенез. Спонтанне дезамінування 5-метилцитозину може спричинити пухлинний ріст. З метилуванням пов'язані карцинома нирок, ретино-бластома тощо. У ссавців і людини відмічений особливий вид метилування, який отримав назву батьківського геномного імпринтингу (від англ. imprint – залишати відбиток, слід, закарбувати) [1].

Наступним прикладом епігенетичних механізмів еволюції стало відкриття пріонових інфекцій, оскільки було виявлено принципово новий тип інфекційних захворювань, що відрізнявся від усіх раніше відомих за своєю природою виникнення і розвитку. Починаючи з 1993 року, пріонові хвороби ссавців і людини набули загально-біологічного значення, оскільки аналогічні білки були виявлені у грибів, насамперед у дріжджів [5]. Накопи-

чені факти призвели до формування концепції інфекційних білків-пріонів. Основний внесок до цієї концепції пов'язують з ім'ям С.Прузінера, який за свої досягнення у 1997 р. удостоївся Нобелівської премії і визначив, що пріонові хвороби мають три варіанти виникнення: а) спадковий; б) інфекційний; в) спорадичний.

При спорадичному варіанті важливо відмітити, що при одній і тій же первинній структурі, тобто одній і тій же амінокислотній послідовності, без будь-яких змін кодуючого гена, може виникнути кілька варіантів укладання білка пріона, і ці відмінні варіанти укладання відтворюються при наступному інфікуванні. Ці варіанти отримали назву штамів, або клонів. Вищевикладене спричинило виникнення гіпотези про існування своєрідного механізму копіювання конформації або гіпотезу конформаційних матриць. Копіювання конформації певних білків має місце в таких процесах, як утворення структур цитоскелета при рості актинових і тубулінових волокон, відтворення ядерної мембрани, формування зовнішнього кортекса у найпростіших. За останніми даними наукових досліджень молекулярних біологів і генетиків на конформаційному рівні відбуваються зміни основних тканинноспецифічних антигенів при дилатаційній кардіоміопатії.

На основі новітніх даних вчені допускають існування в клітині двох категорій матричних процесів: копіювання послідовностей нуклеотидів ДНК і РНК та копіювання конформації, що притаманне деяким білкам. Останнє твердження ставить питання про доповнення центральної догми генетики можливістю копіювання конформації білків. Дослідження показали, що феномен пріонів – не екзотика, і копіювання конформації інфекційних пріонів – це окремий випадок загальнобіологічного механізму, який лежить в основі епігенетичного успадкування.

Висновок. Таким чином, еволюція і середовищеутворююча функція біосфери визначає утворення і еволюцію її компонентів. Тобто, не зміни генотипів визначають еволюцію та її напрямок, а еволюція організмів в цілісній біосферно-космічній системі визначає зміни реалізації генотипів [10] і можливою основою нового еволюційного синтезу і є епігенетична теорія еволюції, у витоків якої стояв Ж.Б. Ламарк [9].

Література

1. *Баріляк І.Р., Ковальчук Л.С., Скибан Г.В.* Медико-генетичний словник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 371 с.
2. *Гродницький Д.Л.* Эпигенетическая теория эволюции как возможная основа нового эволюционного синтеза // Журн.общ.биол. – 2001. – Т.62, № 2. – С. 99-109.
3. *Животовский Л.А.* Наследование приобретенных признаков: эволюция по Ламарку-Дарвину // Биоразнообразие и динамика экосистем Северной Евразии. – Новосибирск: Наука, 2001. – С. 19.
4. *Животовский Л.А.* О наследовании приобретенных признаков // Материалы научной генетической конференции. – М.: МСХА, 2002. – С. 110-119.
5. *Инге-Вечматов С.Г.* Прионы дрожжей и центральная догма молекулярной биологии / Вестник Российской академии наук, 2000. – Т. 70. – № 4. – С. 299-306.

6. Корочкин Л.И. Введение в генетику развития. – М.: Наука, 1999. – 253 с.
7. Лавров С.А., Мавродиев Е.В. Эпигенетическое наследование признаков и его возможная роль в микроэволюции растений // Журн.общ.биол. – 2003. – Т.64, № 5. – С. 403-420.
8. Ламарк Ж.Б. Избранные произведения. Т.2. – М.: АН СССР. – 1959. – 995 с.
9. Молчан И.М. Ламарк прав // Материалы XIII Межд.симп. «Нетрадиционное растениеводство. Эниология. Экология и здоровье» Кн.1. – Симферополь. – 2004. – С. 59-73.
10. Шмальгаузен И.И. Организм как целое в индивидуальном и историческом развитии. – М.: Наука, 1982. – 383 с.

Резюме

Сучасні теоретичні та практичні розробки молекулярної біології і генетики дозволяють визнати закономірність логіки міркувань Ж.Б. Ламарка про причинність змін організмів у вигляді епігенетичних принципів еволюції.

Современные теоретические и практические разработки молекулярной биологии и генетики позволяют признать закономерность логики мышления Ж.Б. Ламарка о причинах изменений организмов в виде эпигенетических изменений организмов.

Modern theoretical and practical developments of molecular biology and genetics allow to acknowledge conformity to law of logic of reasonings of Zh.B. Lamarka about the causality of changes of organisms as epigenetichnikh principles of evolution.

**РОГОЖИН Е.А.¹, АНДРЕЕВ Я.А.¹, КОРОСТЫЛЕВА Т.В.²,
СЛАВОХОТОВА А.А.², ИСТОМИНА Е.А.², ЕГОРОВ Ц.А.¹, ГРИШИН Е.В.¹,
ОДИНЦОВА Т.И.²**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Россия, 177997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, e-mail: rea21@list.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Россия, 117809, Москва, ул. Губкина, 3.

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЗАЩИТНЫЕ ГЕВЕИНО-ПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM KHARAE*)

Антимикробные пептиды (АМП) играют ключевую роль в иммунном ответе растений к патогенам и насекомым-вредителям [1-3]. Они представляют собой структурно различные типы полипептидов, подавляющие рост и развитие широкого спектра патогенных микроорганизмов. АМП принадлежат к цистеин-богатым полипептидам и классифицируются на несколько семейств (тионины, дефензины, гевеино- и ноттино-подобные пептиды, циклотиды и липид-переносящие белки) [2, 4-5]. Состав АМП, который синтезируется в растениях, может различаться и регулироваться в зависи-

мости от фазы развития. В связи с интенсивным развитием геномных исследований, а также биоинформационного анализа различных АМП в геномах разных растений на настоящий момент выявлено большое разнообразие АМП-подобных аминокислотных последовательностей [6, 7].

Ранее из зерновок *T. kiharae* были выделены и структурно охарактеризованы два новых антимикробных пептида, названных WAMP-1a и WAMP-1b, различающихся между собой наличием С-концевого остатка аргинина [8]. Была установлена пространственная структура в водном растворе пептида WAMP-1a методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) [9]. Целью данной работы было установление структуры полноразмерных кДНК, кодирующих белки-предшественники WAMP, а также изучение степени экспрессии их генов при действии факторов абиотической природы.

Материалы и методы

Зерно *T. kiharae* было получено из коллекции Института общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН. Грибные фитопатогены: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* и *Bipolaris sorokiniana* были любезно предоставлены сотрудниками кафедры защиты растений РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева; *Aspergillus niger* был приобретен во Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ имени Г.К. Скрыбина РАН.

Клонирование кДНК, кодирующих пептиды WAMP, было осуществлено путем комбинации методов 3'- и 5'RACE как описано в работе [10]. Индукцию биотическим стрессом осуществляли путем обработки зерновок пшеницы, помещенных во влажные камеры, суспензиями конидий соответствующих фитопатогенов в 10% картофельно-морковном бульоне. Зерновки предварительно стерилизовали в 70%-ном этаноле в течение 2 мин, после чего промывали водой. Для выделения тотальной РНК были использованы трехдневные проростки. Для определения степени экспрессии мРНК *wamp* была осуществлена процедура ОТ-ПЦР. Синтез первой цепи кДНК на РНК-матрице проводили с использованием набора RivertAid («Fermentas», Литва) и oligo(dT18)-праймера. Ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (GAPDH) был взят в качестве контроля при нормализации образцов.

Результаты и обсуждение

В результате амплификации концов кДНК методами 3'- и 5'RACE на основе специфичных праймеров были установлены последовательности двух предшественников пептидов семейства WAMP, названных Wamp-1 и Wamp-2 соответственно (рис. 1). Показано, что они высоко гомологичны между собой и состоят, соответственно, из 116 и 117 а.к.о., включают в себя сигнальный пептид длиной 34 и 35 остатков, участок зрелого пептида (45 остатков) и С-концевой продомен (37 остатков). В то же время, сдвиг рамки считывания при трансляции последовательности кДНК на позиции +3 и +2, соответственно, существенным образом увеличивает степень их гомо-

логии с С-концевой частью каталитических доменов растительных хитиназ I и IV классов.

Wamp-1 (1) MKPHMSATVLR-APRVAAILLAVVLAAVLATAVNGAQRCGDQARGAKCPNLCCKGKYGFCGSGDAYCGAGSC
 Wamp-2 (1) MKPHMSATVLRGAPRVAAILLAVVLAAVLATAVNGAQRCGDQARGAKCPNLCCKGKYGFCGSGDAYCGKSGC

Wamp-1 (72) QSQCRGCRDDVVGQALPAEPGSTRATAASSASARGLNLTATTGGP

Wamp-2 (73) QSQCRGCRDDVVGHALPAEPGSTRATAASSASATGLNLTATTGGP

Рис. 1. Выравнивание предшественников пептидов WAMP. Варибельные остатки выделены серым фоном, последовательности сигнальных пептидов и С-концевых продоменов подчеркнуты.

Анализ степени экспрессии генов *wamp* в проростках пшеницы в ответ на заражение фитопатогенными грибами показал наличие ее видоспецифичности в зависимости от действующего агента. Было установлено, что заражение зерновок видами рода *Fusarium* вызывало стабильное увеличение уровня транскриптов *wamp*, при этом наибольший эффект был показан в варианте с *F. oxysporum* (увеличение в 5 раз). Также значительное возрастание экспрессии целевых генов было индуцировано действием гриба *B. sorokiniana*, который является специфическим патогенном культурных злаков (рис. 2).

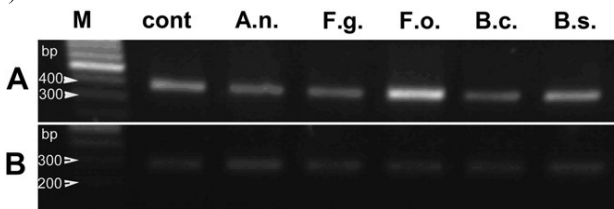


Рис 2. Анализ уровня транскрипции генов *wamp* в ответ на биотический стресс, индуцируемый грибной инфекцией. Амплификация кДНК (А) выполнена с праймеров 1dir2 и Trev (34 цикла); с GAPDH-специфических праймеров (В) с целью нормализации ДНК в образцах. М – маркеры молекулярных масс, cont – контрольные (не инфицированные растения); A.n., *Aspergillus niger*; F.g., *Fusarium graminearum*; F.o., *Fusarium oxysporum*; B.c., *Botrytis cinerea*; B.s., *Bipolaris sorokiniana*

Выводы

1. Определены структуры полноразмерных кДНК, кодирующих белки-предшественники пептидов семейства WAMP.
2. По данным биоинформационного анализа сделано предположение об эволюционном происхождении *wamp* от генов растительных хитиназ I и IV классов.
3. Установлена различная степень экспрессии генов *wamp* в ответ на биотический стресс.

Литература

1. Benko-Iseppon A.M., Galdino S.L., Calsa T. Jr., Kido E.A., Tossi A., Belarmino L.C., Crovella S. Overview on plant antimicrobial peptides // Curr. Protein Pept. Sci. - 2010. - vol. 11. P.181-8.
2. Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C., Thevissen K., De Samblanx G.W., Osborn R.W. Antimicrobial peptides from plants // Crit. Rev. Plant Sci. - 1997. - vol. 16. P.297-323.
3. Castro M.S., Fontes W. Plant defense and antimicrobial peptides // Protein Pept. Lett. - 2005. - vol. 12. P.13-8.
4. Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J.M., Rodriguez-Palenzuela P. Plant defense peptides // Biopolymers (Peptide Science). - 1998. -vol. 47. P.479-91.
5. Padovan L., Scocchi M., Tossi A. Structural aspects of plant antimicrobial peptides // Curr. Protein Pept. Sci. - 2010. - vol. 11. P.210-219.
6. Silverstein K.A., Moskal W.A. Jr., Wu H.C., Underwood B.A., Graham M.A., Town C.D., VandenBosch K.A. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants // Plant J. - 2007. - vol. 51. P.262-280.
7. Silverstein K.A., Graham M.A., Paape T.D., VandenBosch K.A. Genome organization of more than 300 defensin-like genes in Arabidopsis // Plant Physiol. - 2005. - vol. 138. P.600-610.
8. Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A., Musolyamov A.Kh., Finkina E.I., Khadeeva N.V., Rogozhin E.A., Korostyleva T.V., Pukhalsky V.A., Egorov Ts.A., Grishin E.V. A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // FEBS J. - 2009. - vol. 276. P.4266-4275.
9. Dubovskii P.V., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A., Odintsova T.I., Grishin E.V., Egorov T.A., Arseniev A.S. Solution structure of a defense peptide from wheat with a 10-cysteine motif // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2011. - vol. 411. P. 14-18.
10. Andreev Y.A., Korostyleva T.V., Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Utkina L.L., Vassilevski A.A., Grishin E.V., Egorov T.A., Odintsova T.I. Genes encoding hevein-like defense peptides in wheat: Distribution, evolution, and role in stress response // Biochemie. - 2012. - vol. 94. P.1009-1016.

Резюме

В результате данной работы в зерновках *Triticum kiharae* идентифицировано три различных последовательности кДНК, кодирующих белки-предшественники антимикробных пептидов семейства WAMP. Предполагается, что предшественниками пептидов семейства WAMP могли быть хитиназы I и IV классов, у которых произошла делеция в участке ДНК, кодирующей каталитический домен данных ферментов. Также установлена различная реакция степени экспрессии генов на заражение фитопатогенными грибами.

В результаті даної роботи у зернівках *Triticum kiharae* ідентифіковано три різних послідовності кДНК, що кодують білки-попередники антимікробних пептидів родини WAMP. Припускається, що попередниками пептидів родини WAMP могли бути хітинази I та IV класів, у яких відбулася делеція в ділянці ДНК, що кодує каталітичний домен даних ферментів. Також встановлена різна реакція ступеня експресії генів на ураження фітопатогенними грибами.

Consequently, this work three novel cDNA sequences encoded WAMP antimicrobial peptide family precursors were identified into *Triticum kiharae* seeds. It's supposed that chitinases I and IV classes could be precursors of WAMP peptide family. There was a deletion in DNA site encoded a catalytic domain of these enzymes. The different reaction of gene expression level on infection of phytopathogenic fungi has been determined too.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ С УЧЁТОМ ПОЛОВЫХ РАЗЛИЧИЙ В РЕКОМБИНАЦИИ

Половые различия в рекомбинации – известное явление в разных таксонах (Korol, 2001). Одновременная оценка частот женской и мужской рекомбинации не вызывает трудностей, если родительские гаметы могут быть восстановлены на основе генотипа потомства. В более сложном случае, когда родительские гаметы не могут быть восстановлены из генотипов потомства, анализ максимального правдоподобия (ML) позволяет оценить половые частоты рекомбинации (Lawrence et al. 1979). Одним из новых элементов нашей работы является оценка половых частот рекомбинации для скрещивания гетерозигот $F_1 \times F_1$, когда по обоим сцепленным локусам аллельный состав родителей совпадает. Предлагаемый подход в оценке частот рекомбинации сочетается как с определением фаз сцепления, так и с их половой идентификацией. Статистически значимое различие частот мужской и женской рекомбинации, которое может повлечь отличия мужской и женской генетических карт, создают необходимость их взаимной коррекции. Итогом такой коррекции является построение правильной интегральной генетической карты хромосомы.

Оценка женской и мужской рекомбинации для интеркроссных данных ($F_1 \times F_1$)

Проблема низкого аллельного разнообразия у родителей. Для интеркроссных данных, одновременная оценка частот женской и мужской рекомбинации в хромосомном интервале возможна, когда на каждом из двух маркерных локусов в потомстве наблюдаются от 3-х до 4-х аллелей; тогда по генотипам потомства могут быть восстановлены генотипы родителей (Fig.1, скрещивания 1 или 2).

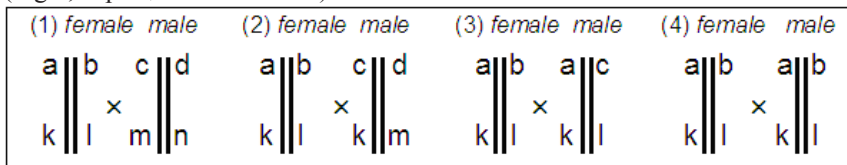


Рис. 1. Четыре типа родительских пар для двух локусов

Такие маркеры будем называть F1 маркерами. Как показал Lawrence et al. (1979), ML-анализ позволяет решить проблему также и в случае, когда один из двух сцепленных маркеров представлен в потомстве только двумя аллелями (скрещивание 3). Такие маркеры назовём F2 маркерами. Анализ модельных данных (Табл. 1) показывает, что и для интервала между двумя F2 маркерами (скрещивание 4) с неравными частотами женской и мужской

рекомбинаций решение может быть найдено. В таких ситуациях модель с $r_m \neq r_f$ имеет более высокое правдоподобие, чем модель с $r_m = r_f$, а оценки очень хорошо соответствуют симулируемым значениям параметров (Table 1), но пока мы не можем сказать, какая из двух получаемых ML-оценок соответствует женской рекомбинации, а какая мужской. Этот вопрос можно решить при совместном анализе F2 маркеров с соседними F1 маркерами. Подобный анализ возможен также, когда один (но не оба) из двух F2 маркеров – доминантный.

Статистическая значимость половых различий в рекомбинации.

Проверка гипотезы $H_0 \{r_m = r_f\}$ против $H_1 \{r_m \neq r_f\}$ может проводиться на основе стандартного LOD анализа: $LOD = \max \lg \mathbf{L}(r_m, r_f) - \lg \mathbf{L}(r^*)$, где r^* – частота рекомбинации, обеспечивающая максимум правдоподобия гипотезе H_0 . Например, для скрещивания (4), изображённого на Рис. 1.

$$\log \mathbf{L}(x,y) = \mathbf{a} \log((1-x)(1-y)/4) + \mathbf{b} \log(xy/4) + \mathbf{c} \log((x(1-y)+(1-x)y)/4) + \mathbf{d} \log(((1-x)(1-y)+xy)/2),$$

где (x, y) соответствует либо (r_m, r_f) , либо (r_f, r_m) ; и $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}, \mathbf{d}$ – объёмы генотипических классов потомства: $\mathbf{a} = n(aakk) + n(bbll)$, $\mathbf{b} = n(aall) + n(bbkk)$, $\mathbf{c} = n(aakl) + n(bbkl) + n(abkk) + n(abll)$ и $\mathbf{d} = n(abkl)$.

Таблица 1.

Результаты статистического оценивания для моделируемых данных.

Alleles	<i>n</i>	<i>x</i> , %	<i>y</i> , %	E_{x_0}	E_{y_0}	$E_{x_e} \pm \sigma_{x_e}$	$E_{y_e} \pm \sigma_{y_e}$	$E_r \pm \sigma_r$	<i>ELOD</i>	σ_{LOD}
4(3)×4(3)	200	10	20	10.3	19.7	10.3±0.1	19.7±0.0	15.0±1.9	1.719	1.118
4(3)×4(3)	500	10	20	10.0	19.8	10.0±0.1	19.8±0.0	14.9±1.0	4.423	1.634
4(3)×4(3)	200	10	30	10.3	29.3	10.3±0.1	29.3±0.0	19.8±1.9	5.301	1.881
4(3)×2	200	10	20	10.3	19.7	10.3±1.8	19.7±1.7	15.2±1.9	0.928	0.675
4(3)×2	500	10	20	10.0	19.8	9.8±1.1	19.8±1.2	15.0±1.1	2.364	1.145
4(3)×2	200	10	30	10.3	29.3	10.2±2.1	29.4±1.7	20.3±2.1	2.714	1.152
4(3)×2	200	5	30	5.1	29.3	5.0±1.6	29.3±1.3	18.0±1.9	5.153	1.911
4(3)×2	200	5	35	5.1	34.4	5.0±1.6	34.4±1.2	21.0±2.1	6.861	2.098
2×2	200	5	30	5.1	29.3	5.8±4.7	28.6±3.7	18.0±1.9	0.564	0.580
2×2	500	5	30	4.9	29.9	5.1±2.9	29.6±2.4	18.3±1.2	1.156	0.880
2×2	200	5	35	5.1	34.7	5.6±4.3	33.9±3.3	21.0±2.1	0.834	0.719
2×2	500	5	35	4.9	35.1	5.1±2.5	34.8±1.9	21.3±1.3	1.859	1.135

В Таблице 1 приводятся средние для ста наборов данных, ML-оценки рекомбинационных частот (x, y) . Число аллелей в потомстве может изменяться от двух до четырёх; 4(3)×2 означает, что для первого маркера 4 или 3 аллеля присутствуют в потомстве, а для второго маркера – только 2; *n* – обозначает объём потомства для каждого из наборов моделируемых данных; E_{x_0}, E_{y_0} – средние наблюдаемые значения (x, y) по ста реализациям; $E_{x_e} \pm \sigma_{x_e}, E_{y_e} \pm \sigma_{y_e}$ – средние оцениваемые значения (x, y) и среднеквадратические отклонения от случившихся значений; $E_r \pm \sigma_r$ – среднее значение и среднеквадратическое отклонение от рекомбинационной частоты *r* при $x=y=r$; *ELOD* и σ_{LOD} – среднее значение и стандартное отклонение *LOD*, используемого для сравнения гипотез $H_1 (x \neq y)$ и $H_0 (x = y)$.

Восстановления фазы сцепления. Возможны три варианта расхождений между истинной ситуацией (1) и реальными ситуациями (2-4) для пары маркерных локусов (Fig. 2).

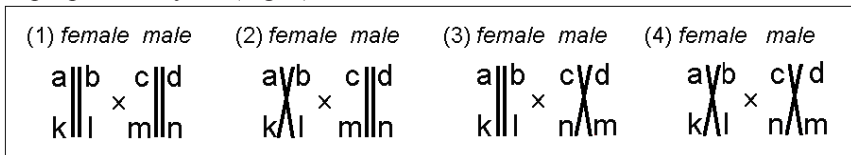


Рис. 2. Норма (1) и возможные нарушения фаз (2, 3, 4) для пары локусов

Из-за симметрии аналитических выражений только два варианта должны быть проверены, чтобы определить правильную фазу. Для сильно сцепленных маркеров, вариант с минимальным значением r^* , очевидно, будет представлять правильную фазу. При малых размерах выборки ($N \approx 100$) и сложном для анализа случае с двумя F2-маркерами этот критерий может дать неверный результат при несильном сцеплении маркеров. Это является следствием смещённости вниз оценок r_m , r_f и r^* . Однако, как правило, такие маркеры не будут соседними, и это не повлияет на их порядок.

Поиск полового соответствия частот рекомбинации для F2 локусов. Для каждой пары F2-маркеров вычисляются два рекомбинационных расстояния и значимость их отличия. Выбрав порог значимости (его в этой задаче можно брать больше величины 0.05, например, 0.1), мы, в случае превышения порога, в обе матрицы расстояний между маркерами заносим одинаковые значения, равные рекомбинационному расстоянию, найденному в предположении $r_m = r_f$. В противном случае, получив два значимо отличающихся рекомбинационных расстояния, мы должны решить, какое из них женское расстояние, а какое – мужское. Для получения такого решения предлагается анализ, использующий близкие F1-маркеры или ВС-маркеры (маркеры популяции у которой один из родителей был гомозиготен по соответствующему маркеру), для которых расстояния между ними и маркерами рассматриваемой пары F2-маркеров известны, а также указано их половое соответствие.

Построение генетической карты с использованием женских и мужских частот рекомбинаций между маркерами. Получив две матрицы рекомбинационных расстояний между маркерами – мужскую и женскую, главным становится вопрос построения генетической карты. Можно строить независимо эти две карты, а затем на основании этих двух карт, строить интегральную карту. Её построение усложняется рядом обстоятельств. Если бы все маркеры женской части совпадали бы со всеми маркерами мужской, а мужские и женские рекомбинационные расстояния для каждой пары маркеров не отличались бы или отличались статистически незначимо, задача сразу бы свелась к традиционной, в которой находится единственное расстояние для каждой пары маркеров. Однако это не так для части маркеров.

Более того, некоторые маркеры не являются общими и принадлежат либо женской, либо мужской группе маркеров. Наконец, наличие разных типов маркеров свидетельствует о разном качестве данных, которые используются для определения рекомбинационного расстояния, т.е. о разном уровне статистической ошибки, которая, например, значительно выше для F2-маркеров по сравнению с трёх-аллельными F1-маркерами.

Ранее нами был развит подход с целью построения интегральной карты на основе многих вариантов генетических карт (Mester et al. 2010). На малом числе вариантов, в данном случае их всего два, этот подход может не работать, когда между частотами женской и мужской рекомбинации имеется значительная разница. В этом случае эффективным может оказаться критерий, в котором минимизируется сумма рекомбинационных расстояний в соответствии с минимальной матрицей расстояний, т.е. матрицей, в которой между любыми двумя маркерами принимается расстояние, минимальное из двух – женское и мужское.

Алгоритмы быстрых вычислений частот женской и мужской рекомбинаций. Разрабатываемые нами алгоритмы картирования связаны с многократным вычислением рекомбинационных расстояний между маркерами, включая верификационную процедуру (Mester et al. 2003), используемую при построении карты. Верификационная процедура на основе jackknife или bootstrap анализа осуществляет **многократное** построение порядков женской и мужской группы сцепления, для выявления зон неустойчивого соседства маркеров. Поэтому, с целью достижения приемлемой скорости решения задачи, разрабатываются быстрые алгоритмы оптимизации рассматриваемых функций правдоподобия. Скорость вычислений, конечно, определяется парой маркеров, для которой вычисляется расстояние. Для случаев 1 и 2 (Рис. 1) всё считается по формулам, поэтому время расчёта минимальное. Для случая (3) частоты зигот:

$$f(ad,kl)=f(bc,kl)= ((1-r_m)(1-r_f)+r_m r_f)/4, f(bd,kl)=f(ac,kl)= (r_m(1-r_f)+(1-r_m)r_f)/4,$$

$$f(bd,ll)=f(ac,kk)= (1-r_m)(1-r_f)/4, f(ad,kk)=f(bc,ll)= (1-r_m)r_f/4,$$

$$f(ad,ll)= f(bc,kk)= r_m(1-r_f)/4, f(bd,kk)=f(ac,ll)= r_m r_f/4.$$

Логарифм правдоподобия в предположении $r_m \neq r_f$:

$$\log L(r_f, r_m) = \mathbf{a} \log(((1-r_m)(1-r_f)+r_m r_f)/4) + \mathbf{b} \log((r_m(1-r_f)+(1-r_m)r_f)/4) + \\ + \mathbf{c} \log((1-r_m)(1-r_f)/4) + \mathbf{d} \log((1-r_m)r_f/4) + \mathbf{e} \log(r_m(1-r_f)/4) + \\ + \mathbf{f} \log(r_m r_f/4),$$

где $\mathbf{a} = n(ad,kl)+n(bc,kl)$, $\mathbf{b} = n(bd,kl)+n(ac,kl)$, $\mathbf{c} = n(bd,ll)+n(ac,kk)$, $\mathbf{d} = n(ad,kk)+n(bc,ll)$, $\mathbf{e} = n(ad,ll)+n(bc,kk)$, $\mathbf{f} = n(bd,kk)+n(ac,ll)$.

Для оптимизации $\log L(r_f, r_m)$ можно использовать метод Ньютона – Рафсона (Н-Р). Использование такой процедуры обеспечивает сходимость процесса оптимизации за несколько шагов, но не для произвольных зна-

чений r_m^* и r_f^* : выбор начальной точки тоже играет роль. Все негативные особенности применения метод Н-Р при решении огромного числа двумерных задач оптимизации с ограничениями могут встретиться, поэтому используется эффективные способы их избежать.

Выводы

Проведённый анализ позволяет учесть при поиске рекомбинационных расстояний между маркерами существующее отличие женского и мужского мейозов. При наличии значимых различий между частотами женской и мужской рекомбинации возможна существенная коррекция существующих генетических карт, построенных без учёта этих различий. Помимо картирования, такой подход обеспечивает инструменты для более точного анализа свойств, сцепленных с полом.

Литература

1. *Korol A.B. Recombination.* // In: Encyclopedia of Biodiversity. – Academic Press. – San Diego. -2001. – vol.5. P.53-71.
2. *Lawrence M.L., Cornish M.A. and Hayward M.D.* Simultaneous estimation of male and Female linkage from a single intercross family // *Heredity*.-1979.-vol.43, № 1.-107-121.
3. *Mester D., Ronin Y., Minkov D., Nevo E., Korol A.* Constructing large scale genetic maps using evolutionary strategy algorithm.//*Genetics*.- 2003. -vol.165. -P: 2269- 2282.
4. *Mester, D., Y. Ronin, M. Korostishevsky, Z. Frenkel, O. Bråysy, W. Dullaert, B. Raa, and A. Korol,* Discrete Optimization for Some TSP-Like Genome Mapping Problems. Chapter in the book «Operations Research: Decision Analysis, Optimization, and Applications». Editors: Juan Varela and Sergio Acuna. Nova Science Publishers, Inc. – 2010. – P.1-41.

Резюме

Оцениваются частоты женской и мужской рекомбинации для интеркроссных данных с гетерозиготными родителями, имеющими от двух до четырёх аллелей в локусе. Учёт значимых половых различий в рекомбинации позволяет существенно корректировать генетические карты, построенные без их учёта. Помимо картирования, такой подход даёт инструменты для более точного анализа свойств, сцепленных с полом.

Оцінюються частоти жіночої та чоловічої рекомбінації для інтеркросних даних з гетерозиготними батьками, що мають від двох до чотирьох алелів у локусі. Облік значущих статевих відмінностей у рекомбінації дозволяє істотно коректувати генетичні карти, що побудовані коли залежність від сексу ігнорується. Крім картування, такий підхід дає інструменти для більш точного аналізу властивостей, зчеплених зі статтю.

We consider here the problem of estimation female and male recombination rates from intercross data when the two heterozygous parents carry together two to four alleles per locus. Taking into account sex dependence of recombination rates allows improving genetic maps compared to the maps obtained when sex dependence is ignored. In addition to reliable mapping, this approach provides tools for more accurate analysis of sex-linked properties.

САМАТАДЗЕ Т.Е.^{1,2}, АМОСОВА А.В., СУСЛИНА С.Н.², ЗАГУМЕННИКОВА Т.Н.³, БЫКОВ В.А.^{2,3}, ЗЕЛЕНИН А.В.¹, МУРАВЕНКО О.В.¹

1 – Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Россия. 119991, Москва, ул. Вавилова, 32, e-mail: tsamatadze@gmail.com.

2 – ГОУ ВПО Российский университет дружбы народов, Россия, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6, e-mail: suslina@yandex.ru

3 – Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений РАСХН, 117216, Москва, ул. Грина, 7, e-mail: vilarnii@mail.ru

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАРИОТИПОВ ТРЕХ ВИДОВ *MACLEAYA*

Устойчивость к антибиотикам, возникшая у многих патогенных микроорганизмов, заставляет уделять особое внимание растениям, содержащим вещества, которые обладают антимикробным, фунгицидным или противовирусным действием. К таким растениям принадлежит маклея (*Macleaya*) – многолетнее травянистое растение, относящееся к сем. Маковых (*Papaveraceae*). В состав рода *Macleaya* входят три вида: маклея сердцевидная *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br., маклея мелкоплодная – *Macleaya microcarpa* (Maxim.) Fedde и маклея кьюская – *M. kewensis* Turrrill., хорошо различающиеся между собой по комплексу систематических признаков. В наземной части маклеи содержится комплекс изохинолиновых алкалоидов, обладающих биологической активностью. Эти вещества являются главными действующими веществами выпускаемого в России препарата «Сангвиритрин», обладающего широким спектром антимикробной активности.

В естественных условиях в нашей стране маклея не произрастает, поэтому существует необходимость создания все новых перспективных форм маклеи с высоким содержанием биологически активных веществ. Это требует всестороннего изучения генетических особенностей генома маклеи. Ранее с помощью комплекса молекулярно-цитогенетических методов был изучен кариотип *M. cordata* (Саматадзе и др., 2012). В геноме этого вида была проведена идентификация индивидуальных хромосом по рисункам С-бэндинга и распределению 26S и 5S рДНК, составлена кариограмма и видовая идиограмма вида. В настоящем исследовании будут изучены кариотипы двух других видов рода *Macleaya* с использованием тех же хромосомно-молекулярных маркеров. С целью уточнения геномных взаимоотношений и филогенетических связей видов рода *Macleaya* будет проведено сравнительное исследование хромосом в геномах всех трех видов, что необходимо для дальнейшей успешной селекции новых форм маклеи с высоким содержанием алкалоидов.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили делящиеся клетки корневищ, молодых листьев и молодые соцветия трех видов рода *Macleaya*: мак-

леи сердцевидной – *M. cordata*, маклеи мелкоплодной – *M. microcarpa* и маклеи кьюской – *M. kewensis*, выращенных в Ботаническом саду Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР, Москва). При приготовлении хромосомных препаратов использовали технологию, разработанную ранее (Муравенко, Зеленин, 2009). При приготовлении препаратов для изучения мейоза использовались молодые бутоны маклеи. На стадии заложения цветков растительный материал фиксировали в фиксаторе Ньюкомера. Для окрашивания материал помещали в 1% раствор ацетокармина на 30 минут при комнатной температуре. Готовили препараты в капле 45% уксусной кислоты, раздавливая препаративной иглой материал до образования монослоя клеток. Подсчет числа хромосом и изучение характера конъюгации проводили на высушенных постоплодных ацетокарминовых препаратах, окрашенных флуорохромным красителем DAPI. Для окрашивания хромосом DAPI в среду для заключения препаратов CITIFLUOR (UKC CHEM.LAB) добавляли 0.125 мкг/мл 4,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, «Serva»). FISH проводили, используя пробы генов 26S и 5S рРНК, полученные с помощью ПЦР из геномной ДНК *Linum austriacum* L. по ранее описанной методике (Семенова и др., 2006). Пробу 26S рДНК метили биотином с помощью набора Bio Nick mix translation kit («Roche», США), а пробу 5S рДНК – дигоксигенином с помощью Dig Nick mix translation kit («Roche», США). Для выявления мест гибридизации зонда 5S рДНК использовали антитела к дигоксингенину, конъюгированные с родамином («Roche», США), а для выявления локализации гибридизации зонда 26S рДНК – авидин-флуоресцеин («Vector», США). Отобранные хромосомные пластинки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX61, снабженной черно-белой ПЗС камерой CoolSnap («RoperScientific Inc.», США). Полученные изображения обрабатывали, используя программы хромосомного анализа, согласно технологии, принятой в лаборатории (Муравенко, Зеленин, 2009).

Результаты и обсуждение

Результаты морфометрического анализа С-окрашенных хромосом у трех видов маклеи показали, что длины хромосом всех и видов находятся в пределах от 1,7 до 3,4 мкм и представлены метацентрическими и субметацентрическими хромосомами, постепенно убывающими по длине. На основании морфометрического анализа были составлены формулы кариотипов для каждого вида. Показано, что *M. microcarpa* и *M. kewensis* имеют не только одинаковое число хромосом $2n=20$, но и формулы кариотипов ($14m + 2sm + 4s^l$). *M. cordata* содержит также $2n=20$, однако имеет другую формулу кариотипа ($16m + 2sm + 2s^l$).

Сравнительный анализ кариотипов трех видов маклеи по рисунку С-окраски показал в целом сходный рисунок распределения С-бэндов. Мелкие и средних размеров С-бэнды локализируются в теломерных и интеркалярных районах хромосом. Прицентромерные блоки хромосом, как правило,

являются наиболее крупными и меньше варьируют по величине. Визуальный анализ выявил, что в кариотипе у *M. kewensis* обычно наблюдаются более крупные прицентромерные С-бэнды, чем у кариотипов *M. cordata* и *M. microcarpa*. Теломерные интеркалярные и прилегающие к вторичным перетяжкам С-бэнды были высокополиморфными у всех трех видов маклеи. Все хромосомы *M. cordata* и *M. microcarpa* идентифицированы по рисункам С-бэндинга и составлены их кариотипы в соответствии с цитологической классификацией хромосом в кариотипе *M. cordata*. Несмотря на сходство по положению С-бэндов по длине хромосом, изученные виды маклеи различаются по их размерам. Хромосомы *M. kewensis*, содержат обычно больше гетерохроматина, чем хромосомы *M. microcarpa* и *M. cordata*, в хромосомах которого в отличие от других двух видов картирован только один сайт генов 26S рРНК. Это различие обусловлено более крупными размерами околоцентромерных и приспутничных С – бэндов. Сходство исследованных видов маклеи по морфологии хромосом и положению С-бэндов говорит о том, что их геномы близкородственны, но в них в процессе видообразования произошли количественные изменения повторяющихся последовательностей ДНК.

Известно, что рибосомная ДНК является высоко консервативной, содержит повторяющиеся семейства генов с сотнями и тысячами копий и сосредоточена в одном или более кластерах на одной или многих хромосомных парах (Pedersen, Linde-Laursen, 1994). Сайты рДНК легко картируются на хромосомах при проведении флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Расположение рибосомных генов на хромосомах часто используются в качестве молекулярных маркеров для анализа филогенетических связей между родственными геномами (Hanson *et al.*, 1996). Изучение локализации рибосомных генов с помощью двухцветного FISH-метода выявило сходное расположение сайтов 5S рДНК в хромосомах маклеи у всех трех видов. Сайт 5S рДНК локализован в середине длинного плеча хромосомы 4. Крупного размера сайт 26S локализован в области вторичной перетяжки ядрышкообразующей хромосомы 1 у всех трех видов маклеи, и среднего размера сайт 26S локализован на 6 спутничной хромосоме в кариотипах *M. microcarpa* и *M. kewensis*. Этот сайт отсутствует в геноме *M. cordata*. Новый сайт рибосомных генов мог возникнуть как в результате интрогрессивной гибридизации с другим видом, так и в результате внутригеномной реорганизации – перемещения генов 26S рРНК посредством перестроек или мобильных генетических элементов (Беляев, 2009). И, наоборот, в результате аналогичных причин в геноме *M. cordata* этот сайт 26S рДНК, был, по-видимому, инактивирован и утерян. В любом случае, геномы *M. microcarpa* и *M. kewensis* более близки между собой, чем с геномом *M. cordata*. Если учесть достаточно сходные рисунки С-окраски и локализации сайтов рДНК у хромосом геномов всех трех видов, то можно предположить монофилетическое происхождение рода *Macleaya*. Однако, в процессе видообразования

виды дивергировали в связи с исчезновением или возникновением второй спутничной хромосомы в геноме и изменением количества гетерохроматина. Увеличение гетерохроматина в геноме *M. kewensis*, может быть обусловлено необходимостью приспособления к другим местам обитания, что и привело, в конечном счете, к дивергенции этого вида. Косвенно, такая точка зрения подтверждается изменениями количества гетерохроматина в геномах интродуцентов *M. cordata*, выращиваемых в различных эколого-географических условиях (Саматадзе и др., 2012)

Сигналы гибридизации и 26S, и 5S рДНК на хромосомах вида *M. kewensis* были более интенсивными по сравнению с *M. cordata* и *M. microcarpa*. Вероятно, в геноме *M. kewensis* в процессе эволюции вместе с увеличением количества высокоповторяющихся последовательностей ДНК увеличивалось и число копий рибосомных генов.

Длина вторичной перетяжки на 6 хромосоме у *M. microcarpa* и *M. kewensis* изменялась незначительно в разных клетках и тканях в отличие от вторичной перетяжки спутничной хромосомы 1, которая значительно варьировала у всех трех видов маклеи. Показано, что размеры вторичной перетяжки коррелируют с различным функциональным состоянием ядрышкообразующих районов хромосом (ЯОР) (Muravenko *et al.*, 2009). По всей видимости, в геномах *M. microcarpa* и *M. kewensis* рибосомные гены на хромосоме 1 функционально более активны, по сравнению с рибосомными генами хромосомы 6. Возможно, что такое распределение функциональной активности является косвенным подтверждением гибридного происхождения геномов *M. microcarpa* и *M. kewensis*, которое было предположено при изучении морфологических признаков у *M. kewensis* (Turtill, 1958). На основании хромосомного анализа были построены видовые идиограммы генома *M. cordata*, *M. microcarpa* и *M. kewensis* – «хромосомные паспорта» видов с учетом всех вариантов рисунков С – бэндинга и указанием расположения 26S и 5S рДНК.

Изучение мейоза проводили на стадии метафазы I и анафазы I. Результаты исследования представлены в табл. 2. Сравнительное изучение мейоза выявило, что при его нормальном течении у всех трех видов маклеи наблюдалось 10 палочковидных бивалентов, и в клетках не были обнаружены хромосомные ассоциации (триваленты, квадринанты). Однако иногда встречались клетки, содержащие униваленты в метафазе I. Наличие открытых бивалентов не нарушает общего течения мейоза, но может указывать на ослабление конъюгации. Отсутствие конъюгации хромосом является причиной нарушений при прохождении последующих стадий мейоза. В норме центромерные районы, объединенных в биваленты хромосом, ориентированы к полюсам веретена деления. Полярная ориентация унивалентных хромосом в клетках исследуемых видов нарушена – чаще всего они находятся за пределами метафазной пластинки, сбоку от нее или у полюсов микроспорocyта. Клетки с нарушениями (клетки с унивалентами и т.д.)

составили у – *M. cordata* – 2,19 % , *M. microcarpa* 4,05 % и *M. kewensis* – 3,15 %.

В метафазе II и анафазе I у всех трех видов маклеи, в основном, встречались клетки с нормальным расхождением хромосом к полюсам, хотя также были обнаружены клетки с нарушениями (отставание хромосом, мосты, фрагментами и т.д.). У *M. microcarpa* и *M. kewensis* процент таких нарушений в клетках составил 5,43% и 4,59% соответственно, что выше, чем у *M. cordata* (2,24 %). Основной тип нарушений у всех видов маклеи в анафазе I и анафазе II состоит в отставании нескольких хромосом от основной группы деления и образовании мостов. Большинство отстающих хромосом не достигает полюсов и остается в цитоплазме. Когда наступает телофаза, они становятся микроядрами в клетках диад. Были выявлены клетки с деградацией хромосом. Процент микроспороцитов с нарушениями в анафазе I колебался между 2-4,5%, что практически является одинаковым с количеством нарушений в метафазе I. Отсутствие каких-либо значительных нарушений мейоза у изученных видов маклеи показало, что геномные реорганизации с которыми связано возникновение или исчезновение второй спутничной хромосомы произошли достаточно давно и в процессе эволюции образованы стабильные интегрированные целостности хорошо различающихся, хотя и близкородственных, геномов *M. cordata*, *M. microcarpa* и *M. kewensis*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 11-08-00716; Программой фундаментальных исследований РАН «Динамика генофондов растений, животных и человека»; ГК 16.512.11.2224; ГК 14.740.11.1376.

Выводы

Проведено сравнительное цитогенетическое изучение трех видов маклеи: маклеи сердцевидной – *M. cordata*, маклеи мелкоплодной – *M. microcarpa* и маклеи кьюской – *M. kewensis*. Установлено, что кариотипы *M. microcarpa* и *M. kewensis* больше схожи между собой, чем с *M. cordata*.

На основании морфометрического анализа составлены формулы кариотипов для каждого вида.

Построены видовые идиограммы – «паспорт» вида *M. cordata*, *M. microcarpa* и *M. kewensis* с учетом полиморфных вариантов рисунков С-бэндинга и указанием расположения сайтов 26S и 5S рДНК.

Анализ мейотических хромосом свидетельствует о генетической стабильности геномов маклеи.

Литература

1. Саматадзе Т.Е., А.В. Зеленин, С.Н. Суслина, А.В. Амосова, К.В. Попов, Т.Н. Загуменникова, А.Н. Цицилин, В.А. Быков, О.В. Муравенко. Сравнительная цитогенетическая характеристика форм *MACLEAYA CORDATA* (WILLD.) R. Br. из различных мест произрастания. // Генетика, 2012. Т. 48. № 1. С. 72-79.

2. Муравенко О.В., Зеленин А.В. Исследование хромосомной организации геномов мелкохромосомных растений. // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1516-1529.

3. Семенова О.Ю., Саматадзе Т.Е., Зеленин А.В., Муравенко О.В. Сравнительное изучение геномов видов льна секции *Adenolinum* и *Stellerolinum* с использованием флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) // Биологические мембраны. 2006. Т. 23. № 6. С. 453-460.

4. Pedersen C., Linde-Laursen. Chromosomal locations of four minor rDNA loci and a marker microsatellite sequence in barley. // Chromosome Research. 1994. 2: 65-71.

5. Hanson R. E., Islam-Faridi M. N., Percival E. A., Crane C. F., Ji Y., McKnight T. D., Stelly D. M., Price H. J. Distribution of 5S and 18S-28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. // Chromosoma. 1996. V. 105. P. 55-61.

6. Muravenko O.V., Yurkevich O. Yu., Bolsheva N.L., Samatadze T.E., Nosova I. V., Zelenina D.A., Volkov A. A., Popov K. V., Zelenin A.V. Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis. // Genetika. 2009. V. 135. № 2. P. 245-255.

7. Turrill W.B. *Macleaya kewensis* (or *M.x kewensis*) // Curtis's Botanical Magazine. 1958. V. 172. part. 1-4. Tabl. 321.

САФРОНОВА Л.Д.¹, ЧЕРЕПАНОВА Е.В.¹, СЕРГЕЕВ Е.Г.²

1 – Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Россия, 119071, Москва, Ленинский пр. 33, e-mail: safronova@sevin.ru

2 – НИИ пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева e-mail: seg008@rambler.ru

АНАЛИЗ ХРОМОСОМ НА РАННЕЙ СТАДИИ ПЕРВОГО ДЕЛЕНИЯ МЕЙОЗА У СОБОЛЯ *MARTES ZIBELLINA*

Известно, что жизнеспособность и плодовитость животных-носителей мутаций (в том числе и хромосомных aberrаций) может быть значительно снижена. Чтобы определить, насколько эти мутации распространены в популяциях домашних животных, необходимы цитогенетические исследования. Описание кариотипа традиционно основывается на данных о митотических хромосомах в соматических клетках. С появлением методики электронно-микроскопического анализа мейотических хромосом, разработанного Дрессером и М. Мозесом (Dresser, Moses, 1977), изучение мейотических хромосом начало применяться для кариологической характеристики видов (Демин, Сафронова, 1984). Метод основан на визуализации сиnapтономных комплексов (структур, образующихся между гомологичными хромосомами на стадии профазы первого деления мейоза). Число СК в клетке соответствует числу хромосом в гаплоидном наборе, а относительные длины СК аутосом и половых хромосом коррелируют с относительными длинами соответствующих хромосом в митотическом кариотипе (Демин и др., 1984). ЭМ анализ СК позволяет визуализировать даже микро-аберрации, неразличимые при световом анализе митотических хромосом.

Кроме того, по нарушениям синапсиса можно судить о генных мутациях, которые контролируют процесс мейоза, и, следовательно, выявить носителей мутаций, влияющих на фертильность.

К настоящему времени имеются данные об СК кариотипах многих млекопитающих (Moses, 1977; Коломиец и др., 1986; Gilles, Cowan, 1985; Koukul, Basgur, 1995; Basheva et al., 2008; Сафронова, Сергеев, 2009). В данной статье впервые представлен СК-кариотип сибирского соболя *Martes zibellina*.

Материалы и методы

Для эксперимента использованы звери в двухлетнем возрасте из популяции зверохозяйства «Пушкинский» Московской области. Изучение мейоза было проведено у десяти половозрелых самцов.

Препараты распластанных синаптонемных комплексов (СК) на ранних стадиях I деления мейоза (зиготены-пахитены): гипотоническая обработка клаточной суспензии 0,5% NaCl, фиксация 1% р-м параформальдегида (Dresser, Moses M.J., 1977).

Окраска СК 50 %-м раствором нитрата серебра. Клетки просматривали под микроскопом Leica; подстадии профазы первого деления мейоза определяли согласно критериям Мозеса и соавт. (1981). Длины СК ауtosомных и половых бивалентов сперматоцитов измеряли с помощью программы Leica Application Suite V3 на цифровых микрофотографиях. Биваленты СК в кариотипе нумеровали в порядке убывания их линейных размеров.

Результаты и обсуждение

Кариотип синаптонемных комплексов у изученных половозрелых особей *M. zibellina* состоит из 18 СК бивалентов ауtosом, постепенно убывающих по длине, и полового бивалента (Рис. 1). Длина оси хромосомы X сопоставима по длине с СК бивалентом № 6 (ранняя пахитена) или 5 (средняя пахитена); ось хромосомы Y в 3 раза меньше по длине чем ось хромосомы X.

Полученные результаты согласуются с данными о соотношении длин ауtosом этого вида. Впервые митотический кариотип *Martes zibellina* (рутинная окраска р-м Гимза) был представлен В.Н. Орловым и В.М. Малыгиным (1969) (особи из Салтыковского зверосовхоза); позднее митотические хромосомы этого вида были изучены методом дифференциальной G- и C-окраски (Графадатский и др., 1977, 1982, 1988; Iwasa, Hosoda, 2002). Диплоидное число хромосом сибирского соболя составляет 38, число плеч ауtosом равно 66 ($2n=38$, $NFa=66$). Кариотип подвида *M. zibellina brachyuran* с о-ва. Хоккайдо (большая часть ареала *M. zibellina* находится в Сибири и на Дальнем Востоке России, но встречается этот вид также на севере Монголии, Кореи и Китая, и на мелких северных островах Японии), неотличим по форме хромосом от кариотипа сибирской формы (Iwasa, Hosoda, 2002). Кариотип близкого вида – японского эндемика *M. melampus* отли-

чается от кариотипа *M. zibellina* лишь формой и G-рисунок одной мелкой хромосомы (Iwasa, Hosoda, 2002).

Аутосомный набор хромосом *M. zibellina* состоит из 5 пар метацентриков, 10 пар субметацентриков и 3 пар акроцентриков. Первые четыре пары аутосом заметно крупнее других. Из них две пары метацентрических и две пары субметацентрических. Среди остальных аутосом, размеры которых плавно уменьшаются, метацентрическими являются три последние пары, №№ 16, 17 и 18, субметацентрическими – 18 пар и акроцентрическими – три пары. Одна из пар акроцентриков, № 7, сравнительно крупная, две другие мельче. Хромосома X – субметацентрик среднего размера, хромосома Y – самый мелкий акроцентрик хромосомного набора (Орлов, Малыгин, 1969; Графодатский, Раджабли, 1988).

Единственное несоответствие с митотическим кариотипом – это отностительная длина половых хромосом: ось хромосомы X соответствует по длине СК № 8, а длина этой хромосомы в митозе сопоставима с аутосомой № 5 (Орлов, Малыгин, 1969; Графодатский и др., 1977; Графодатский, Раджабли, 1988). Оси половых хромосом у исследованных нами особей *M. zibellina* синаптируют практически по всей длине хромосомы Y (Рис. 1). Половые хромосомы синаптируют у подавляющего числа изученных видов млекопитающих, и лишь у отдельных видов наблюдается асинапсис половых хромосом. Длина участка гомологичного синапсиса X и Y хромосом (pseudoautosomal region – PAR) у разных видов неодинакова, а участок негомологичного синапсиса значительно варьирует. У представителей Carnivora: собаки *Canis familiaris*, лисицы *Vulpes fulvus* и кошки *Felis catus*, американской норки *Mustela vison* длина участка синапсиса сокращается на протяжении пахитены, а соотношение длин СК аутосом и половых хромосом значительно меняется от ранней к поздней пахитене (Койкул, Басрур, 1995; Basheva et al., 2008; Сафронова и др., 2010). Для более точной характеристики мейоза *Martes zibellina* требуется детальный анализ сперматоцитов на стадиях от зиготены-ранней пахитены до поздней пахитены.

О возможном распространении мутаций (включая микроабберрации хромосом) в клеточных популяциях и их вредном влиянии на фертильность косвенно свидетельствуют следующий факт. В природных популяциях у 60% изученных самок-сеголеток наблюдаются желтые тела беременности (показатель для оценки репродуктивного статуса самок), а у животных на зверофермах этот показатель не превышает 25%. Что касается самцов, то их репродуктивный статус до настоящего времени не изучался, но отмечено, что среди однолетних самцов в фермерских популяциях в гоне участвует только 36-48%. Вероятно, снижение фертильности связано либо с отличием клеточного содержания от естественных условий, либо с селекцией, направленной на качество меха: гены, контролирующие окраску и структуру волоса, могут быть сцеплены с генами, контролирующими развитие репродуктивной системы. Молекулярно-генетический анализ выявил ряд микро-

сателлитных аллелей, специфичных для двух клеточных популяций соболя, в которых проводилась селекция на окраску и структуру волоса по разным направлениям (Каштанов и др., 2011). Это подчеркивает актуальность цитогенетического мониторинга клеточных популяций сибирского соболя.

Выводы:

1) Впервые представлены данные о первой стадии мейоза у сибирского соболя.

2) Кариотип синаптонемных комплексов (СК) *M. zibellina* состоит из 18 СК аутосомных бивалентов и полового бивалента. Оси половых хромосом *M. zibellina* синаптируют, как и у большинства млекопитающих; длина участка синапсиса X и Y хромосом на стадии ранней-средней пахитены составляет большую часть хромосомы Y.

3) Нарушений синапсиса аутосом или половых хромосом у изученных особей *M. zibellina* не было обнаружено.

Литература

1. Moses M.J. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations // *Chromosoma* (Berl.). -1977. V.60. No.2. -P.99-125.

2. Графодатский А.С., Раджабли С.И. Хромосомы сельскохозяйственных и лабораторных животных. Атлас. – Новосибирск: Наука. -1988. С.108-109.

3. Демин Ю.С., Сафронова Л.Д. Цитогенетический мониторинг в животноводстве // Известия АН СССР. Сер. Биологическая. -1984. №5. -С. 702-715.

4. Каштанов С.Н., Афанасьев К.И., Потанов С.Г., Лабезный О.Е. Микросателлитный анализ двух промышленных популяций соболя (*Martes zibellina* L.) // Генетика. -2011. Т. 47. № 12. –С.1622-1628.

5. Орлов В.Н., Малыгин В.М. Хромосомный набор соболя, *Martes zibellina* L. // Млекопитающие: Эволюция, кариология, тасономия, фаунистика Тезисы к II Все-союзн. Совещ. по млекопитающим (Москва, 1969). – Новосибирск: Сибирское отд. Акад. наук СССР. -1969. -С.22.

6. Сафронова Л.Д., Пименова Т.И. Кариотипы крупного рогатого скота (*Bos taurus*) и лошадей (*Equus caballus*) на основе синаптонемных комплексов // Генетика. 1988. Т. 24, № 4. – С. 708-714.

7. Сафронова Л.Д., Сергеев Е.Г. Стерильность лисо-песцовых гибридов: гистологический и цитогенетический анализ семенников // Вестник РАСХН. -2011. №4. -С. 64-66.

8. Evans E.P., Breckon G., Ford C.E. An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes // *Cytogenetics*. -1964. vol. 3. -P. 289-294.

9. Basheva E.A., Bidau C.J., Borodin P.M. General pattern of meiotic recombination in male dogs estimated by MLHI and RAD51 immunolocalization. *Chromosome Res.* 2008. -2008. vol. 16. –P.709-719.

10. Gillies C.B., Cowan S.K. The pachytene Synaptonemal complex complement of the cat // *Genetica*. -1985. vol. 67. –P.99-107.

11. Iwasa M.A., Hosoda T. A note on the karyotype of the sable, *Martes zibellina* brachyura, in Hokkaido, Japan // *Mammal Study*. -2002. vol. 27. -P. 83-86.

12. Koykul W., Basrur P.K. The XY pair of the mink (*Mustela vison*) during different periods of testicular activity // *Hereditas*. -1995. vol. 122, No.2. -P.169-176.

13. Moses M.J., Slatton G.H., Gambling T.M., Starmer C.F. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). III. Quantitative evaluation // *Chromosoma* (Berl.). -1977. vol.60, № 4. -P. 345-375.

Резюме

Впервые представлены данные о первой стадии мейоза у сибирского соболя *Martes zibellina*. Кариотип синаптонемных комплексов (СК) *M. zibellina* состоит из 18 СК аутомомных бивалентов и полового бивалента. Оси половых хромосом *M. zibellina* синантируют, как и у большинства млекопитающих; длина участка синантиса X и Y хромосом на стадии ранней-средней пахитены составляет большую часть хромосомы Y.

For the first time we present the data on the meiosis first stage of the sable *Martes zibellina*. The karyotype of synaptonemal complexes (SC) of *M. zibellina* includes 18 SC of autosome bivalents and a sex bivalent. The sex chromosome axes of *M. zibellina* form SC as in majority of mammalian species; synaptic region length of the X and Y chromosomes takes much more portion of the Y chromosome.

СОЗИНОВ І.О.¹, КОЗУБ Н.О.^{1,2}, КАРЕЛОВ А.В.^{1,2}, СОЗИНОВ О.О.^{1,2}

¹Інститут захисту рослин НААН України,

Україна, 03022, Київ, вул Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua

² ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАНУ»,

Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2а

МУТАЦІЇ ЗА ГЛАДИНОВИМИ ЛОКУСАМИ, ІНДУКОВАНІ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯМ ЗЕРЕН F₁ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Опромінення є найбільш поширеним методом індукції мутацій при створенні сортів шляхом мутагенезу [1]. Доза гамма-опромінення 200 Гр є оптимальною дозою для обробки сухого насіння озимої м'якої пшениці за максимальною загальною частотою видимих мутацій в поколіннях M₁–M₃ [2]. Частота індукованих мутацій за окремими морфологічними та фізіологічними ознаками у пшениці при гама-опроміненні зерна досягає 0,90%, загальна частота видимих мутацій при опроміненні 200 Гр – 2,43-5,94% [2]. У деяких сортів озимої пшениці загальна частка родин M₂ зі зміненими ознаками при опроміненні 200 Гр може досягати 25% [3].

Основним видом мутацій, що виникають при гама-опроміненні, є делетії фрагментів ДНК різного розміру [4]. Репарація дволанцюгових розривів ДНК може відбуватися шляхом гомологічної рекомбінації або шляхом негомологічного з'єднання кінців («незаконна» рекомбінація) [5]. Тому іонізуюче випромінювання використовують для отримання хромосомних розривів, інверсій, транслокацій, дуплікацій в рослинному матеріалі. Однак, не виключається поява точкових мутацій в результаті окислювального пошкодження основ [6].

Локуси запасних білків пшениці характеризуються високим рівнем виникнення спонтанних мутацій. За даними [7] частота зустрічання мутант-

них спектрів за гліадиновими локусами – 0,68% на генотип, частота виникнення мутацій – не менше 0,03% на локус на покоління. При цьому основним типом мутацій є втрата компонентів, кодованих генами цих локусів. Подібні мутації за гліадиновими локусами (виникнення нуль-алелів) у твердої і м'якої пшениці виявлено багатьма дослідниками [8]. Також можуть зустрічатись мутації, пов'язані з втраченою синтезу окремих компонентів, зміною інтенсивності синтезу окремих білків та зміною рухливості окремих компонентів [7]. Висока частота мутацій в локусах запасних білків ймовірно визначається їх особливостями – кластерною організацією, та будовою самих запасних білків, які мають повторюваний домен – тандемні повтори коротких поліпептидних мотивів [9].

Задачею нашого дослідження була ідентифікація мутацій за гліадиновими локусами, індукованих гама-опроміненням сухих зерен м'якої пшениці.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугували зерна з рослин F_1 від схрещення майже ізогенних ліній (МІЛ) озимої м'якої пшениці за гліадиновими локусами GLI-D1-4 × GLI-B1-3 на основі сорту Безоста 1 [10]. Вихідні лінії відрізняються лише за присутністю пшенично-житньої транслокації 1BL/1RS (її маркером є гліадиновий алель *Gli-B11* [11]) та за гліадиновим локусом *Gli-D1* і мають наступні генотипи за гліадиновими локусами (позначення алелів за каталогом [11]): лінія GLI-B1-3: *Gli-A1b Gli-B11 Gli-D1b Gli-A2b Gli-B2b Gli-D2b*; лінія GLI-D1-4: *Gli-A1b Gli-B1b Gli-D1j Gli-A2b Gli-B2b Gli-D2b*. Сухі зерна F_1 в дослідному варіанті були опромінені гама-променнями в дозі 200 Гр. Контрольні та опромінені зерна F_1 були висіяні на дослідній ділянці блоками з чергуванням рядів «контроль», «варіант з опроміненням» широкорядним посівом. В 2005 р. висаджено 95 контрольних і 97 опромінених зерен (м. Київ, дослідна ділянка Інституту агроєкології НААН) та вирощено 73 і 81 рослини, відповідно. В 2006 р. висіяно по 200 зерен кожного варіанту (с. Гатне, Київська обл.) та вирощено 135 F_1 рослин контрольного і 123 варіанту з опроміненням. З кожної рослини F_1 проаналізовано 15–25 окремих зернівок F_2 електрофорезом гліадинів за методикою [12].

Результати і обговорення

Частоту мутацій, індукованих гамма-опроміненням сухих зерен, серед рослин F_1 (M_1) пшениці визначали на основі електрофоретичного аналізу потомства зерен F_2 (M_2). Мутації, що приводили до зміни в електрофоретичних спектрах гліадинів, індуковані гамма-опроміненням, виявлено серед потомства 10 рослин F_1 2006 р. та 5 рослин популяції, вирощеної в 2007 р (Табл. 1). Загальна частота таких мутацій становить 7,14%. В контрольному варіанті виявлено одну рослину, в потомстві якої спостерігався алель *Gli-B2b* з відсутністю експресії двох нижніх β -гліадинів. Для сумарної популя-

ції рослин контрольного варіанту частота спонтанних мутацій за гліадиновими локусами становить 0,5%, що узгоджується з даними [7].

Таблиця 1

Кількість рослин варіанту з опроміненням, у потомстві яких (серед зерен F_2) виявлено мутації за певним гліадиновим локусом та загальна частота мутацій за цими локусами

Рік	Gli-B1	Gli-D1	Gli-B2	Gli-D2	Частота мутацій, %
2006	4 (1- нуль-алель, 2 – відсутність γ -гліадина, кодованого алелем <i>b</i> , 1 – зміна рухливості нижнього ω -компонента, кодованого алелем <i>l</i>)	3 (нуль-алель)	2 (нуль-алель)	1 (нуль-алель)	12,3 \pm 3,7
2007	3 (1- нуль-алель, 1 – знижена інтенсивність γ -гліадина, кодованого алелем <i>Gli-B1b</i> , 1? – поява компонента в γ -зоні)	1 (нуль-алель)	1 (відсутність 2 нижніх β -гліадинів, кодованих алелем <i>b</i>)	-	4,1 \pm 1,8
Разом	7	4	3	1	7,4 \pm 1,8

Більшість випадків (дев'ять) зміни в гліадинових спектрах проявлялись у відсутності всіх компонентів алеля за певним гліадиновим локусом (нуль-алель). Нуль-алелі виявлено за локусами *Gli-D1*, *Gli-B2*, *Gli-D2*, та *Gli-B1* (табл.1, рис. 1, 2).

За локусом *Gli-B1* у потомстві двох рослин спостерігались зернівки, у яких були присутні ω -гліадини, кодовані алелем *Gli-B1b*, та відсутній γ -компонент (рис. 3). У однієї рослини F_1 серед потомства ідентифіковано генотипи зі зміненою рухливістю нижнього ω -компонента блока секалінів *Gli-B1l* (рис. 4). Серед потомства однієї рослини, зустрічались зернівки зі зниженою інтенсивністю γ -гліадина, кодованого алелем *Gli-B1b* (рис. 5). Подібну мутацію було також виявлено в роботі [8].

За локусом *Gli-B2* у потомстві однієї рослини варіанту з опроміненням спостерігались зернівки, у яких були присутні верхні β -гліадини, кодовані алелем *Gli-B2b*, та відсутні два нижні β -компоненти (рис. 6).

Крім цього, у однієї рослини ідентифіковано зернівки з алелем *Gli-B1l* і появою додаткового γ -компонента. Для того, щоб визначити, геном якого локуса кодується новий компонент, треба провести гібридологічний аналіз при умові виділення лінії, що експресує цей компонент.

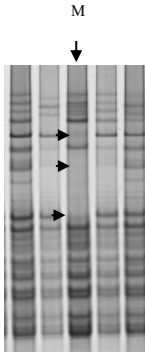


Рис. 1 Электрофореграма гліадинів окремих зернівок з рослини F₁ варіанту з опроміненням. М – зернівка з нуль-алелем за *Gli-B1* (в гомозиготному стані). Короткими стрілками позначено зону спектру, де відсутні компоненти, кодовані алелем *Gli-B1*

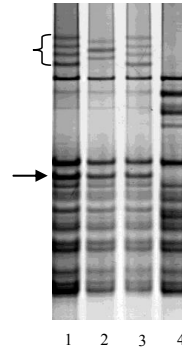


Рис. 2 Электрофореграма гліадинів окремих зернівок з рослини F₁ варіанту з опроміненням. 4 – зернівка з нуль-алелем за *Gli-D1* (в гомозиготному стані). Стрілками і дужкою позначено компоненти, що кодується локусом *Gli-D1*, які відсутні у мутанта

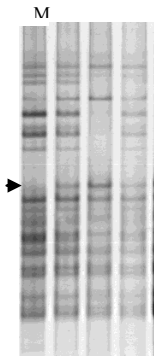


Рис. 3 Электрофореграма гліадинів окремих зернівок F₂ з рослини F₁ варіанту з опроміненням. М – зернівка з мутантним алелем *Gli-B1b* з відсутністю γ -компонента (в гетерозиготному стані). Стрілкою позначено зону спектру, де відсутній γ -компонент, кодований алелем *Gli-B1b*

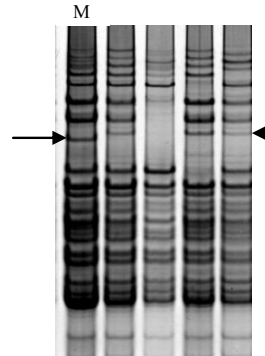


Рис. 4 – Электрофореграма гліадинів окремих зернівок з рослини F₁ варіанту з опроміненням. М – зернівка з мутантним алелем, що кодує компонент зі зміненою рухомістю (в гетерозиготному стані), позначений довгою стрілкою. Короткою стрілкою позначено відповідний компонент, кодований алелем *Gli-B1*, з нормальною рухомістю

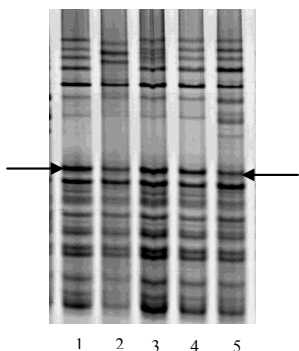


Рис. 5. Електрофореграма гліадинів окремих зернівок з рослини F_1 варіанту з опроміненням. 2, 5 – зернівки з мутантним алелем *Gli-B1b*, який проявляється у зниженні експресії γ -компонента (позначеного стрілкою)

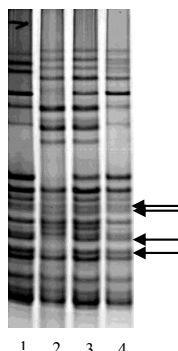


Рис. 6. Електрофореграма гліадинів окремих зернівок з рослини F_1 варіанту з опроміненням. 2 – зернівка з мутантним алелем *Gli-B2b* з відсутністю експресії двох нижніх гліадинів (в гетерозиготному стані). Стрілками позначено компоненти, кодовані алелем *Gli-B2b*.

Отже, частота видимих мутацій за гліадиновими локусами при гамма-опроміненні сухих зерен дозою 200 Гр зростає на порядок (7,4% порівняно з 0,5% в контролі). Найбільш частою індукованою мутацією є відсутність цілого блоку гліадинових компонентів, що найбільш ймовірно викликано делецією відповідного локусу. Також виявлено мутації, пов'язані з відсутністю певних гліадинових компонентів, зі зниженням інтенсивності синтезу g-гліадина, зміною рухомості компонента. Оскільки поділ проламінів при електрофорезі в кислому середовищі відбувається як за рахунок маси, так і заряду молекули, то мутація, що викликала зміну рухомості компонента могла відбутись як за рахунок делеції, так і за рахунок нуклеотидної заміни, що привела до зміни заряду білкової молекули.

Відомо, що алельні стани гліадинових локусів пов'язані з проявом ознак хлібопекарної якості [9]. Локуси *Gli-1* тісно зчеплені з локусами низькомолекулярних субодниць глютенінінів, які безпосередньо визначають хлібопекарну якість [9]. Отримання матеріалу з мутаціями за локусами запасних білків дозволить вивчати роль окремих білкових компонентів у визначенні якості та створювати матеріал пшениці з новими властивостями.

Література

1. *Ahloowalia B.S., Maluszynski M., Nichterlein K.* Global impact of mutation-derived varieties // *Euphytica*. – 2004. – vol. 135. – P. 187–204.
2. *Морзун В.В., Логвиненко В.Ф.* Мутационная селекция пшеницы, –Киев: Наукова думка.– 1995.– 626 с.

3. Оксьюм В.П. Вплив мутагенних чинників на рослини M_1 озимої пшениці та його зв'язок із частотою змінених форм у другому поколінні // Физиология и биохимия культурных растений.– 2010.– Т. 42, № 5.– С. 153–162.

4. Naito K., Kusaba M., Shikazono N. et al. Transmissible and nontransmissible mutations induced by irradiation *Arabidopsis thaliana* pollen with g-rays and carbon ions // Genetics.– 2005.– vol. 169.– P. 881–889.

5. Puchta H. The repair of double-strand breaks in plants: molecular mechanisms and consequences for genome evolution // J. Experim. Bot.– vol. 56, N 409.– P. 1–14.

6. Britt A.B. DNA damage and repair in plants // Ann. Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1996.– vol. 47.– P. 75–100.

7. Чернаков В.М., Метаковский Е.В. Спонтанные мутации по глиадинкодирующим локусам, найденные при анализе колосового и линейного материала яровой мягкой пшеницы // Генетика.– 1993.– Т. 29, № 1.– С. 114–124.

8. Lafiandra D., Colaprico G., Kasarda D.D., Porceddu E. Null alleles for gliadin blocks in bread and durum wheat cultivars // Theor. Appl. Genet.– 1987.– vol. 74.– P. 610–616.

9. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции.- М.: Наука.– 1985.– 272 с.

10. Копись М.М. О естественной географии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы// Селекция и семеноводство.- 1994.– N 5, С. 9–14.

11. Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. II Catalogue of gliadin alleles in common wheat// J. Genet. Breed.– 1991.– vol. 45.– P. 325–344.

12. Kozub N.A., Sozinov I.A., Sobko T.A. et al. Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine// Цитология и генетика.– 2009.– Т. 43, № 1.– С. 69–77.

Резюме

Опромінення сухих зерен F_1 озимої м'якої пшениці гама-променями в дозі 200 Гр викликало мутації в гліадинових локусах з частотою 7,4% (при 0,5% в контролі). Найбільш часта мутація – відсутність цілого блоку гліадинових компонентів. Виявлено мутації, пов'язані з відсутністю певних гліадинових компонентів, зі зниженням інтенсивності синтезу γ -гліадина, зміною рухомості компонента.

Облучение сухих зерен F_1 озимой мягкой пшеницы гамма-лучами в дозе 200 Гр вызвало мутации в глиадиновых локусах с частотой 7,4% (при 0,5% в контроле). Наиболее частая мутация – отсутствие целого блока глиадиновых компонентов. Выявлены мутации, выражающиеся в отсутствии определенных глиадиновых компонентов, снижении интенсивности синтеза γ -глиадина, изменении подвижности компонента.

Irradiation with gamma-rays (200 Gy) of dry F_1 seeds induced mutations at gliadin loci with the frequency of 7,4% (at 0,5% in the control). The absence of the whole block of gliadin components was the most frequent mutation. Mutations associated with the lack of certain gliadin components, a decrease in γ -gliadin intensity, change of component mobility were identified.

СТЕПЕНЬ ПОЛИТЕНИИ ГИГАНТСКИХ ХРОМОСОМ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* MEIG. В СВЯЗИ С РАЗЛИЧИЯМИ ПО ГЕНОТИПУ И ЧАСТОТОЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ЛЕТАЛЕЙ

Развитие двукрылых насекомых характеризуется формированием в клетках личиночных и некоторых имагинальных тканей политенных хромосом. Такими являются слюнные железы, жировые тела, мальпигиевы сосуды, и др. В соответствии с современными данными у дрозофилы практически все личиночные ткани проходят, по крайней мере, один цикл эндоредупликации [1]. Особенности строения и функционирования политенных ядер в конечном итоге реализуются в более высокий функциональный уровень органа и приспособленности организма в целом [2, 3].

В современной литературе в связи с широкой распространенностью явления политении обсуждаются различные гипотезы о биологическом значении этого явления [4–6]. В частности, говорится о том, что эндоредупликация ведет к увеличению размеров клеток, она может служить механизмом роста и дифференцировки тканей, о возможной функции защиты генома от мутаций (buffering of genome) [5] и стрессовых факторов (modulation of stress response) [7]. В то же время авторы указывают на ограниченность экспериментальных данных, которые позволяли бы делать на этот счет определенные выводы.

Целью работы было изучить различия линий и гибридов *Drosophila melanogaster* Meig. по плодовитости и частоте эмбриональных леталей в связи с различиями по степени политении хромосом (СПХ).

Материалы и методы

Материалом для исследования инбредные линии разного географического происхождения: *Swedish* (*Sw*), *Oregon-R* (*Or*) и *Canton-S* (*C-S*) и межлинейные реципрокные гибриды $F1 Or \times C-S$ и $C-S \times Or$. Инбридинг поддерживался путем скрещиваний сибсов. В линии *Swedish* инбридинг поддерживался до начала экспериментов на протяжении 38–40 поколений, в линиях *Oregon-R* (*Or*) и *Canton-S* (*C-S*) – 56 – 58 поколений.

Мух выращивали на стандартной сахарно-дрожжевой среде при температуре $25,0 \pm 0,5$ °С. У линий и гибридов исследовали показатели адаптивной ценности: яйцепродукцию самок, частоту эмбриональных летальных мутаций [8]. Степень политении хромосом (СПХ) исследовали у личинок в конце 3-го возраста на давленных ацетоорсеиновых препаратах слюнных желез [9] цитоморфометрическим методом: хромосомы с разной СПХ различаются по ширине хромосом и интенсивности окрашивания ацетоорсеином [10].

Результаты и обсуждение

К концу личиночной стадии развития в слюнных железах *D. melanogaster* встречаются от двух до четырех классов ядер с разной степенью полиитении: 256С, 512С, 1024С, 2048С [11]. В то же время существует внутривидовая изменчивость гигантских хромосом по степени полиитении [12]. На рис. 1 представлены данные о распределении ядер с разной СПХ (А) и средних значениях СПХ (Б) у разных генотипов. Линия *Swedish* имела наименьшие значения СПХ, уступая другим генотипам в среднем на 10,9–15,0 %, ($p < 0,05–0,001$), за исключением самцов линии *Oregon-R*. У гибридов *F1 Or×C-S* и *C-S×Or* наблюдали превосходство над инбредной линией *Oregon-R* у самцов на 11,7–12,9 % ($p < 0,01$), по отношению к линии *Canton-S* достоверных различий не выявлено.

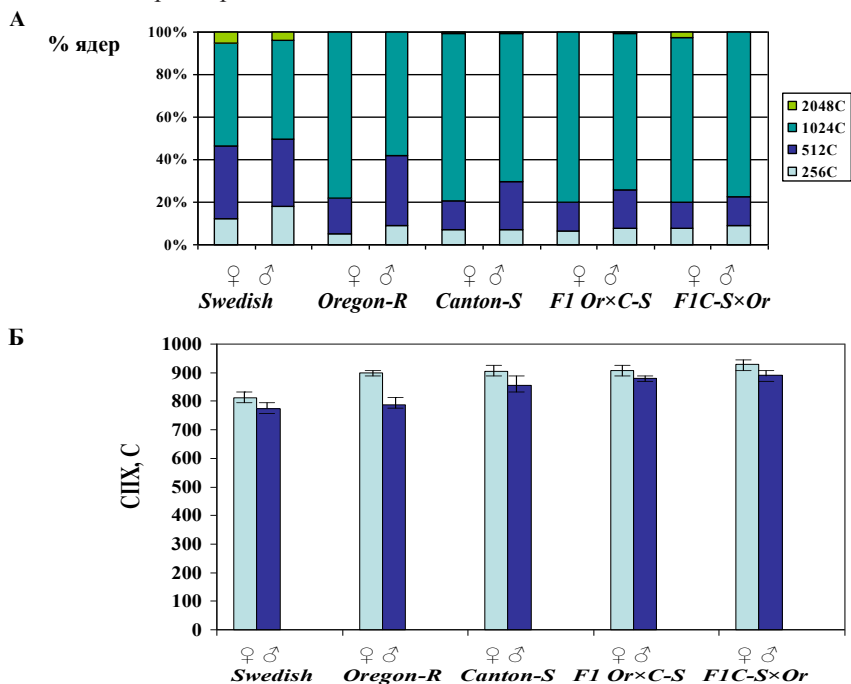


Рис. 4. Степень полиитении хромосом в слюнных железах личинок инбредных линий и межлинейных гибридов *F1 Drosophila melanogaster*: А – распределение ядер с разной СПХ; Б – средние значения СПХ.

Линия *Swedish* отличалась наименьшей плодовитостью по показателю яйцепродукции самок и наибольшей суммарной частотой эмбриональных леталей (ЭЛ) и поздних эмбриональных леталей (ПЭЛ), о чем свидетельствуют данные, приведенные в таблице 1. Наибольшей плодовитостью

и наименьшими значениями эмбриональной смертности отличались межлинейные гибриды F_1 .

Анализ статистических связей (ранговая корреляция) показал наличие тесной отрицательной корреляции между яйцепродукцией самок, с одной стороны, и суммарной частотой эмбриональных леталей и частотой поздних летальных мутаций, с другой стороны: $r_s = -0,9$ ($p < 0,05$). Частота эмбриональных леталей, как суммарных, так и поздних, отрицательно коррелирует со степенью политении хромосом: $r_s = -1,0$ ($p < 0,001$). Между яйцепродукцией самок и показателем СПХ установлено наличие тесной положительной корреляции: $r_s = 0,9$ ($p < 0,05$).

Таблица 1

Яйцепродукция самок и частота эмбриональных леталей у инбредных линий и межлинейных гибридов F_1 *Drosophila melanogaster*

Линии, гибриды	Яйцепродукция самок	Суммарная частота ЭЛ	Частота ПЭЛ
Swedish	123,7±18,1	37,50 ± 2,50	6,50 ± 1,30
Oregon-R	199,4±18,1	26,59±1,63	1,49±0,45
Canton-S	284,0±28,6	14,95±1,45	0,83±0,37
F_1 Or × C-S	380,0±28,7	2,71±0,50	0,19±0,13
F_1 C-S × Or	288,8±11,0	1,06±0,35	0,18±0,13

Ранее отрицательную корреляцию между СПХ и частой возникновения мутаций наблюдали в связи с изучением влияния изогенизации на геном в линии Bar_{C-S} , в которой мутация Bar была перенесена на генетический фон линии $Canton-S$. При изогенизации хромосом 2 и 3 в линии Bar_{C-S} у самок полученной в результате изогенной линии $iso^{II}; iso^{III} Bar_{C-S}$ наблюдали увеличение частоты неравного кроссинговера, а также частоты эмбриональных леталей [13], что также коррелировало со снижением степени политении в слюнных железах личинок изогенной линии [14].

Отрицательная корреляция между СПХ и ПЭЛ была выявлена при изучении влияния генотипа и плотности культуры на геном дрозофилы. Значимой связи между СПХ и суммарной частотой ЭЛ не было обнаружено [15]. Личиночная перенаселенность также вызывала увеличение генетической нестабильности в линии Bar_{C-S} , обусловленной явлением нереципрочной гомологичной рекомбинации [12].

Связь между политенизацией генома и процессами мутагенеза, по видимому, в разных случаях может иметь различный характер. Это может быть коррелятивная связь, обусловленная, вовлеченностью одних и тех же ферментов и регуляторных белков как в процессы репликации, так и в механизмы репарации повреждений ДНК.

С другой стороны, политения определенным образом может служить защитой клетки от соматических мутаций. Поскольку речь идет о повреждениях ДНК, в полиплоидной клетке остается множество неповрежден-

ных копий генома, обеспечивающих нормальную жизнедеятельность клетки. Подобная форма защиты от мутаций отдельных генов существует и в диплоидных клетках, в которых некоторые гены дублированы и образуют так называемые семейства генов, например, гены глобинов, актина, тубулина и т.п. [16].

Кроме того, дополнительным фактором защиты от мутагенных влияний может служить увеличение объема ядра при политенизации генома, поскольку поверхность ядра увеличивается медленнее, чем его объем.

Выводы

Показано влияние генотипа на степень политении гигантских хромосом дрозофилы. Частота эмбриональных леталей, как суммарных, так и поздних, отрицательно коррелирует со степенью политении хромосом. Между яйцепродукцией самок и показателем СПХ установлено наличие тесной положительной корреляции.

Литература

1. Britton J.S., Edgar B.A. Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activated mitotic and endoreduplicative cells by distinct mechanisms // Development.- 1998.- V. 125.- P. 2149-2158.
2. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. – М. Наука, 1981. – 260 с.
3. Жимулев И.Ф. Политенные хромосомы: морфология и структура.- Новосибирск: Наука, 1992.- 480 с.
4. Larkins B.A., Dilkes B.P., Dante R.A. et al. Investigating hows and why of DNA endoreduplication // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol.52, №355. – P. 183–194.
5. Edgar B.A., Orr-weaver T.L. Endoreduplication cell cycle: more or less // Cell.- 2001.- V. 105 (3).- P. 297-306.
6. Lee H.O., Davidson J.M., Duronio R.J. Endoreduplication: polyploidy with a purpose // Genes and Development.- 2008.- V/ 23 (21).- P. 2461-2477.
7. Cookson S.J., Radziejowski A., Granier C. Cell and leaf size plasticity in Arabidopsis: what is the role of endoreduplication // Plant, Cell and Environment.- 2006.- V. 29.- P. 1273-1283.
8. Тихомирова М.М. Генетический анализ.- Л.: Изд-во ЛГУ, 1990.- 280 с.
9. Полуэктова Е.В., Евгеньев М.Б. Техника изготовления препаратов политенных хромосом // Методы биологии развития. М.: Наука, 1974. – с. 517-519.
10. Страшнюк В.Ю., Непейвода С.Н., Шахбазов В.Г. Цитоморфометрическое исследование политенных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig. в связи с эффектом гетерозиса и отбором по адаптивно важным признакам и полом. // Генетика. – 1995. – Т.31, №1, С.24-29.
11. Rodman T.C. DNA replication in salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster* at successive larval and prepupal stages // Genetics.- 1967.- Vol. 55.- P. 375-386.
12. Марченко А.Ю., Страшнюк В.Ю. Генетическая вариабельность степени политении гигантских хромосом и действие 20ОН-эктистерона на эндоредупликацию у *Drosophila melanogaster* Meig. // Вісник Харк. Нац. ун-ту.- Серія: біологія.-2006.- Вип. 3.- С. 93-99.
13. Шакина Л.А., Страшнюк В.Ю. Влияние плотности культуры и изогенизации хромосом на проявление нестабильности признака *Bar* у *Drosophila melanogaster*

ter // I Міжнародна конференція «Дрозофіла в експериментальній генетиці та біології»: 36. наук. праць.- Харків: ХНУ.- 2008.- С. 19-22.

14. Шакіна Л., Страшнюк В., Шахбазов В. Вплив ізогенізації на ступінь політенії й активність пуфінгу політеничних хромосом у *Drosophila melanogaster* Meig. // Вісник Львів. Ун-ту. Серія біологічна.- 2005.- Вип.. 40.- С. 23-29.

15. Журавлева Л.А., Страшнюк В.Ю., Шахбазов В.Г. Влияние плотности культуры на степень политенции гигантских хромосом инбредных линий и гибридов *Drosophila melanogaster* // Цитология и генетика.- 2004.- Т. 38, № 3.- С. 46-51.

16. Льюин Б. Гены.- М.: Мир, 1987.- 544 с.

Резюме

Изучена вариабельность степени политенции хромосом (СПХ) в слюнных железах *Drosophila melanogaster* в связи с различиями по плодовитости и частоте эмбриональных леталей. Частота эмбриональных леталей, как суммарных, так и поздних, отрицательно коррелирует со степенью политенции хромосом. Между яйцепродукцией самок и показателем СПХ установлено наличие тесной положительной корреляции.

Досліджена варіабельність ступеня політенії хромосом (СПХ) в слинних железах *Drosophila melanogaster* у зв'язку з відмінностями за плодючістю і частотою ембріональних леталей. Частота ембріональних леталей, як сумарних, так і пізніх, негативно корелює зі ступенем політенії хромосом. Між яйцепродукцією самок і показником СПХ встановлено наявність тісної позитивної кореляції.

The variability of polyteny level of chromosome (PLC) in the salivary glands of *Drosophila melanogaster* in relation to differences of fertility and frequency of embryonic lethality was investigated. The frequency of embryonic lethal mutants so summary as late was shown to correlate negatively with chromosome polyteny level. Positive close correlation was detected between the egg production and PLC index.

**ТИМЧУК С.М.¹, ЛАРИНЦЕВА Н.В.¹, ПОЗДНЯКОВ В.В.¹,
АНЦИФЕРОВА О.В.¹, ХАРЧЕНКО Ю.В.², ХАРЧЕНКО Л.Я.²**

¹Інститут рослинництва ім. В.Я.Юр'єва НААН України
Україна, 61128, Харків, пр. Московський 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

²Устимівська дослідна станція рослинництва

Україна, 39074, Полтавська область, Глобинський район, с. Устимівка

ВМІСТ І СКЛАД ТОКОФЕРОЛІВ В ЗЕРНІ ЕНДОСПЕРМОВИХ МУТАНТІВ КУКУРУДЗИ

В селекції кукурудзи на якість зерна активно використовується біохімічний ефект моногенних мутацій структури ендосперму, які регулюють активності ключових ферментів утворення крохмалю і викликають корисні змінення вуглеводного складу зерна [1, 2]. Показано, що цей ефект в ряді випадків супроводжується зростанням вмісту олії в зерні і перерозподілом її жирнокислотного складу в бік підвищення часток насичених та мононенасичених кислот [3, 4].

Однак якість рослинних олій залежить не тільки від їх жирнокислотного складу, але й від вмісту та складу жиророзчинних вітамінів, серед яких на особливу увагу заслуговують токофероли [5,6]. Ця група з'єднань вирізняється вираженим поліфункціональним ефектом вітаміну Е і забезпечує стійкість рослинних олій до перекисного окислювання [7].

В зерні кукурудзи комплекс токоферолів представлено α -, β -, γ - і δ - токолами, які суттєво відмінні між собою за вітамінною та антиоксидантною активністю, причому і загальний вміст токоферолів і співвідношення його окремих форм піддавані досить широкій генотиповій мінливості [8]. Встановлено, що однією з її вірогідних причин є ефекти полігенних комплексів [9], тоді як можливості застосування моногенних ендоспермових мутацій для селекційно – генетичного поліпшення кукурудзи за комплексом токоферолів до цього часу не проаналізовано.

Це і створило передумови для виконання наших досліджень, задачею яких було визначення ефектів різних ендоспермових мутацій кукурудзи за вмістом та складом токоферолів.

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень послугувала серія неспоріднених за походженням інбредних ліній кукурудзи звичайного типу і ліній– носіїв ендоспермових мутацій *ix*, *su₂*, *ae*, *sh₁*, *su₁* та *sh₂*. Для проведення дослідів використовувалося по 5 інбредних ліній кожного типу.

Варіанти експериментального комплексу вирощували в 2009 – 2010 рр. в двох екологічних зонах – Східному та Південному Лісостепу України і для досліджень використовували матеріал виключно від контрольованого запилення.

Визначення вмісту та складу токоферолів проводили методом високо-ефективної рідинної хроматографії на хроматографі «Smartline Knauer» з ультрафіолетовим детектором [10]. В якості стандартів для калібрування хроматографу використовували чисті препарати токоферолів виробництва фірми Calbiochem. Керування хроматографічною системою та обчислення результатів аналізів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми Clarity Chrom.

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили методом дисперсійного аналізу [11].

Результати та обговорення

Отримані результати підтвердили, що комплекс токоферолів в зерні кукурудзи представлено α -, β -, γ - і δ - токолами, причому кількісно переважаючою формою токоферолів був γ - токол. Його частка в комплексі токоферолів перевищувала 90%, а у деяких мутантів, наприклад *ae*, весь комплекс токоферолів було представлено виключно γ - токолом.

Проаналізовані типи кукурудзи були дуже відмінні між собою за загальним середнім вмістом токоферолів і всі ендоспермові мутанти за ви-

ключенням мутанту *ae* відрізнялися від кукурудзи звичайного типу більш високим середнім рівнем цієї ознаки (табл.1).

Таблиця 1

Середній вміст різних форм токоферолів в оліях зерна ендоспермових мутантів кукурудзи (середнє за 2009-2010 рр.)

Мутанти	Вміст різних форм токоферолів в оліях, мг%				
	α -токолу	β - токолу	γ - токолу	δ - токолу	Сума токоферолів
Звичайний тип	1,7	1,3	57,7	1,1	61,7
wx	1,3	1,2	61,9	0	64,4
su_2	1,0	0,1	69,8	0,1	71,0
<i>ae</i>	0	0	62,0	0	62,0
sh_1	0,3	0	79,9	0	80,2
su_1	1,3	1,9	125,9	0,8	129,9
sh_2	0,8	0	121,1	0	121,9
$HP_{0,95}$	0,7	0,8	23,8	0,6	24,3

Однак в кількісному відношенні ефекти різних мутацій щодо вмісту токоферолів були нетотожними. Мутанти *ix* перевищували звичайну кукурудзу в середньому на 4,4%, мутанти su_2 – на 11,5%, мутанти sh_1 – на 30,0%, а мутанти sh_2 та su_1 – більше ніж вдвічі. Зростання загального вмісту токоферолів у проаналізованих мутантів кукурудзи здійснювалося, головним чином, за рахунок γ – токолу і ефекти різних ендоспермових мутацій за його вмістом були практично подібні їх ефектам за загальним вмістом токоферолів.

За середнім вмістом α – та, β – токолів всі проаналізовані мутанти поступалися звичайній кукурудзі. Найменш суттєве зниження вмісту цих форм токоферолів зареєстроване у мутантів *ix* та su_1 , а за вмістом β - токолу мутанти su_1 навіть дещо переважали кукурудзу звичайного типу. У мутантів sh_1 зовсім не було зареєстровано наявності β – токолу, а у мутантів *ae* – і α – та, β – токолів. У більшості мутантів кукурудзи δ – токол в складі олії теж був відсутній. Цей компонент токоферолів в дуже низьких кількостях було зареєстровано тільки у звичайної кукурудзи, а також мутантів su_1 та su_2 .

У неспоріднених за походженням ліній кукурудзи звичайного типу і ліній – носіїв кожної ендоспермової мутації простежувалося широке варіювання загального вмісту токоферолів і вмісту кожної з їх форм. Найбільш широкий розмах цієї мінливості зареєстровано за загальним вмістом токоферолів і вмістом γ – токолу. За іншими компонентами комплексу токоферолів теж спостерігалися відмінності між лініями – носіями кожної мутації, але вони були значно менш суттєвими (табл.2).

Серед проаналізованих в досліді ліній самими високими рівнями цих ознак серед ліній кукурудзи звичайного типу вирізнялися лінія P-165, серед ліній – носіїв мутації *ix* – лінія ВК-19, серед ліній – носіїв мутації su_2

– лінія AC-16, серед ліній – носіїв мутації *ae* – лінія AE-800, серед ліній – носіїв мутації *sh₁* – лінія CS-3, серед ліній – носіїв мутації *su₁* – лінія MC-266, а серед ліній – носіїв мутації *sh₂* – лінія SS-390, а дві останні із зазначених ліній проявили найбільш високий загальний вміст токоферолів і γ – токолу в межах всієї проаналізованої сукупності.

Таблиця 2

Коливання вмісту різних форм токоферолів в оліях зерна ліній – носіїв ендоспермових мутацій кукурудзи (середнє за 2009-2010 рр.)

Мутації	Вміст різних форм токоферолів в оліях (мін.-макс.), мг%				
	α – токолу	β – токолу	γ – токолу	δ – токолу	Сума токоферолів
Звичайний тип	0,6 – 2,7	0,3 – 2,6	38,0 – 70,9	0,4 – 2,9	41,9 – 75,2
wx	0,8 – 2,4	0,4 – 2,6	48,7 – 73,6	0	52,5 – 76,6
<i>su₂</i>	0,6 – 1,8	0 – 0,4	62,8 – 81,4	0 – 0,7	63,4 – 83,2
<i>ae</i>	0	0	50,5 – 98,5	0	50,6 – 98,5
<i>sh₁</i>	0,1 – 0,9	0	64,6 – 95,8	0	65,4 – 96,1
<i>su₁</i>	0,6 – 1,8	1,1 – 3,0	93,5 – 167,40	0 – 1,3	96,7 – 173,5
<i>sh₂</i>	0,5 – 1,7	0	104,7 – 144,2	0	105,4 – 145,8
HIP _{0,95}	0,4	1,1	2,5	0,6	3,0

Загалом, отримані в дослідіах результати показали наявність суттєвого ефекту різних ендоспермових мутацій кукурудзи та загальним вмістом токоферолів і вмістом γ – токолу. Однак, враховуючи специфічність біохімічного ефекту кожної ендоспермової мутації [2] і відсутність прямих метаболічних взаємозв'язків між утворенням крохмалю та токоферолів, ми не вважаємо можливим пояснити отримані результати плейотропним ефектом ендоспермових мутацій. Більш вірогідною причиною підвищення вмісту γ – токолу в оліях ендоспермових мутацій, на наш погляд, уявляється просторове зчеплення крохмаль – модифікуючих локусів з локусами, які контролюють утворення γ – токолу, або інгибують його конверсію в α – токол [8]. І, на підставі отриманих результатів можна припустити, що локуси, які регулюють вміст γ – токолу розташовано, зокрема, в третій та четвертій хромосомах.

З іншого боку отримані результати свідчать про кількісну природу вмісту основних фракцій токолів, особливо γ – токолу, у неспоріднених за походженням ліній на основі кожної мутації. Це може розглядатися як свідчення не тільки суттєвої ролі полігенних комплексів в детермінації вмісту токоферолів [9], але й можливого існування ефектів взаємодій ген : гено-тип за цією ознакою.

Висновки. Встановлено підвищення загального вмісту токоферолів та γ – токолу в оліях зерна ендоспермових мутантів кукурудзи, особливо *su₁* та *sh₂*, порівняно з кукурудзою звичайного типу. Показано широке варіюван-

ня загального вмісту токоферолів і вмісту γ – токолу у різних ліній на основі однієї мутації.

Література

1. Pollak L. M., Scott M. P. Breeding for grain quality traits // *Maydica*. – 1995. – V. 50. – P. 247-257.
2. Boyer C. D., Hannah L. C. Kernel mutants of corn // *Specialty corns*. – 2nd ed. / A. R. Hallauer Ed. – Boca Raton – London – New-York – Washington, D. C. : CRC Press, 2001. – P. 10 -40.
3. Flora L. F., Wiley R. C. Effect of various endosperm mutants on oil content and fatty acid composition of whole kernel corn (*Zea mays* L.) // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 1972. – № 97 (5). – P. 604-607.
4. Тьмчук С. М., Диденко С. Ю., Николенко И. А., Мовчан Т. Д. Содержание и жирнокислотный состав масла в семенах крахмал – модифицирующих мутантов кукурузы // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского – 2003. – вып. 16 (55).- С.54-59.
5. Надиров Н. К. Токоферолы и их использование в медицине и сельском хозяйстве. – М.: Наука, 1991. – 335 с.
6. Eitenmiller R. R. Vitamin E content of fats and oils–nutritional implications // *Food Technol.* – 1997. – V.51. – P. 78–81.
7. Brigelius-Flohe R., Traber M. G. Vitamin E: function and metabolism // *FACEB J.* - 1999. – v. 13. – P. 1145- 1155.
8. Rocheford T. R., Wong J. C., Egesel C. O., Lambert R. J. Enhancement of vitamin E levels in corn // *J. Amer. Col. Nutr.* – 2002. – V.21. – P. 191 – 198.
9. Chandler S., Guo Y. Q., Yang X. H. et al. Genetic dissection of tocopherol content and composition in maize grain using quantitative trait loci analysis and the candidate gene approach // *Mol. Breed.* – 2011. – V. 22. – P.353 -365.
10. Продукти харчові. Визначення вмісту вітаміну Е методом рідинної хроматографії високороздільної здатності вимірювання α -, β -, γ - і δ -токоферолів (EN 12822:2000, IDT) : ДСТУ EN 12822:2005. – [Чинний від 2006-07-01]. – К. : Держспоживстандарт України 2006. – 15 с. – (Національний стандарт України).
11. Лакін Г. Ф. Биометрия. – М. : Высшая школа, 1973. – 343 с.

Резюме

Установлено підвищення загального вмісту токоферолів та γ – токолу в маслах зерна ендоспермових мутантів кукурузи, особливо su_1 та sh_2 , в порівнянні з кукурузою звичайного типу. Показано широке варіювання загального вмісту токоферолів та γ – токолу у різних ліній на основі однієї мутації.

Установлено підвищення загального вмісту токоферолів та γ – токолу в оліях зерна ендоспермових мутантів кукурудзи, особливо su_1 та sh_2 , порівняно з кукурудзою звичайного типу. Показано широке варіювання загального вмісту токоферолів і вмісту γ – токолу у різних ліній на основі однієї мутації.

The increase of total tocopherols and γ – tocopherol contents in the grain oils of maize endospermic mutants, particularly su_1 and sh_2 , in comparison with the maize of a usual type was established. It has been showed a wide variability of total tocopherols's and γ – tocopherol contents in the different inbreds based on one mutation.

ЭЙГЕС Н.С., ВОЛЧЕНКО Г.А., ВОЛЧЕНКО С.Г., ДЕЛОНЕ Н.Л.

*Институт Биохимической физики РАН, Россия, 119334 Москва ул. Косыгина 4.
volchenkos@mail.ru*

Институт Медико-биологических проблем РАН, Россия, 123007 Москва, Хорошевское шоссе, 76А.

АНАЛИЗ ПРИЗНАКА ВЫСОКИХ АДАПТИВНЫХ СВОЙСТВ НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ И ФЕНОТИПИЧЕСКОМ УРОВНЯХ

Посвящается всемирно известному учёному генетику И.А. Рапопорту, лауреату Ленинской премии, Герою социалистического труда в годовщину его столетия

Воздействие на живые организмы экстремальными факторами в определённом их диапазоне может вызывать адаптивные реакции. Источником этих реакций могут быть не только мутации, но и стойкие наследственные эпигенетические изменения, влияющие на регуляцию генетической активности, в данном случае определяющую высокие адаптивные свойства. Могут быть также и обратимые ненаследственные эпигенетические изменения.

Эпигенез, как правило, возможен, когда происходит перемена в эухроматически-гетерохроматических взаимоотношениях. Поэтому существенно знать размеры блоков гетерохроматина в хромосомах [1]. Молчащие гены гетерохроматина не считываются, однако есть способы их активации. Активация генов гетерохроматина может приводить к усилению адаптивных свойств организма. Изменения в эухроматически-гетерохроматических взаимоотношениях могут происходить в частности при возникновении определённых перестроек хромосом, приводящих к эффекту положения, когда ген, благодаря тому, что ложится рядом с блоком гетерохроматина, гетерохроматизируется и становится молчащим.

Сорта и образцы озимой пшеницы, полученные методом химического мутагенеза, открытого в нашей стране крупным ученым генетиком И.А. Рапопортом [2], часто обладают высокими адаптивными свойствами – в 40% случаев и чаще по отношению ко всем проанализированным мутантам [3]. Представляет интерес выявление хотя бы некоторых возможных причин этого сложного явления.

Материалы и методы

Высокий выход хемомутантных сортов и образцов коллекции, обладающих высокими адаптивными свойствами [4], был получен в вариантах с наиболее эффективно действующими дозами супермутагена этиленимина (ЭИ) 0,01 – 0,04% при экспозиции 24 часа на высоко мутабельном сорте озимой пшеницы ППГ 186 [3, 4], где возникает наиболее широкое генотипическое разнообразие с большими возможностями выбора нужных наследственно измененных форм.

Для сравнения была использована ненаследственная изменчивость при действии модификационными факторами – низкими температурами, вибрацией, пара-аминобензойной кислотой (ПАБК) на модельном объекте *Tradescantia paludosa*. ПАБК также применялась на озимой пшенице, яровом ячмене [5, 6] и других культурах в модельных и производственных опытах и в производстве.

Результаты и обсуждение

Известно, что мощным источником признака высокой адаптивности является метод отдаленной гибридизации, который включает скрещивания культурной пшеницы с отдаленными видами и родами, часто дикими, которые являются носителями многих компонентов, составляющих признак высоких адаптивных свойств. Сюда входят рожь, виды пшениц однозернянок и двузернянок, виды эгилопсов, пыреев, элимусов. Все эти виды и роды приспособлены к перенесению суровых зим, жестких летних засух и других неблагоприятных условий. Довольно широко распространились сорта тритикале – гибридов между рожью и пшеницей. Однако использование этих видов и родов в качестве доноров признака высоких адаптивных свойств представляет трудности по ряду причин. В частности это имеет место в результате высокой стерильности в поколениях при несовместимости геномов, длительного отсутствия константности, сопровождения нужного признака (в данном случае высоких адаптивных свойств) нежелательными признаками иного вида или рода, которые в совокупности составляют непродуктивный дикий фенотип. От нежелательных признаков иного вида или рода, сопутствующих нужным селекционерам признакам, бывает трудно избавиться даже при применении неоднократных бекроссов. Тем не менее, метод отдаленной гибридизации перспективен и с помощью него в своё время были созданы ценные сорта озимой пшеницы, например сорт ППГ 186. Однако мы используем метод химического мутагенеза, лишённого многих из перечисленных нежелательных свойств, характерных для метода отдаленной гибридизации. Поэтому желаемый результат с использованием метода химического мутагенеза достигается быстрее и бывает более эффективным по сравнению с методом отдаленной гибридизации.

В предшествующих работах было показано, что высокие адаптивные свойства вызываются при использовании метода химического мутагенеза разными причинами: множественными мутациями [4], особым, незатухающим с годами гетерозисом на мутантной основе [7], доминантными мутациями [3].

Большую роль в выявлении высоких адаптивных признаков сыграло широкое генотипическое разнообразие с большими возможностями выбора наследственно измененных форм, созданное с использованием метода химического мутагенеза. Для выявления свойств высокой адаптивности нам помогли годы с неблагоприятными и крайне неблагоприятными условиями перезимовки, а также жесткие летние засухи. При этом создавались

условия для естественного отбора и дальнейшего повышения устойчивости к неблагоприятным факторам среды на жёстком провокационном фоне. Высокоадаптивные мутанты и мутантные сорта проявляют широкий комплекс компонентов, составляющих признак высоких адаптивных свойств. Это устойчивость к низким температурам (морозостойкость), вымоканию, задыханию под снегом (если снег стал теплопроводным), устойчивость к низкотемпературным фитопатогенам (тифулёз, виды снежной плесени), устойчивость к выпреванию, выпиранию, устойчивость к притёртым ледяным коркам, к толще льда, высокая регенерационная способность. Большая часть высокоадаптивных мутантов одновременно проявляет устойчивость к жестким летним засухам и жаростойкость. Впечатляет то обстоятельство, что высокая устойчивость проявляется к столь широкому комплексу неблагоприятных факторов, а также к тому, что мутантный признак высокой адаптивности возникает при использовании метода химического мутагенеза часто – в 40 и более процентах случаев.

Впечатляет также тот факт, что устойчивые мутанты, полученные при действии ЭИ оказываются всегда, из года в год, устойчивыми, когда широкий, выше упомянутый комплекс, составляющий неблагоприятные условия, варьирует, но и может быть представлен полностью. Весьма полно он был представлен, в частности, в 1994 и 1998 годах, когда при крайне неблагоприятных осенне-зимне-весенних периодах перезимовка хемомутантов и хемомутантных сортов, в том числе сорта Имени Рапопорта, составляла 90 – 95% на фоне гибели сортов Мироновская 808 и Заря, которым нельзя отказать в пластичности и на фоне гибели или сильной изреженности сортов Инна и Московская 39. Эти перечисленные четыре сорта озимой пшеницы были созданы традиционными методами селекции вне метода химического мутагенеза в отличие от сорта Имени Рапопорта.

Наши многолетние исследования в модельных опытах, в конкурсных сортоиспытаниях, в испытаниях на Госсортоучастках и в хозяйствах показали, что в любом сочетании неблагоприятных факторов в Центральном регионе всегда проявляется высокая устойчивость – в 40% (и более) у хемомутантных сортов и образцов. Эти данные во многом подтверждаются многолетними исследованиями в экстремальных регионах Поволжья, Тюменской области, в республике Коми, Восточноказахстанской области, на Алтае. Всё это наводит на мысль, что существует помимо упомянутых множественных мутаций, гетерозиса и доминантных мутаций ещё иной, более всеобъемлющий механизм устойчивости, который является наиболее универсальным и который как зонтиком закрывает и защищает хемомутантные сорта и образцы от всего сложнейшего комплекса неблагоприятных факторов и который обеспечивает их высокую жизнеспособность при любом сочетании этих факторов, даже приближающихся к полному.

Возникает предположение об эпигенетических процессах, благодаря которым возрастает количество гетерохроматина. Последнее возможно как

а) при участии эффекта положения, так и б) при вступлении химического мутагена в реакции с основаниями ДНК и их метилированием, в результате которых может изменяться соотношение гетерохроматина и эухроматина в сторону увеличения содержания гетерохроматина, что может благоприятно сказываться на повышении устойчивости к неблагоприятным условиям. Мы склоняемся в сторону второго предположения (б).

В литературе отражены соображения о том, что молчащие гены гетерохроматина обладают функциями, определяющими общие жизненно важные процессы в организме и в том числе адапционные свойства [8]. Изменения в гетерохроматине могут повышать адаптивные свойства. То, что гетерохроматин чувствителен к мутагенным воздействиям, подтверждается предпочтительным распределением в нём разрывов хромосом под действием мутагенных факторов [8], например, под действием 8-этоксикофеина, что наблюдал ещё А. Густавссон.

Результаты, полученные при многолетних наблюдениях за поведением высокоадаптивных мутантов и мутантных сортов озимой пшеницы, включая крайне неблагоприятные экстремальные годы и экстремальные регионы с разнообразными компонентами комплексов крайне неблагоприятных условий, относятся к наследственным явлениям, из года в год стабильно повторяющимся.

В данном исследовании для сравнения приводятся некоторые результаты, полученные на модельном объекте *Tradescantia paludosa*, с использованием модификаторов ненаследственного действия, повышающих выносливость. К этим модификаторам относятся низкие температуры, вибрация, антиоксидант ПАБК. Универсальные свойства ПАБК были также, как и свойства химических мутагенов, открыты И.А. Рапопортом [9]. Все исследованные модификаторы действовали таким образом, что повышалась устойчивость к неблагоприятным факторам среды. Не исключено что при действии вибрации и ПАБК снималась блокада гетерохроматина, после чего он смог проявлять функции, определяющие устойчивость к неблагоприятным факторам, но уже обратимо на фенотипическом уровне. Например, так было с клонами традесканции, оказавшимися в нетопленной теплице зимой.

Таким образом, можно сказать, что в данном исследовании были поставлены проблемные вопросы о повышении адаптивных свойств наследственного характера под влиянием возможного увеличения количества гетерохроматина посредством мутаций с помощью химического мутагенеза в сочетании с прежде установленными причинами – множественными мутациями, гетерозисом и доминантными мутациями. Учитывая высокую наследственную стабильность признака высоких адаптивных свойств хемомутантов и хемомутантных сортов делаем предварительное заключение о не только наследственном характере мутантных свойств высокой адаптивности, но и о необратимом наследственном характере изменений гетеро-

хроматина в сторону возможного увеличения его содержания под влиянием супермутагена ЭИ эпигенетического характера. Возможно ненаследственное влияние модификаторов на активность генов гетерохроматина и усиление выносливости к неблагоприятным факторам на модельном объекте *Tradescantia paludosa*, когда возможное активирующее влияние на гетерохроматин оказывается обратимым. Наблюдается повышение адаптивных свойств на озимой пшенице и яровом ячмене также на фенотипическом уровне под влиянием ПАБК [5, 6]. В последнем случае по-видимому действует ещё и механизм активации ферментов [10, 11]. Всё сказанное об анализе высоких адаптивных свойств на генетическом и фенотипическом уровнях требует дополнительных исследований, в частности касающихся гетерохроматина ферментов.

Выводы. В оптимальных дозах химического супермутагена ЭИ наблюдалась частая встречаемость высокоадаптивных хемомутантов, куда входят хемомутантные сорта озимой пшеницы – в 40% случаев и более. Этот наследственный феномен, а также широкий охват компонентов признака высоких адаптивных свойств и их стойкое стабильное проявление в течение многих лет, включая крайне неблагоприятные годы, а также в экстремальных регионах, наводит на мысль о том, что здесь помимо множественных мутаций, гетерозиса и доминантных мутаций, что было изучено ранее, действует ещё и другой механизм – эпигенетическое наследственное действие, осуществляющее влияние на жизненно важные функции организма, в том числе повышающее адаптивные свойства озимой пшеницы.

Параллельно для сравнения приводится действие модификаторов ненаследственного влияния на *Tradescantia paludosa*, повышающее адаптивные свойства. Обсуждаются возможные механизмы возникновения высоких адаптивных свойств наследственного и ненаследственного характера.

Литература

1. Делоне Н.Л. Начало космической генетики. // Москва, 2002, 159 с.
2. Рапопорт И.А. Карбонильные соединения и химический механизм мутаций. // Доклады АН СССР, 1946, Т. 54, №1, с. 65-68.
3. Эйгес Н.С. Генотипическое разнообразие мутантов озимой пшеницы и создание высокоадаптивных форм с комплексами ценных признаков. // Химический мутагенез и проблемы селекции. Москва, Наука, 1991, с. 77-92.
4. Эйгес Н.С. Волченко Г.А. Вайсфельд Л.И., Волченко С.Г. Адаптивные свойства озимой пшеницы, полученные методами наследственной и ненаследственной изменчивости. // Сборник научных трудов «Фундаментальная наука и практика с материалами Пятой Юбилейной телеконференции». Томск 2011, Т.2, №1, с. 55-59.
5. Эйгес Н.С. Влияние ПАБК на сорта озимой пшеницы в условиях производственного опыта. // Химические мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений. Москва, Наука, 1989, с. 38-64.
6. Эйгес Н.С. Изучение разных способов обработки ПАБК ярового ячменя в хозяйствах Ногинского района Московской области. // Химические мутагены и

пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений. Москва, Наука, 1989, с. 99-123.

7. *Эйгес Н.С., Вайсфельд Л.И., Волченко Г.А.* Один из аспектов гетерозиса, полученного методом химического мутагенеза на озимой пшенице. // Материалы докладов, сообщений Международного симпозиума «Гетерозис сельскохозяйственных растений». Москва, РАСХН, ВНИИССОК. 1997, с. 68-74.

8. *Прокофьева-Бельговская А.А.* Функции гетерохроматических районов хромосом. // Москва, Научный мир, 2005, с. 137-153.

9. *Рапопорт И.А.* Феногенетический анализ независимой и зависимой дифференцировки. // Труды Института цитологии, гистологии и эмбриологии. 1948, Т. 2, вып. 1 с. 3-135.

10. *Кожеевникова Н.А., Рапопорт И.А., Иванецкая Е.А., Пудрина И.Д.* Влияние пара-аминобензойной кислоты на активность дезоксирибонуклеазы интактного и облученного препарата. // Доклады АН СССР, 1983. Т. 273, №2, с. 476-479.

11. *Рапопорт И.А., Васильева С.В., Давниченко Л.С.* Роль пара-аминобензойной кислоты в репарации повреждений, индуцированных ультрафиолетовыми лучами и гамма-излучениями. // Доклады АН СССР, 1979. Т. 247, №1, с. 231-134.

Резюме

Обсуждаются возможные механизмы, посредством которых возникают высокие адаптивные свойства у озимой пшеницы наследственного характера при действии химического супермутагена ЭИ на генетическом уровне и при действии модификаторов – холода, вибрации, ПАБК на модельном объекте *Tradescantia paludosa* на фенотипическом уровне. Предполагается участие эпигенетических процессов на генотипическом и фенотипическом уровнях.

Обговорюються можливі механізми, за допомогою яких виникають високі адаптивні властивості за дії хімічного супермутагену на генетичному рівні і при дії модифікаторів – холоду, вібрації, ПАБК на модельному об'єкті *Tradescantia paludosa* на фенотипічному рівні. Передбачається участь епігенетичних процесів на генотипічному і фенотипічному рівнях.

Some possible mechanisms by that high adaptive properties arise on winter wheat by action of chemical supermutagene on genetic level and by action of modifikators on model object *Tradescantia paludosa* on phenotypic level are discussed. The participation of epygenetic processes on genotypic and phenotypic levels is supposed.

**БОЛТИНА І.В.¹, ВЕРГОЛЯС М.Р.², ПОВЯКЕЛЬ Л.І.¹, ЗЛАЦЬКИЙ І.А.²,
ЗАВАЛЬНА В.В.¹, КОВАЛЕНКО О.В.¹, ВАСЕЦЬКА О.П.¹, ЗАСЦЬ Є.Р.³,
СЕМЕНОВА А.Ю.⁴**

¹ ДУ «Інститут екологієни та токсикології ім. Л.І. Медведя», м. Київ
Україна, 03680 Київ, вул. Героїв Оборони 6, e-mail: irina_boltina@i.ua

² Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України,
м. Київ

³ Інститут медицини праці АМН України, м. Київ

⁴ Керченський державний морський технологічний університет, м. Керч

КОМПЛЕКСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКОСТІ ВОДИ РІЗНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Вивчення впливу на здоров'я населення різних несприятливих чинників довкілля, пов'язаних з людською діяльністю, є найбільш актуальним та складним завданням. Небезпека негативної дії на здоров'я населення і біоту в цілому може виникати внаслідок антропогенного забруднення зовнішнього середовища, зокрема, водного. До основних причин забруднення водоїмищ, за санітарно-епідеміологічними і мікробіологічними показниками є скидання неочищених та/або недостатньо очищених господарчо-побутових і промислових стічних вод, незадовільної експлуатації очисних споруд, відсутності санітарних зон, а також появи і накопичення відходів, що утворюються внаслідок аварійних ситуацій і катастроф.

Після розливу 2000 тонн нафти в Керченській протоці та у зв'язку з викидами на прибережну смугу нафти, що осіла після аварії на морське дно, утворювались відходи у вигляді сумішей піску і водоростей, забруднених нафтопродуктами, загиблими рибами і птахами. Тому інституту екологієни та токсикології ім. Л.І. Медведя була замовлена оцінка міри небезпеки цих відходів, відібраних 31.03.2008 р. у Керченській затоці біля причалу № 6 Д і наданих Держінспекцією по охороні природного довкілля Азовського і Чорного морів. В результаті отриманих експериментальних даних (встановлення параметрів гострої токсичності водних екстрактів з відходів в експерименті на теплокровних тваринах при різних можливих способах контакту та визначення ступеню токсичності з використанням тест-об'єкту інфузорії *Tetrahymena pyriformis* W) констатували, що водні екстракти аналізованої суміші відповідно до існуючої в Україні нормативної документації класифікуються як малотоксичні (IV клас небезпеки). Проте, результати експерименту по виявленню мутагенної активності водних екстрактів в тесті на індукцію хромосомних аберацій в культурі лімфоцитів перифе-

ричної крові людини *in vitro* без та з метаболічною активацією свідчать про можливість прояву мутагенного ефекту відходів, що слід враховувати при оцінці їх ризику [5].

Після цих досліджень були «перевірені мутагенні властивості» проб піску та морської води з наступних міст: Затока, Одеса (пляж Лузанівка), Алушта, Судак та Керч (міський пляж і човнова станція – стик вод Чорного і Азовського морів). Проби морської води (без проб піску) було взято в наступних містах на Чорному морі: Балаклава, Партеніт та Сімеїз.

Для оцінки токсичності прісноводних джерел в мегаполісі, на прикладі м. Києва, проби води було відібрано з 16 водойм різних районів Тельбін (Русанівка), Позняки, Нивки, Голосієво, Феофанія (п'ять озер та джерело), Оболонь, Святошин (два озера), Райдужний, Совки, Троєщина.

Крім того, були проведені дослідження якості 30 проб фасованої води.

Матеріали та методи

В основі культивування лімфоцитів *in vitro* та приготування препаратів хромосом застосований стандартний напівмікрометод з модифікаціями, що прийняті в лабораторії мутагенезу [1]. Цито- та генотоксичність питної води оцінювалась за лейкоцитарною формулою крові [3] та мікроядерним тестом на клітинах риб: еритроцити, клітини зябер та хвостового плавця [6]. Ембріотест на токсичність вод проведено на ембріонах риб *Danio Reio* [7].

Для визначення токсичності води з водойм м. Києва застосований ростовий тест *Allium cepa*, *L. Lepidium sativum* та *L. Triricum aestivum* (пшениці Київської) [4]. Визначення гострої летальної та хронічної токсичності води проводили на *Hydra Attenuata* (Pallas) та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) [2]. Дослідження зразків за радіологічними показниками проводили згідно НРБУ- 97 (розд. 8, п. 8.7.2 /а, б/). Парофазний аналіз води проводили на газовому хроматографі «Кристаллюкс 4000М» с ДЭЗ. Вміст мікроелементів визначали методом мас-спектрометрії з індуктивно – зв'язаною плазмою на приладі Varian 820 MS (USA).

Результати

Дослідження морської води. В результаті досліджень мутагенний ефект піску (при розведенні на дистильованій і морській воді) в варіанті експерименту без метаболічної активації був виявлений в пробах Затоки, Алушти і човновій станції в Керчі. Також було виявлено достовірне підвищення анеуплоїдних і мультиаберрантних клітин, що може свідчити про можливий канцерогенний ризик цих проб. В варіанті з метаболічною активацією (дослідження промутагенів та метаболітів) майже всі проби (крім морської води з Балаклави) показали токсичний ефект, який свідчить про можливий потенційний летальний вплив, що не може не насторожувати.

В одній з проб (міський пляж Керчі) було виявлено підвищення аберацій хромосомного типу (парних фрагментів), тому провели дослідження всіх зразків за радіологічними показниками. В пробі морської води місько-

го пляжу Керчі було виявлено найвищий вміст стронцію, який, щоправда, не перевищував норми. В пробі піску (міський пляж) також знаходилася досить значна кількість стронцію. Можливо, це пов'язано з мінералом стронціанітом (SrCO_3), який міститься у вапняках, і в результаті їх розкладання може переміщатись в пляжний матеріал). Але, стронцій руйнівню діє на імунітет людини і може викликати онкологічні захворювання, отже, на цей факт потрібно звернути увагу.

Таким чином, застосування культури лімфоцитів периферичної крові дає змогу не тільки оцінити мутагенні та можливі канцерогенні ефекти досліджуваних проб, а й передбачити вплив шкідливих чинників (хімічних та/або радіаційних) на організм.

Дослідження води озер міста Києва на ростових тестах Allium сера, L. Lepidium sativum та L. Triricium aestivum (пшениці Київської), а також із застосуванням терміну виживання *Daphnia*, та визначення сухої маси цибулин Allium сера, що пророщені на досліджуваній воді.

При застосуванні в якості тест-об'єктів рослинних та тваринних організмів у групі водойм з найнижчими та найвищими показниками у застосованих тестах були зроблені висновки, що озера на масивах Позняки, Троєщина, Нивки та Голосієво можна вважати найбільш токсичними для використаних тест-об'єктів.

Результати на культурі лімфоцитів периферичної крові свідчать про наступне: при дослідженні води озера Троєщина спостерігався самий сильний токсичний ефект при дослідженні як прямих, так і непрямих мутагенів, а, отже ця вода – найнебезпечніша зі всіх досліджених озер. У воді озер Нивки та Голосієво – найвищі статистичні показники кількості анеуплоїдних клітин із всіх досліджуваних озер – найвищий можливий ризик виникнення канцерогенного ефекту. При дії води озера Позняки на культуру лімфоцитів периферичної крові знайдено найвищу кількість мультіаберагантних клітин, а, отже – найвищий можливий вплив на зміни в системі репарації клітин.

В результаті отриманих даних (співпадання 70 % досліджень щодо токсичності обстежених водоймищ), зроблений висновок, що ростові тести та тест на термін виживання *Daphnia* можуть слугувати скринінговими при визначенні токсичності води.

При застосуванні тесту на ембріотоксичність встановлена хронічна токсичність у водах озера Нивки. Крім того, в даній пробі в процесі ембріогенезу відзначено порушення, які є сублетальними проявами, а саме порушення серцебиття, відсутність пігментації, недорозвиненість окремих організмів. Ці висновки підтверджує тест на загальну токсичність на гідрах.

Хоча використання біотестів для характеристики стану забруднення дозволяє ефективно (швидко та дешево) визначити наявність загального, інтегрального впливу на середовище, можна скласти лише попереднє уявлення про природу забруднення. При цьому набір реакцій організмів рос-

линного чи тваринного походження досить обмежених. Спостерігається або пригнічення росту або загибель організму. Подальші дослідження можна проводити на лімфоцитах периферичної крові людини, що значно здешевить та розширить проведення масових обстежень водою.

Застосування методу парофазного аналізу для дослідження морської води та води озер м. Києва показало достовірне перевищення дихлорметану в деяких пробах, а саме: м. Затока та 5-го озера Феофанія. Саме в цих пробах було знайдено найбільшу кількість одиночних фрагментів та обмінів.

Оцінка питної води. Згідно комплексній оцінці цито- та генотоксичності якості фасованих вод за мікроядерним тестом на клітинах риб отримані наступні результати:

–безпечна вода – Моршинська, Старий Миргород, Bonagva;

–умовно небезпечні води – Ордана, Софія Київська, Вода питна, Vittel, Bebitiva, Hipp;

–інші води віднесені до рангу – небезпечні.

Результати на культурі лімфоцитів периферичної крові на 87 % повторюють вище перераховані, за виключенням того, що в категорію безпечної води входить лише Моршинська. У пробах води старий Миргород та Bonagva при вивченні нативних проб в варіанті експерименту з метаболічною активацією відсоток аберацій хромосом складав 4,7% та 5,0 % відсотки відповідно. Хоча це не достовірне перевищення контрольного варіанту (спостерігався напівтоксичний ефект), але цей відсоток вище 3,0%, що не дає змоги віднести ці води до безпечних.

Аналізуючи дані кореляції між показниками в культурі лімфоцитів периферичної крові та ростовим тестом на *Allium* сера, можна визначити значимі показники: цитогенетичні дані в системі метаболічної активації в культурі лімфоцитів та довжину корінців *Allium* сера.

Отже, вищесказане дає змогу використовувати тести на рибах та ростові тести в якості скринінгових при дослідженні питної води.

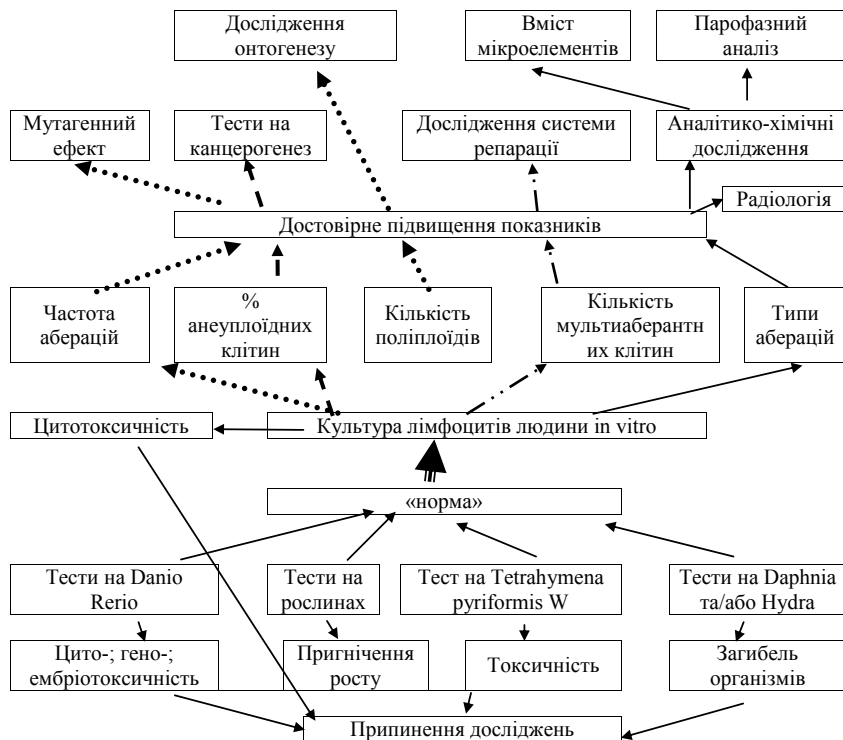
Дослідження мікроелементного складу води різного призначення показало значну відмінність між морською водою, водою з озер та питною фасованою водою, що можна використовувати при подальших дослідженнях для уточнення якості води.

Висновки. Таким чином, особлива небезпека мутагенних з'єднань полягає в тому, що вони можуть викликати значне збільшення числа рецесивних мутацій, що ведуть до важких захворювань, які не проявляються в першому поколінні, але, поступово накопичуючись, можуть через декілька поколінь викликати «вибух» захворюваності у різних живих об'єктів, включаючи людину. Але, тести на вивчення мутагенності не дуже дешеві та короткострокові, тому, для збільшення об'єму досліджуваних проб варто застосовувати скринінгові тести для відсіву найбільш токсичних проб. Крім того, проаналізувавши цитогенетичні показники в культурі лімфоцитів пе-

риферичної крові можна провести додаткові дослідження як це відображено на схемі 1.

Схема 1.

Застосування біотестів для дослідження води різного призначення



Література

1. А.с. (Свідство про державну реєстрацію прав автора на твір) Модифікація методу вивчення мутагенної активності речовин (метафазного аналізу аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові людини) in vitro з метаболічною активацією / Болгіна І.В. № 23794, заяв. 21.12.2007; опубл. 05.03.2008.

2. Архипчук В.В., Малиновська М.В., Гончарук В.В. Спосіб визначення хронічної токсичності водних розчинів. – Патент на винахід №74934. – 2006, Бюл.№2

3. Патент України за заявкою № а 2008 01532, МПК (2006) G 01N 33/18. Спосіб визначення цитотоксичності водного середовища. / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс. – Заявл.06.02.2008. Рішення про видачу патенту від 24.11.2008.

4. Паушева З.П. Практикум по цитологи растений. 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с

5. Повякель Л.И. Анализ опасности для природной среды и населения при загрязнении морской территории нефтепродуктами / Л.И. Повякель, И.В. Болгина,

В.С. Кривенчук, О.П. Жминько // Химия и технология воды. 2010. – т. 32. – № 2 – С. 230 – 236.

6. *Arkipchuk V.V., Garanko N.N.* Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2005. – Vol. 112. – P. 215-221.

7. *Adrian J.Hill, Hiroki Teraoka, Warren Heideman.* Zebrafishasa Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity // *Tox SCIENCES*. – 2005. – Vol. 86(1)6. – P. 19.

Резюме

Проведений аналіз якості води різного призначення з використанням багатьох тест-об'єктів. В результаті показана ефективність застосування комплексних досліджень для більш точної оцінки якості води.

Проведен качества воды разного назначения с использованием многих тест-объектов. В результате показана эффективность применения комплексных исследований для более точной оценки качества воды.

The analysis of water of the different setting is conducted with the use of many test-objects. As a result efficiency of application of complex researches is shown for more exact estimation of quality of water.

ГЕРМАН Е.Ю., БАЕВА Т.И., ВИНОКУРОВА Л.В., ШЕСТОПАЛОВА Н.Г.

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

Украина, 61070, Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: elenagerman2009@gmail.com

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ И СПЕКТРА ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РАДИОАДАПТИВНОГО ОТВЕТА ИНБРЕДНЫХ И ГЕТЕРОЗИСНЫХ РАСТЕНИЙ *HELIANTHUS ANNUUS L.*

Исследование проблемы повышения устойчивости клеток и организмов к действию ионизирующей радиации составляет одну из задач современной биологии. Одним из механизмов защиты клеток от повреждающего действия радиации является индуцированный радиоадаптивный ответ (РАО), который проявляется в уменьшении последствий влияния высоких, ударных, доз радиации после предварительного облучения малыми, адаптирующими, дозами.

Процессы роста и развития растений зависят от структурно-функционального состояния генетической системы клеток [1,2]. Действие гамма-радиации нарушает целостность ДНК, приводит к возникновению различных типов повреждений. Уровень цитогенетических повреждений является информативным показателем при изучении проявления радиационной адаптации и отражает активность защитных систем клетки [3,4].

Целью работы было изучение возможности индукции и степени проявления РАО в связи с явлениями инбредной депрессии и гетерозиса.

Материалы и методы

Объектами исследования были клетки корневой меристемы проростков семян инбредных линий Сх503А и Х711В и гетерозисного гибрида подсолнечника Харьковский 58, полученного от их скрещивания в Институте растениеводства им. В.Я. Юрьева УААН. Воздушно-сухие семена облучали γ -радиацией ^{60}Co в адаптирующей дозе 50 Гр, ударной дозе 200 Гр, последовательно по схемам 50Гр-200Гр и ммВ-50Гр-200Гр для индукции РАО. ммВ – радиоволны мм-диапазона применили как известный радиопротекторный и стимулирующий фактор [5]. В качестве контроля использовали необлученные семена. Проростки фиксировали в течение первых митотических циклов. На цитологических препаратах анафазным методом учитывали уровень и спектр хромосомных aberrаций.

Результаты и обсуждение

Результаты учета частоты появления проростков с aberrациями хромосом в контроле и при различных режимах облучения выявили, что спонтанное возникновение нарушений нормального течения митоза происходит у 27% проростков материнской линии, 10% отцовской линии и 23% гибрида. После облучения дозой 50 Гр проростки с aberrациями хромосом появлялись на 50% чаще у всех форм ($p < 0,05$), а повышение дозы до 200 Гр привело к дальнейшему увеличению показателя ($p < 0,01-0,05$).

Действие предварительного облучения в дозе 50 Гр у линий снижало частоту появления проростков, в меристеме которых были нарушены процессы деления клеток, с 100% в варианте 200 Гр до 55% у материнской линии ($p < 0,05$), с 88% до 60% у отцовской линии. Выраженность РАО была максимальной у отцовской линии в варианте ммВ-50-200: предоблучение двумя адаптирующими факторами снизило в 2 раза ($p < 0,05$) частоту проростков с хромосомными нарушениями. В выборке проростков семян гибрида достоверное снижение частоты проростков с aberrациями хромосом после предварительного действия адаптирующих режимов не выявлено, наблюдали тенденцию к развитию РАО.

Таким образом, по критерию количества проростков с хромосомными aberrациями индукция РАО происходила у линий.

Появление проростков с хромосомными aberrациями свидетельствует о мутационных процессах на уровне популяции, но не отражает степень поврежденности генома после воздействия облучения. Для выявления индуцированной радиационной адаптации, проявляющейся на клеточном уровне, анализировали частоту возникновения цитогенетических повреждений среди всех учитываемых клеток.

В контрольном варианте частота появления хромосомных мутаций была низкой и составила $0,6 \pm 0,1$ и $0,3 \pm 0,1\%$ у линий и $0,9 \pm 0,2\%$ у гибрида. Результаты учета частоты aberrантных клеток после действия радиации показали, что все режимы облучения способствуют значительному повышению уровня мутагенеза. Накопление aberrаций с увеличением дозы об-

лучения от 50 Гр до 200 Гр происходило интенсивнее в меристеме линий, чем в меристеме гибрида.

В варианте 50Гр-200Гр показано четкое формирование РАО у линий как достоверное снижение уровня хромосомного мутагенеза. Под воздействием двух адаптирующих режимов предоблучения (вариант ммВ-50Гр-200Гр) частота появления структурных мутаций достоверно снижалась только в меристеме отцовской линии. У материнской линии и в меристеме гибрида выявлена тенденция к снижению количества повреждений после совместного адаптирующего предоблучения.

У гибрида РАО проявлялся как снижение максимальных значений частоты aberrантных клеток в вариантах с предоблучением, причем совместное действие двух адаптирующих режимов (вариант ммВ-50Гр-200Гр) снижало уровень повреждений в большей степени.

Снижение показателей хромосомного мутагенеза свидетельствует об активации клеточных систем защиты и индукции РАО. В связи с тем, что достоверный адаптивный ответ к действию радиации регистрировали у линий по критерию количества клеток с хромосомными aberrациями и числу проростков с aberrациями хромосом (наблюдали уменьшение их частоты в вариантах с предоблучением), можно предположить, что действие адаптирующих режимов у линий направлено на активацию репаративных процессов.

Спектр мутаций, вызванных действием ионизирующего излучения, отражает степень поврежденности генетических структур и активность процессов репарации в клетках линий и гибрида.

Естественный уровень мутирования был низким в меристеме проростков и линий, и гибрида, что не позволило выделить основные типы повреждений, характерные для необлученных семян. Под воздействием дозы облучения 50 Гр количество структурных мутаций возросло, основная доля среди них принадлежала клеткам с мостами, причем чаще мосты регистрировали в меристеме линий (60–64,5%), а в меристеме гибрида доля мостов была ниже (49%). Облучение в адаптирующей дозе обусловило появление незначительного количества клеток с множественными повреждениями. С увеличением дозы до 200 Гр количество мостов относительно других типов повреждений снижалось, чаще регистрировали множественные aberrации. Их доля увеличилась в 3–4 раза у отцовской линии и гибрида, и почти в 8 раз у материнской линии.

Анализ частоты появления клеток с множественными повреждениями хромосом после предварительного действия адаптирующих режимов (рис. 1) выявил однотипные изменения у линий и гибрида. Действие дозы 50 Гр перед облучением дозой 200 Гр снижало долю множественных цитогенетических повреждений в 2 раза в меристеме материнской линии и в меристеме гибрида. Уменьшение количества множественных aberrаций в меристеме отцовской линии было менее существенно. Мм-волны в качест-

ве дополнительного адаптирующего фактора обусловили дальнейшее снижение доли множественных aberrаций хромосом у гибрида и линий, что свидетельствует об активации клеточных систем защиты и индукции PAO.

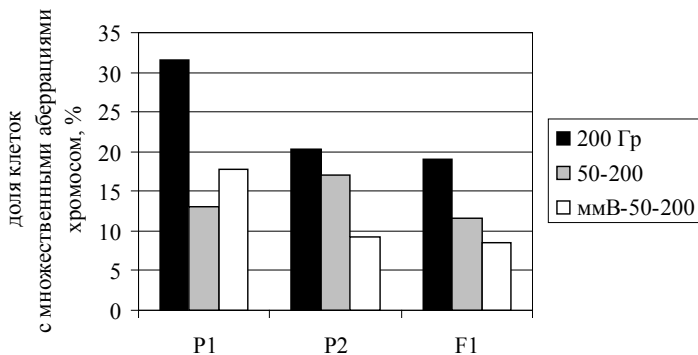


Рис. 1. Снижение доли клеток с множественными aberrациями после предварительного облучения в адаптирующих режимах.

В меристеме гибрида накопление клеток с множественными повреждениями происходило менее интенсивно, их доля в общем числе поврежденных была ниже, чем у линий, а при действии высоких доз увеличивалась частота появления одинарных и двойных фрагментов.

Репарация множественных повреждений затруднена, по сравнению с восстановлением единичного повреждения, занимает больше времени, для ее осуществления необходимо больше энергии. Клетки с большим количеством нерепарированных повреждений подвергаются репродуктивной гибели [6]. Для восстановления пролиферативного пула в митоз вступают радиоустойчивые резервные клетки, обеспечивая процесс репопуляции. Большое количество клеток с множественными повреждениями может свидетельствовать о высокой радиочувствительности клеточной популяции, неэффективности репарационных процессов или о недостаточно интенсивном процессе вовлечения в митоз неповрежденных клеток.

Различия в уровне клеток с множественными aberrациями хромосом в меристеме гибрида и линий, по видимому, обусловлено различной способностью к согласованности регуляции метаболических процессов, в том числе и репарации, которая у гибридов по сравнению с родительскими формами осуществляется более координировано на различных уровнях – от клеточного до организменного [7]. Активация систем репарации ДНК происходит путем индукции синтеза ферментов de novo [8], а так как в клетках гибрида могут находиться два и более аллеля одного и того же гена, это способствует сохранению оптимальной активности фермента в более широком диапазоне условий (например, при воздействии ударной дозы), чем

у родительских форм. Кроме того, в связи с более активными пролиферативными процессами в меристеме гибридных растений [9], чем в меристеме линий, можно предположить быструю элиминацию поврежденных клеток из популяции.

Выводы

Таким образом, на ранних этапах прорастания семян феномен РАО проявляется у всех исследуемых форм, но степень выраженности его различна. Защитная реакция (РАО) активируется после стимулирующего воздействия предоблучения, в большей мере проявляется при предоблучении двумя адаптирующими режимами, и проявляется в снижении уровня хромосомного мутагенеза, снижении частоты появления клеток с множественными повреждениями хромосом.

Литература

1. *Куцоконь Н.К., Безруков В.Ф., Лазаренко Л.М. и др.* Кількість аберацій на аберантну клітину як параметр хромосомної нестабільності. 1. Характеристика дозових залежностей // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37, № 4. – С. 20-25.
2. *Хансон К.П., Комар В.Е.* Молекулярные механизмы радиационной гибели клеток. – М.: Энергоатомиздат, 1985. – 152 с.
3. *Гродзинский Д.М.* Радиобиология растений. – К.: Наукова думка, 1989. – 384 с.
4. *Rigaud O., Moustacchi E.* Radioadaptation for gene mutation and the possible molecular mechanisms of the adaptive response // *Mutat. Res.* – 1996. – Vol. 358. – P. 127-134.
5. *Долгова Т.А., Шестопалова Н.Г.* Индукция и проявление радиоадаптивного ответа клеток меристемы проростков в условиях раздельного и комбинированного действия ионизирующего и неионизирующего излучений // Труды по фундаментальной и прикладной генетике (к 100-летию юбилею генетики). – Харьков: Штрих, 2001. – С. 251-259.
6. *Серебряный А.М., Зоз Н.Н., Морозова И.С.* К механизму антимуtagenеза у растений // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 5. – С. 676-679.
7. *Титок В.В., Юренкова С.И., Титок М.В., Хотылева Л.В.* Характеристика энергетического метаболизма в онтогенезе льна-долгунца при гетерозисе // Генетика, 2005. – Т. 41, № 5. – С. 668-675.
8. *Данильченко О.О., Гродзинський Д.М.* Участь систем репарації ДНК у формуванні РАО у рослин // Парадигми сучасної радіобіології: наукова конференція. Київ; Чорнобиль, 25-27 вересня 2004р. – Київ; Чорнобиль, 2004. – С. 15-16.
9. *Шестопалова Н.Г., Баева Е.Ю.* Радиоадаптивный ответ клеток листовой меристемы инбредных линий и гетерозисных растений *Helianthus annuus* L. В период раннего и позднего онтогенеза // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 44, № 6. – С. 44-49.

Резюме

Исследовали изменение уровня и спектра цитогенетических повреждений в меристеме проростков семян линий и гибрида подсолнечника при формировании радиоадаптивного ответа. Выявлен дозовый характер выхода хромосомных аберраций и его зависимость от генотипа.

Досліджували зміни рівню і спектру цитогенетичних пошкоджень в меристемі проростків насіння ліній і гібриду соняшника при індукції радіоадаптивної відповіді (РАВ). Виявлено дозовий характер виходу аберацій хромосом і його залежність від генотипу.

Changes in level and spectrum of cytogenetic damages in meristem cells of inbred and hybrid sunflower irradiated seeds when radioadaptive response (RAR) induced were investigated. It was shown, that the chromosomal aberration yield is depend on genotype and radiation dose.

ДЬОМІНА Е.А., МИХАЙЛЕНКО В.М.

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С.Кавецкого НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 45, e-mail: edjomina@ukr.net

ОСОБЛИВОСТІ КОМБІНОВАНОГО ВПЛИВУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ НА РОЗВИТОК ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ: ДОЗА-ЕФЕКТ, КОНЦЕНТРАЦІЯ-ЕФЕКТ

Відповідно до сучасних уявлень, оксид азоту (ОА) приймає участь на всіх етапах патогенезу неоплазій, у формуванні індивідуальної радіаційної чутливості людини [1-3]. Відносно високі концентрації ОА приводять до виснаження антиоксидантного захисту, що порушує механізми репарації ДНК та відповідно підвищує рівень соматичних мутацій [4, 5]. Визначено здатність ОА та його похідних пошкоджувати структуру ДНК, що доводить не тільки участь в утворенні хромосомних перебудов, але й в індукції пухлин [3]. ОА відіграє суттєву роль у формуванні радіобіологічної відповіді клітин ссавців як в умовах *in vivo*, так *in vitro* [6], але при цьому досі не визначено характер залежності впливу ОА від дози опромінення на генетичному рівні клітин людини. Багато біологічних функцій, залежних від активності ОА, безпосередньо зв'язані з ендогенним утворенням нітрозотіолів (НТ). НТ являються основною формою транспорту ОА, який вивільняється з них при фізіологічних умовах та здатний створювати передумови для виникнення і акумуляції абераційних клітин [7].

Враховуючи мультипотентний характер впливу ОА на клітини людини, та приймаючи до уваги радіоекологічну ситуацію, що склалася після Чорнобильської катастрофи на території окремих регіонів України [8], актуальними є дослідження особливостей ефектів комбінованої дії ОА та іонізуючої радіації на генетичному рівні соматичних клітин людини в залежності від величини поглиненої дози опромінення. В якості радіобіологічної основи для вирішення таких питань пропонується тест-система лімфоцитів периферичної крові (ЛПК) з подальшим аналізом індукованих аберацій хромосом завдяки унікальним властивостям цих клітин [9, 10].

Мета роботи: дослідити вплив ОА на формування радіаційно-індукованих аберацій хромосом в соматичних клітинах людини в залежності від його концентрації та дози опромінення (дослідження *in vitro*).

Матеріали і методи

Культура ЛПК практично здорових осіб з метафазним методом аналізу аберацій хромосом. Нітрозований глутатіон (НГ) використовували в якості транспортної форми оксиду азоту та додавали в культуру клітин в діапазоні концентрацій 0,5–1,5 мкМ/л крові. Культуру клітин опромінювали на установці «РУМ-17» в діапазоні доз 0,5-1,5 Гр при потужності дози 0,41 Гр/хв.

Результати та обговорення

Цитогенетичні дані, які отримано при дії НГ на ЛПК в культурі, свідчать, що з підвищенням його концентрації (0,5-1,0 мкМ/л) зростає рівень лімфоцитів з абераціями та загальна частота аберацій хромосом (від $6,0 \pm 0,2$ та $7,0 \pm 0,2$ до $12,0 \pm 1,0$ та $18,3 \pm 1,4$ відповідно) (табл.). У спектрі індукованих пошкоджень превалюють аберації хроматидного типу, як делеції, так і обміни.

При опроміненні культури ЛПК донорів у спектрі пошкоджень превалюють аберації хромосомного типу, рівень яких зростає з підвищенням дози опромінення (0,5-1,5 Гр), що не протирічить класичній теорії утворення радіаційно-індукованих хромосомних перебудов.

За умов комбінованої дії НГ в концентрації 1,0 мкМ/л та опроміненні в дозі 1 Гр спостерігається сверхадитивний ефект для всіх досліджених цитогенетичних показників. Вважаємо, що такий ефект обумовлено пригніченням процесів репарації індукованих пошкоджень внаслідок комбінованого впливу радіаційного та хімічного факторів у відносно високих дозах. Подальше підвищення концентрації НГ було б недоцільне, так як раніше нами встановлено, що при таких умовах проліферативна активність лімфоцитів знижується не менше ніж на 60% порівняно з контролем [11], що суттєво ускладнює проведення метафазного аналізу.

При подальшому підвищенні дози опромінення до 1,5 Гр і додаткової дії на клітини НГ в концентрації 1,5 мкМ/л спостерігається зниження цитогенетичного ефекту за рахунок частоти лімфоцитів з абераціями хромосом, загальної частоти аберацій хромосом. Якщо аналіз обмежити тільки даними, що отримані в нашому дослідженні при короткотривалому культивуванні клітин (фіксація культури ЛПК на 52 год. інкубації), то зниження індукованого цитогенетичного ефекту можна пояснити елімінацією найбільш пошкоджених (навантажених хромосомними перебудовами) клітин. З іншого боку сумісна дія опромінення та НГ за таких доз може призводити клітини не тільки до загибелі, але й до затримки їх поділу.

Таким чином, для об'єктивної інтерпретації результатів дослідження, що спрямоване на визначення особливостей комбінованого впливу ОА та іонізуючої радіації на хромосомний апарат лімфоцитів людини, а також з'ясування механізмів їх дії, подальше дослідження доцільно виконувати

Таблиця

Частота та спектр аберацій хромосом в культурі лімфоцитів периферичної крові донорів за умов комбінованої дії нітрозованого глутатіону та опромінення

№	Варіанти експерименту	Цитогенетичні показники (на 100 метафаз)			
		Частота абераційних клітин, %	Загальна частота аберацій хром.	Аберації хромосомного типу	Аберації хроматидного типу
1	Контроль інтактний	1,1±0,3	1,1±0,3	0,3	0,8
2	Опромінення 0,5 Гр	11,0±1,3	11,0±1,3	5,8	5,2
3	Опромінення 1,0 Гр	18,0±1,4	18,0±1,4	12,0	6,0
4	Опромінення 1,5 Гр	26,0±1,8	34,0±1,8	26,0	8,0
5	НГ 0,5 мкМ/л	6,0±0,2	7,0±0,2	-	6,0
6	НГ 1,0 мкМ/л	12,0±1,0	18,3±1,4	0,3	18,0
7	Опромінення 0,5 Гр+ НГ 0,5 мкМ/л	20,0±1,4	21,0±1,7	8,0	13,0
8	Опромінення 0,5 Гр+ НГ 1,0 мкМ/л	24,0±1,6	26,0±1,6	7,0	19,0
9	Опромінення 1,0 Гр+ НГ 0,5 мкМ/л	27,0±1,5	30,0±1,9	10,0	20,0
10	Опромінення 1,0 Гр+ НГ 1,0 мкМ/л	37,0±1,8	46,0±1,6	13,0	33,0
11	Опромінення 1,5 Гр+ НГ 0,5 мкМ/л	35,0±2,0	48,0±1,9	23,0	25,0
12	Опромінення 1,5 Гр+ НГ 1,0 мкМ/л	23,0±1,4	25,0±1,4	17,0	8,0

Примітка: НГ – нітрозований глутатіон.

при довготривалому культивуванні ЛПК, наприклад, 62, 72 год., враховуючи наш попередній досвід [12].

Висновок. Комбінована дія оксиду азоту та опромінення обумовлює дестабілізацію хромосомного апарату лімфоцитів периферичної крові людини, ступінь і характер прояву якої залежить від величини доз вказаних агентів.

Література

1. Janssen M.Y., Verovski V.N., van den Berge et al. Radiosensitization of hypoxic tumour cells by S-nitroso-N-acetylpenicillamine implicates a bioreductive mechanism of nitric oxide generation // Br. J. Cancer, 1999. – V. 79. – № 7-8. – P. 1085-1089.
2. Губкина С.А. Оксид азота и его физиологические комплексы в системах, моделирующих карбонильный стресс и их динамику в организме. Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. – М.: 2009. – 24 с.
3. Bonavida B. (Editor). Nitric Oxide (NO) and Cancer Prognosis, Prevention, and Therapy. Springer. New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010. – 513 p.

4. Дмитренко Н.П., Холиан А. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. 2. Токсическое действие оксида азота // Укр. біохім. журнал, 2005. – Т. 77. – № 5. – С. 5-23.

5. Каримов Х.Я., Иноятова Ф.Х., Мухамедова М.Т. Изменения некоторых показателей синтеза окиси азота в ранние периоды развития гепатоканцерогенеза // Врачебное дело. – 2002. – №7. – С. 90-95.

6. Коноплянников А.Г. и соавт. Влияние некоторых ингибиторов NOS из дигидротиазин-тиазолинового ряда на пострadiационное восстановление КОЕ-С-8 у мышей // Радиц. биология. Радиозкология, 2007. – Т. 47. – № 1. – С. 5-9.

7. Gow, A.J., Chen, Q., Hess, D.T., Day, B.J., Ischiropoulos, H., and Stamler, J.S. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. J. Biol. Chem., 2002. v. 277. –P. 9637–9640.

8. Двадцать пять лет Чернобыльской катастрофы. Безопасность будущего. – Национальный доклад Украины. К.: КіМ. – 2011. – 368 с.

9. Гриневиц Ю.А., Дёмина Э.А. Иммунные и цитогенетические эффекты плотно- и редкоизирующих излучений. Под. ред. А.А. Ярилина. – К.: «Здоров'я». – 2006. – 200 с.

10. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Vienna: IAEA, 2001. Technical Reports series № 405. – 126 p.

11. Дьоміна Е.А., Михайленко В.М. Дослідження ролі оксидів азоту в розвитку цитогенетичних ефектів при дії іонізуючого випромінювання / Фактори експериментальної еволюції рганизмів. Сб. Науч. Работ. К.: Логос, 2011. – 2011. – Т. 11. – С. 475-479.

12. Domina E.A., Mikhailenko V.M., Glavin O.A. The combined effects of S-nitrosothiol and radiation on human somatic cells at the chromosomal level / 10th International LOWRAD Conference “The Effects of Low Doses and Very Low Doses of Ionizing Radiation on Human Health and Biotopes” 5-7 December 2011, Kyiv.

Резюме

Комбінований вплив оксиду азоту та опромінення обумовлює дестабілізацію хромосомного апарату лімфоцитів крові людини, ступень і характер прояву якої залежить від величини доз вказаних агентів. За умов комбінованої дії оксиду азоту в концентрації 1,0 мкМ/л та опроміненні в дозі 1 Гр спостерігається сверхаддитивний ефект для всіх досліджених цитогенетичних показників.

Комбинируванное влияние оксида азота и облучения вызывает дестабилизацию хромосомного аппарата лимфоцитов крови человека, степень и характер проявления которой зависит от величины доз указанных агентов. В условиях комбинированного действия оксида азота в концентрации 1,0 мкМ/л и облучения в дозе 1 Гр наблюдается сверхаддитивный эффект для всех исследованных цитогенетических показателей.

The combined influence of nitric oxides and ionizing radiation leads to the destabilization of chromosomal apparatus of human blood lymphocytes. The level and nature of this destabilization depends on the quantitative doses of the mentioned agents. On the premises of the combined influence of nitric oxides in the concentration 1,0 $\mu\text{M/L}$ and irradiation in the dose 1 Gy, the super additive effect is observed for all the analysed cytogenetic indicators.

КОНОВАЛОВ В. С.

Институт разведения и генетики животных, НААН Украина. Научно-методический центр. 0831.с. Чубинское, ул.Погребняка 1, Бориспольский район Киевской области . e-mail:konovalov_vs@ukr.net

КОНЦЕПЦИЯ ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОБУСЛОВЛЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МУЖСКОГО НАСЕЛЕНИЯ ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ

Достигнутый европейскими странами уровень научно-технического прогресса отражает не только успехи современной цивилизации, но и новые проблемы связанные с загрязнением природной среды этих государств различными ксенобиотиками. Наиболее значительные медико-биологические проблемы антропогенного загрязнения характерны для населения стран



Западной и Восточной Европы в виде снижения репродуктивной способности мужчин «белой расы». Сто лет назад средняя концентрация сперматозоидов составляла 80–100 млн. на 1 куб. см семенной жидкости, в 2000 г.– 40–60 млн. т.е. вдвое меньше. Если процесс будет развиваться с такой же скоростью далее, через 20–30 лет концентрация сократится до 20 млн., что уже является физиологическим пределом для оплодотворения (1). Возникает вопрос: как это могло произойти в социально и экономически благополучной Западной Европе? Дело в том, что экспертные оценки о экологическом благополучии стран Западной Европы преимущественно отражают внешнюю сторону проблемы, как правило замалчивая о формирующихся скрытых генетических рисках от более чем 100 функционирующих атомных реакторов. Устойчивая динамика снижения концентрации генеративных клеток в куб.см. эякулята у мужчин-европейцев на 2,0% в год требует более глубокого анализа формирующихся у европейского населения (периода 1950-2000 гг.) скрытых генетических рисков. Выделяем четыре периода формирования взаимодействия «генотип-среда»:

1). 1946-1948 г.г.

Период затопления СССР и США в Балтийском море более 400 тыс. тонн химического оружия гитлеровского вермахта, а также затоплении СССР в Белом море более 30 тыс. тонн химоружия (2). Именно этот период открыл счет формированию скрытых отдаленных последствий для структуры и функции генома европейского населения (1950-2000 г.г.) /*В 1990 г. в Белом море произошла экологическая катастрофа вследствие которой погибло более 1 млн. морских звезд .В рамках советско-американского взаимодействия, по инициативе Международного социально-экологического

союза, в 1991 году проводилась независимая экологическая экспедиция. Научным руководителем экспедиции был проф. Вячеслав Коновалов, экспертом по химическому загрязнению - доктор химических наук Юфит С.С. Достоверно установлено присутствие в морской воде и теле погибших морских звезд сильно действующих токсических веществ. Все материалы протоколно документированы с применением фотографирования, ауди и видеозаписи/.

2). 1950-1970 г.г.

Период не только интенсивного восстановления народного хозяйства на территориях Западной и Восточной Европы, но и тотального загрязнения территорий этих стран сточными водами промышленных и сельскохозяйственных предприятий, интенсивного загрязнения почв бесконтрольным применением минеральных удобрений и пестицидов.

3). 1970-1990 г.г.

В начале 70 годов в Западной Европе начались устойчиво внедряться идеи охраны природы, экологизации производств и безотходных технологий. Важную роль в этом движении сыграла активность ученых Римского клуба по прогнозированию глобального развития техногенных технологий. Аналогичные природоохранные тенденции развивались и в СССР. Однако уже в 80 годы 20 столетия в СССР начинала формироваться политическая нестабильность. Чернобыльская катастрофа планетарного масштаба 1986г. способствовала ускорению распада СССР.

4). 1990-2010 г.г.

Устойчивое развитие Западной Европы обеспечило достаточно высокий экологический уровень ее территорий. В странах бывшего СССР смена политического курса, радиационно-химическое загрязнение значительных территорий Белоруссии, Украины и России негативно отразились на здоровье населения Восточной Европы и в частности на снижении репродуктивной способности населения проживающего на экологически напряженных территориях .

Наш опыт более чем 30 летнего мониторинга за скрытыми процессами дестабилизации генома населения Украины дает основание утверждать, что в результате взаимодействия многих антропогенных факторов сформировались новые генотоксические взаимодействия ксенобиотиков. Синергизм их взаимодействия не только угнетает процессы нормального сперматогенеза, но и разбалансирует весь гомеостаз организма(3).

Темпы увеличения числа наименований ксенобиотиков в среде обитания человека до 1 млн. ставили « в тупик » возможность организации экологического мониторинга за системной оценкой взаимодействия «генотип-среда».

Структурно-функциональная концепция эколого-генетического мониторинга У-хромосомы.

Основываясь на фактах определяющего влияния генов У-хромосомы на процессы сперматогенеза стало очевидным – современный уровень развития молекулярных и информационных технологий позволяет применить генно-протеомное биочипирование необходимое для проведения эколого-генетического мониторинга. Мониторинга за процессами формирования генотоксических барьеров нормального сперматогенеза. Рассмотрим основные составляющие элементы предлагаемой нами диагностической панели У-хромосомы.

Влияние структуры У хромосомы на формирование мужского бесплодия.

У-хромосома самая малая хромосома кариотипа состоящая из около 50 млн. нуклеотидных пар (н.п.). Гены У-хромосомы, определяя детерминацию формирования мужского пола, через свое гемизиготное состояние обуславливают высокую скорость мутаций в У-хромосоме. В частности, эта скорость мутирования может быть в 4 раза выше, чем в Х-хромосоме. Соответственно предлагаемой диагностической модели возможность чипирование (4) на гелевом носителе всей целостной структуры у-хромосомы сперматозоида позволяет не только разместить на биочипе генно-протеомные составляющие, но и регистрировать формирующуюся обратную связь:

1) т.е. регистрировать частоты встречаемости генов различных участков длинного плеча (*AZFa-участка* -гены DFFRY/DFFRX; DBY/DBX; UTY/UTX.; TB4Y/TB4X. 5) DBY, UTY и TB4Y); *AZFb-участка* (гены RBM, CDY, XKRY., eIF-1A. SMCY); *AZFc-участка* (кластер генов DAZ); PRY; BPY2; TTY2, CDY, RBM; и *короткого плеча* (ZFY,TSPY,SRY) (5). и серии их множественных алелей;

2) идентифицировать микросателлиновые мутации двух типов(5):SNP мутации (Single nucleotide polymorphism)-одиночные нуклеотиды и STR мутации (short tandem repeat) характеризующиеся короткими тандемными повторами типа.

1 2 3 4 5 6 7 8 9
 СТГТСТГ **TCTA TCTA TCTA TCTA TCTA TCTA TCTA TCTA TCTA** TCTGCC.

Название маркера	DYS 393	DYS 390	DYS 19	DYS 391	DYS 385a	DYS 385b	DYS 426	DYS 388
Число повторов	13	25	16	10	11	14	12	12

К настоящему времени известно более двухсот STR-локусов У-хромосомы.

Важной диагностической особенностью микросателлитного анализа является их ассоциированная связь с определенными патологическими состояниями.

Предполагаем, что микросателлитный мутагенез найдет свое отражение и в формировании эпигеномной изменчивости негативно отражающейся на сперматогенезе.

3) производить скрининг активности протеомных маркеров в виде 6 классов ферментативных систем обеспечивающих тысячи вариантов биохимических реакций (6)

КФ 1: **-Оксидоредуктазы**, катализирующие окисление или восстановление. Пример: каталаза, алкогольдегидрогеназа. КФ 2: **-Трансферазы**, катализирующие перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую. Среди трансфераз особо выделяются киназы, переносящие фосфатную группу, как правило, с молекулы АТФ. КФ 3: **-Гидролазы**, катализирующие гидролиз химических связей. Пример: эстеразы, пепсин, трипсин, амилаза, липопротеинлипаза. КФ 4: **-Лиазы**, катализирующие разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойной связи в одном из продуктов. КФ 5: **-Изомеразы**, катализирующие структурные или геометрические изменения в молекуле субстрата. КФ 6: **-Лигазы**, катализирующие образование химических связей между субстратами за счет гидролиза АТФ.

Жизнь в мегаполисе. Эколого-генетического мониторинг наиболее реально проводить в мегаполисах, которые имеют необходимую диагностическую инфраструктуру. Именно здесь бурная урбанизация наиболее негативно влияет на общий уровень качества здоровья и особенно на фертильность мужчин-европейцев «белой расы». Важно учитывать, что масштабы формирования городских мегаполисов и их интенсивная урбанизация будут возрастать. Показательна динамика проживания землян в городах в 1900г. до 14%, в 2008г. эта цифра возросла до 50%. По прогнозам ООН к 2050г. горожанами станет 70% человечества.

Особенности формирования качества здоровья восточных славян. В свете обсуждаемой проблемы особую тревогу вызывают тенденции снижения не только репродуктивной способности мужчин Восточной Европы, но и их высокой смертности в наиболее продуктивном возрасте 30-45 лет. К глубокому сожалению, для значительной части мужчин (восточных славян в 1980-2010 г.г.) присущ недостаточный уровень национального самосознания о необходимости соблюдении правил здорового образа жизни. На фоне значительного числа экологических проблем подобное отношение к собственному здоровью ускоряет процессы старения и существенно отражается на демографической ситуации.

Вывод: Считаю, что результаты эколого-генетического мониторинга не только расширят имеющиеся представления о эпидемиологических и этнических особенностях взаимодействия «генотип-среда», но и позволят найти неординарные решения повышения репродуктивной способности мужчин –европейцев «белой расы».

Литература

1. *Быков, В.Л.* Сперматогенез у мужчин в конце XX века (обзор литературы) / В.Л. Быков // Пробл. репродукции. 2000. – № 1. – с. 6-13.
2. Экологические последствия воздействия химического и биологического оружия на окружающую среду. www.argumenti.ru
3. *Коновалов В.С.* Генетические аспекты чернобыльской катастрофы-25 лет спустя.// Національна екологічна політика в контексті європейської інтеграції України. Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції 27 жовтня 2010 р. Київ 2010 с.204-208./
4. *Мирзабеков А.Д.* Биочипы в биологии и медицине XXI века. Вестник российской академии наук т. 73, № 5, с. 412 (2003)
5. www.genecards.org
6. Номенклатура ферментов (рекомендации). Москва 1979 г. с.3-318

Резюме

Основываясь на ретроспективном анализе снижения эффективности сперматогенеза мужчин западной и восточной Европы (период 1940-2010 г.г.) автором сформулирована концепция эколого-генетического мониторинга. На основании современной генетической базы предложен генно-протеомный состав чипированной панели У-хромосомы.

Грунтуючись на ретроспективному аналізі зниження ефективності сперматогенезу чоловіків західної та східної Європи (період 1940-2010 р.р.), автором сформульована концепція еколого-генетичного моніторингу. На підставі сучасної генетичної бази запропонований генно-протеомний склад чіпованої панелі У-хромосоми.

Based on a retrospective analysis of spermatogenesis in men decrease the effectiveness of the western and eastern Europe (the period of 1940-2010 years) the authors are formulated the concept of environmental and genetic monitoring. On the basis of modern genetic base are proposed genetic proteomic composition of the panel chipped Y chromosome.

КОПЫТЧУК Т.Е., СЕЧНЯК А.Л.

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, Шампанский пер. 2, Одесса, Украина, 65058,

e-mail: Tatyana_Kopytchuk@i.ua

ВЛИЯНИЕ ОСТАТОЧНЫХ ДОЗ ГЕРБИЦИДОВ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ

Гербициды широко используются в агротехнике ячменя [1-3]. Однако описаны факты цитогенетической нестабильности растений при воздействии на них химических веществ [4]. Критериями нарушений выступают аберрации, которые возникают в первом митозе кончиков корней проростков: в первую очередь – хромосомные и хроматидные мосты с фрагментами и без фрагментов, а также такие нарушения как пикноз, лизис, фрагментация хромосом, формирование кольцевых и дицентричных хромосом, С-ми-

тозы, эндополиплоидия, миксоплоидия и другие аномалии [5, 6]. Изучение спектра цитогенетических нарушений позволяет оценить мутационную изменчивость, которая возникает вследствие воздействия пестицидов и вызвать сортовые особенности реакции на такую обработку.

Материалы и методы

Материалом исследований служили сорта ячменя Селекционно-генетического института – Национального центра семеноведения и сортоизучения Галактик, Эней, Водограй, Сталкер, Гелиос.

Проводили цитогенетическое изучение воздействия гербицидов на проростки вышеуказанных сортов ячменя. Использовались препараты сплошного действия, предназначенные для допосевой или довсходовой обработки: Селефит (д.в. – прометрин, 500 г/л), Напалм (изопропиламинная соль глифосата, 480 г/л, в кислотном эквиваленте – 360 г/л, водного раствора) и Раундап (изопропиламинная соль глифосата, 480 г/л, 48%) в разведении 1:4 от рекомендованной рабочей концентрации. Указанные концентрации моделировали остаточные количества препарата при посеве и прорастании семян культуры. Оценивали влияние пестицидов на лабораторную схожесть семян, а также на регулярность митоза у проростков ячменя.

Лабораторную всхожесть оценивали, проращивая в растильнях по 200 семян в каждом варианте опыта. Влияние препарата на корневую меристему оценивали с помощью анафазного теста [7]. Статистическую обработку выполняли с помощью критерия Стьюдента [8].

Результаты и обсуждение

Обработка семян растворами гербицидов приводила к снижению всхожести всех исследуемых сортов ячменя (табл.1) прямо пропорционально увеличению концентрации препаратов с высокой степенью достоверности ($p \leq 0,001$).

Таблица 1

Лабораторная всхожесть (%) семян ячменя при воздействии гербицидов

Сорт	Контроль	Селефит	Напалм	Раундап
Галактик	91±2,8	24±4,2	20±0,9	26±1,5
Эней	77±4,2	34±4,7	20±0,9	26±1,8
Водограй	88±3,2	30±4,5	32±1,2	22±0,9
Сталкер	86±3,4	15±0,8	17±0,8	26±1,1
Гелиос	81±3,4	9±0,6	28±1,1	25±1,1

Действие препаратов Селефит и Напалм на всхожесть семян было сортоспецифично. При обработке Селефитом выявлены достоверные различия по всхожести семян между сортами Галактик, Сталкер и Гелиос ($p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$). При обработке Напалмом не было различий по всхожести только между сортами Галактик и Эней. При обработке Раундапом достоверно ($p \leq 0,05$) меньшая всхожесть была только у сорта Водограй. Наиболее чувствительным к действию трех гербицидов оказался сорт Сталкер. Средняя

всхожесть его семян под воздействием гербицидов составила $19,3 \pm 1,6\%$. Наименее чувствительными оказались сорта Водограй и Эней. Средняя всхожесть их семян при воздействии гербицидов составила $28,0 \pm 1,8\%$ и $26,7 \pm 1,8\%$, соответственно. Сорт Гелиос показал разнородную реакцию на гербициды. Если при обработке препаратами Напалм и Раундап его реакция была сходной с другими сортами (исключая Сталкер), то при обработке гербицидом Селефит всхожесть семян Гелиоса составила $9 \pm 0,6\%$. Это наименьшая всхожесть при обработке гербицидами.

Отличия сортов в изменчивости всхожести семян под воздействием гербицидов могут быть обусловлены разной проницаемостью покровов зерновки и проростка или функционированием ферментных систем, которые обеспечивают разрушение проникших ядов. Снижение всхожести, как правило, отвечает росту количества мутаций [4]. Но у разных видов одинаковая степень падения всхожести отвечает разному уровню накопления aberrаций. Так, например, если у пшеницы значительная гибель семян наблюдается при 60% клеток с aberrациями, то для ячменя почти полная потеря всхожести наступает уже при 5% aberrантных клеток [9], что, вероятно, связано с аллополиплоидной природой пшеницы, у которой за счет дупликации геномов повышается устойчивость к мутациям.

Учитывая отличия в реакции сортов на обработку разными препаратами, а также способность большинства пестицидов мигрировать в почве понятна необходимость отбора сортов, устойчивых к влиянию конкретных препаратов при посеве на полях с плохим фитосанитарным состоянием.

Изучение меристематических клеток корней проростков ячменя показало, что обработка препаратами отрицательно влияет на течение митоза (табл. 2).

В анафазе наблюдались многочисленные нарушения расхождения хромосом: отставания, неравное расхождение, одиночные, парные и множественные фрагменты, а также образование мостов (Рис. 1). Анафазы с отставаниями хромосом, анафазы с мостами составляли основную часть нарушений, что свидетельствует о нарушении функционирования веретена деления [9]. Фрагменты встречались значительно реже. Среди анафаз с мостами преобладали клетки с одиночными мостами. Это свидетельствует об осуществлении преимущественно хроматидных асимметрических обменов [6].

Анализ воздействия гербицидов на регулярность митоза показал, что Селефит имел более мягкое действие. Существенной разницы между действием препаратов Напалм и Раундап не было, но они имели более жесткое действие, чем Селефит. Среди изучаемых сортов ячменя меньше всего нарушений митоза по данным анафазного теста наблюдалось в корневой меристеме проростков сорта Гелиос, который в большинстве случаев имел достоверно ($P \leq 0,001$ и $P \leq 0,01$) большее количество нормальных анафаз. В зависимости от используемого препарата количество нормальных анафаз у сорта Гелиос составило от $46 \pm 4,5\%$ до $37 \pm 4,4\%$.

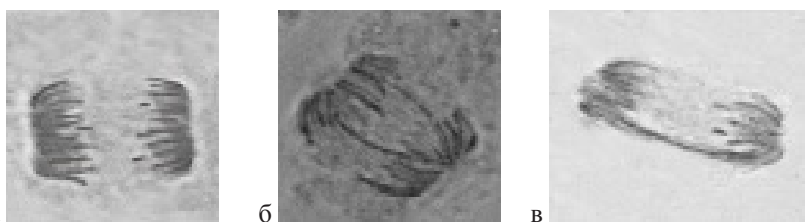


Рис. 1. Нарушения митоза в корневой меристеме проростков ячменя при действии гербицидов: а – анафаза с тремя фрагментами; б – анафаза с двумя мостами; в – анафаза с мостом и фрагментом. Об.× 40, ок. ×10.

Таблица 2

Частота (%) нормальных и аномальных анафаз митоза в корневой меристеме проростков ячменя под воздействием гербицидов

Сорт	Вариант опыта	Нормальные анафазы	Анафазы с отстаиваниями хромосом	Анафазы с мостами	Анафазы с фрагментами
Галактик	Контроль	91±2,8	5±2,4	2±0,5	0
	Селефит	33±4,7	28±4,6	28±4,1	9±4,2
	Напалм	34±2,1	27±4,1	26±5,1	13±4,6
	Раундап	24±4,2	32±2,6	26±6,2	16±4,3
Эней	Контроль	75±4,3	7±1,0	20±1,1	3±1,4
	Селефит	34±2,1	26±4,0	17±2,7	19±1,1
	Напалм	33±4,4	34±2,0	25±4,3	6±1,5
	Раундап	35±4,7	21±2,2	39±1,2	4±4,7
Водограй	Контроль	89±3,1	8±4,5	2±3,0	0
	Селефит	48±3,8	30±3,5	27±4,1	13±4,7
	Напалм	25±4,3	25±3,6	33±2,2	15±4,4
	Раундап	30±4,5	39±1,1	25±7,1	4±4,3
Сталкер	Контроль	87±3,2	4±4,7	25±7,6	16±4,3
	Селефит	38±4,4	37±1,5	7±1,8	20±1,4
	Напалм	32±4,6	21±1,4	17±3,1	13±3,9
	Раундап	35±4,3	31±2,8	27±5,4	25±4,4
Гелиос	Контроль	83±3,8	5±3,2	9±3,1	3±1,1
	Селефит	46±4,5	29±4,0	20±1,8	25±7,0
	Напалм	42±4,1	26±4,7	23±9,9	9±1,0
	Раундап	37±4,4	31±2,8	21±1,4	9±4,1

Следует отметить, что во многих случаях наблюдалась обратная зависимость между всхожестью семян и частотой нормальных анафаз при обработке гербицидами. Так, при обработке Селефитом всхожесть семян сорта Гелиос составила 9±0,6%, а частота нормальных анафаз – 46±4,5 %. В то

же время, у сорта Галактик при обработке Селефитом проросло $24 \pm 4,2$ % семян, а доля нормальных анафаз составила $33 \pm 4,7$ %. Вероятно, у сорта с меньшей всхожестью проросли лишь семена, менее поврежденные действием гербицидов. Поэтому у них и был более регулярный митоз. У сорта Галактик были наиболее низкие показатели регулярности митоза при обработке препаратами Селефит и Раундап. Наблюдалась и различная чувствительность одного сорта к разным препаратам. У сорта Водограй была наибольшая в эксперименте частота нормальных анафаз при обработке Селефитом, и наименьшая – при обработке Напалмом. Остальные исследованные сорта занимали промежуточное положение по чувствительности к воздействию гербицидов.

При учете и всхожести семян, и регулярности митоза в клетках корневой меристемы наиболее устойчивым к действию препарата Селефит следует признать сорт Водограй, а наиболее чувствительными – сорта Галактик и Сталкер. При обработке препаратом Напалм наиболее устойчивым оказался сорт Галактик, а наиболее чувствительным – сорт Сталкер. При обработке препаратом Раундап наиболее устойчивым был сорт Гелиос, а наиболее чувствительным – сорт Водограй. Таким образом, воздействие гербицидов на семена исследованных сортов ячменя хотя и оказалось сортоспецифичным, но с каждый препарат по-разному воздействовал на генотип исследованных сортов ячменя.

Выводы

1. Мутагенное действие исследуемых гербицидов проявлялось в:
 - снижении всхожести семян;
 - образовании мостов, фрагментов и отставании хромосом в анафазе митоза в клетках корневой меристемы;
2. Выявлены отличия между сортами ячменя по чувствительности к гербицидам.

Литература

1. Грицаєнко З.М., Карпенко В.П. Забур'яненість посівів ярого ячменю за комплексної дії бакових сумішей похідних арилоксиоцтової кислоти та сульфонілсечовини // Таврійський науковий вісник. – 2007. – Вип. 52. – С. 39-43.
2. Горщар В.І. Вплив прийомів агротехніки на врожайність та якість зерна пивоварного ячменю в умовах північної підзони степу України: автореф. дис. ... канд. с.-г. наук: спец. 06.01.09 – рослинництво. – Дніпропетровськ, 2008. – 22 с.
3. Бочкарев Д.В., Юркина Ю.Н. Эффективность применения гербицидов на ячмене при освоении залежных земель // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – №2 (14). – С. 8-13.
4. Попова И.С. К вопросу об использовании цитологических признаков при мониторинге окружающей среды // Вісник Українського товариства генетиків та селекціонерів. – 2009. – №2. – С. 242-248.
5. Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В. Классификация и методы учета хромосомных аберраций в соматических клетках // Генетика. – 1972. – Т. 8, № 5. – С. 133-141.

6. Grant W.F. Chromosome aberration in plants as a monitoring system. // Environ. Health Perspect. – 1978. – Vol. 27, № 7. – P. 37-43.

7. Гостимский С.А., Дьякова М.И. Ивановская Е.В. и др. Практикум по цитогенетике. – М.: Изд-во МГУ, 1974. – 172 с.

8. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 319 с.

9. Kihara H. Plant genetics in relation to plant breeding research // Seiken Ziho. -1975. – Vol. 26, № 25. – P. 25-40.

Резюме

Досліджували вплив сучасних гербіцидів на паростки різних сортів ячменю. Обробка гербіцидами знижувала схожість насіння та порушувала регулярність плину мітозу. Виявлені сортові відмінності досліджених сортів за чутливістю до препаратів. Спектр порушень мітозу свідчить про утворення хромосомних перебудов внаслідок обробки гербіцидами.

The influence of modern herbicides to seeds of different sorts of barley was studied. Herbicides treatment reduced the germination of seeds and raised the frequency of mitosis passing. Revealed varietal differences investigated varieties by sensitivity to drugs. The range of the violations of mitosis demonstrates the formation of chromosomal aberrations due to treatment herbicides.

КОРШИКОВ И.И., ТКАЧЕВА Ю.А.

Донецкий ботанический сад НАН Украины. Украина, 83059, Донецк-59, пр. Ильича, 110; e-mail: dbsgenetics@gmail.com

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА ДВУХ ВИДОВ ХВОЙНЫХ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕННОЙ СРЕДЫ

Для оценки воздействия различных загрязняющих окружающую среду веществ (аэрополлютантов, тяжелых металлов, пестицидов, сточных вод, синтетических удобрений и др.) на наследственный аппарат живых организмов широко применяются методы цитогенетического анализа [2, 6, 7]. Согласно приказу МОЗ Украины № 116 от 17.03.2007 утверждены методические рекомендации: «Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об'єктів довкілля з використанням цитогенетичних методів», согласно которым на территории Украины основным тест-объектом является *Allilum cepa* L. Для других видов-фитоиндикаторов рекомендовано использовать цитогенетические характеристики пыльцы [5]. В других странах, например, в России в мониторинговых цитогенетических исследованиях нередко используют различные виды древесных растений (*Quercus robur* L., *Betula pendula* Roth.) в том числе и хвойные (*Larix suscaszewii* Dvl., *Abies sibirica* Ledeb., *Picea obovata* Ledeb.) [1, 2, 3]. При этом часто изучают цитогенетические аномалии в клетках не самих растений, а у их семенного потомства. Такие исследования показали, что разные виды в условиях техногенно загрязненной среды промышленных

регионов различаются по уровню цитогенетических нарушений. По этой причине ведется поиск наиболее приемлемых индикаторных тест-объектов для оценки генотоксического воздействия загрязнителей среды. В степной зоне коренных видов древесных растений крайне мало, и локализованы они, как правило, в поймах рек. Поэтому поиск необходимых видов для цитогенетического мониторинга следует проводить среди интродуцентов, произрастающих в местах загрязнения. В этом плане интересны хвойные виды, часто представленные на урбанизированных и загрязненных территориях нашей страны.

Цель работы – сравнительный анализ цитогенетических нарушений у семенного потомства двух видов хвойных для оценки их чувствительности к техногенному загрязнению среды.

Материалы и методы

Объектом исследований были два вида хвойных – *Pinus pallasiana* D. Don и *Picea abies* (L.) Karst., их природные популяции (контроль) и насаждения в условиях техногенно загрязненной среды.

Для анализа были собраны семена растений *P. pallasiana* из трех насаждений, которые расположены возле крупных промышленных объектов, таких как: Мариупольский металлургический комбинат и Новоамвросиевский цементный завод, а также испытывают воздействие значительного количества автомобильных выхлопных газов в г. Донецк. Возраст растений в этих насаждениях составлял 30 – 40 лет. В исследованиях использовали семена 30 деревьев каждого насаждения. Контрольными были семена из природной популяции Горного Крыма (район пгт Никита), собранные с 40 деревьев возрастом от 80 до 100 лет. Семенной материал *P. abies* был собран в двух природных популяциях из Украинского Полесья и интродукционным насаждении в дендрарии Донецкого ботанического сада НАН Украины. Одна из популяций расположена в области с повышенным радиоактивным фоном, в результате аварии на Чернобыльской АЭС, другая – значительно удалена от промышленных объектов и рассматривалась как контрольная. В общей сложности для *P. pallasiana* изучено 30780 клеток (129 деревьев) и 30738 клеток (111 деревьев) для *P. abies*.

У семенного потомства изучали уровень и спектр патологий митоза, хромосомные aberrации. Анализы проводили на временных препаратах из меристематических тканей корешков проростков семян каждого дерева. Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 23 – 25°C. Корешки фиксировали в уксусном этаноле (1:3), а затем окрашивали ацетоорсеином. После окрашивания корешки промывали и готовили давленные препараты по стандартной методике. Анализ микропрепаратов осуществляли с помощью микроскопа *Carl Zeiss Primo star* (при увеличении 40 x 10).

Результаты и обсуждение

В корешках проростков семян *P. pallasiana* и *P. abies* общими типами патологий митоза были – отставание и опережение хромосом, а у *P. pallasiana* встречался еще и многополюсный митоз (табл. 1). Доля патологий митоза в клетках проростков из семян природных популяций обоих видов была крайне низкой, составив 0,07–0,09 %. Невысокий уровень патологий митоза обнаружен и в клетках проростков семян растений из техногенно загрязненных территорий, хотя у *P. pallasiana* и *P. abies* он был соответственно в 2,5 и 2,3 раза выше, чем у проростков растений природных популяций. Можно утверждать, что у семенного потомства растений *P. pallasiana*, произрастающих возле крупного цементного завода, а также на территории г. Мариуполя и г. Донецка, где высокий фоновый уровень загрязненности атмосферы выбросами металлургических производств и выхлопных газов автотранспорта, патологии митоза встречаются с низкой частотой.

Таблица 1

Цитогенетические нарушения в клетках корешков проростков семян *Pinus pallasiana* D.Доп и *Picea abies* (L.) Karst. природных популяций и насаждений в условиях загрязненной среды

Цитогенетические показатели	<i>Pinus pallasiana</i> D.Дон		<i>Picea abies</i> (L.) Karst.	
	природные популяции	древостои на загрязненных территориях	природные популяции	древостои на загрязненных территориях
Количество просмотренных делящихся клеток, шт.				
	10083	20697	8728	22010
Количество клеток с патологией митоза, шт.				
Отставание	2	2–14	3	2–5
Опережение	7	5–13	3	9–20
Многополюсный митоз	0	0–2	–	–
Доля патологий, % (M±m)	0,09±0,03	0,23±0,03	0,07±0,03	0,16±0,03
Количество клеток с хромосомными aberrациями, шт.				
Хроматидный мост	3	41–77	20	18–24
Хромосомный мост	0	3–9	1	1–4
Фрагмент	0	0–1	–	–
Кольцевая хромосома	1	0–1	0	0–3
Агглютинация	0	0–6	1	0–1
Доля aberrаций, % (M±m)	0,04±0,02	0,97±0,07	0,25±0,05	0,23±0,03
Доля всех нарушений, % (M±m)	0,13±0,03	1,26±0,07	0,32±0,06	0,40±0,04

То же самое относится и к *P. abies*, произрастающей в дендрарии Донецкого ботанического сада и на загрязненной радионуклидами территории в Украинском Полесье.

Хромосомные aberrации у потомства *P. pallasiana* природной популяции встречались в 2,2 раза реже, чем патологии митоза. Зато заметно чаще aberrации присутствовали в клетках корешков проростков семян растений из загрязненных и урбанизированных территорий. В данном случае превышение по сравнению с проростками семян условного контроля составляло 24,2 раза. Наличие хромосомных aberrаций в сравнении с патологиями митоза в делящихся клетках проростков *P. pallasiana* из семян растений загрязненных местообитаний превосходило в 4,2 раза. Этого нельзя сказать о *P. abies*, уровень хромосомных aberrаций у потомства которой из природной популяции и загрязненных территорий мало отличался. В спектре aberrаций у потомства обоих видов явно доминировали хроматидные мосты. Разница лишь в том, что у *P. abies* в контроле и опыте они присутствовали на одном уровне, а в опытном варианте *P. pallasiana* встречались в 13,7–25,7 раза чаще.

Уровень цитогенетических нарушений в природной популяции *P. abies* в Украинском Полесье в 2,5 раза выше, чем в популяции *P. pallasiana* в Горном Крыму. Однако у растений загрязненных территорий превышение уровня этих нарушений *P. abies* в сравнении с ее природной популяцией составляло 1,2 раза. В то же время у *P. pallasiana* за пределами ареала в насаждениях урбанизированных, техногенно загрязненных территорий уровень цитогенетических нарушений был в 9,7 раза выше, чем в природной популяции. Очевидно, что *P. pallasiana* как тест-объект для цитогенетического мониторинга загрязненности среды значительно более приемлема, чем *P. abies*. Другие исследователи также отмечали заметные различия в чувствительности наследственного аппарата разных видов древесных растений на воздействие техногенно загрязненной среды, что проявлялось и в уровне цитогенетических нарушений их семенного потомства [1, 3]. Например, наиболее высокий уровень таких же патологий, что описаны нами, отмечены и у проростков семян сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на промышленных территориях Южного Урала, который в 8,3–14,2 раза превышал подобные аномалии у контрольных растений. У трех других видов хвойных это превышение составляло 2,0–3,5 раза [3]. У *P. pallasiana* наблюдается тенденция к увеличению уровня и расширению спектра цитогенетических нарушений в насаждениях испытывающих воздействие техногенно-го загрязнения. У *P. abies* такая зависимость не проявляется.

Выводы. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что *P. pallasiana* является более адекватно реагирующей породой, по сравнению с *P. abies*, на загрязнение среды и вполне приемлема для использования в цитогенетических мониторинговых исследованиях в промышленных районах и городах Украины. Уровень и спектр цитогенетических нарушений в клетках семенного потомства *P. pallasiana* достаточно информативен и может быть применен в общей оценке генотоксического состояния исследуемых территорий.

Литература

1. Буторина А.К., Калаев В.Н., Вострикова Т.В., Мягкова О.Е. Цитогенетическая характеристика семенного потомства некоторых видов древесных растений в условиях антропогенного загрязнения г. Воронежа // Цитология. – 2000. – Т. 42, № 2. – С. 196–200.
2. Гераськин С.А., Васильев Д.В., Дикарев В.Г. и др. Оценка методами биоиндикации техногенного воздействия на популяции *Pinus sylvestris* L. в районе предприятия по хранению радиоактивных отходов // Экология. – 2005. – №4. – С. 275–285.
3. Калаишник Н.А. Хромосомные нарушения как индикатор оценки степени техногенного воздействия на хвойные насаждения // Экология. – 2008. – № 4. – С. 276–286.
4. Муратова Е.Н., Корнилова М.Г., Пименов А.В. и др. Цитогенетические эффекты влияния горно-химического комбината на клетки элодеи канадской (*Elo-dea canadensis* Michx) // Вестник КрасГАУ. – 2006. – Вып. 14. – С. 159–163.
5. Наказ МОЗ України №116 від 17.03.2007 про затвердження методичних рекомендацій: “Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об’єктів довкілля з використанням цитогенетичних методів”.
6. Müller M., Köhler B., Grill D., Guttenberger H., Lütz C. The effects of various soils, different provenances and air pollution on root tip chromosomes in Norway spruce // Trees – Structure and Function. – 1994. – vol. 9, № 2. – P. 73–79.
7. Pavlica M., Besendorfer V., Rosa J., Papes D. The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur* L.) and shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) // Chemosphere. – 2000. – vol. 41, № 10. – P. 1519–1527.

Резюме

Проведен сравнительный анализ спектра и уровня патологий митоза и хромосомных аберраций в клетках корешков семян *Pinus pallasiana* D. Don и *Picea abies* (L.) Karst. из природных популяций и насаждений урбанизированных и техногенно загрязненных территорий. Установлено, что уровень цитогенетических нарушений у *P. pallasiana* в несколько раз выше, чем у *P. abies* в условиях техногенных экотопов.

Проведено порівняльний аналіз спектру та рівня патологій мітозу і хромосомних аберрацій у клітинах корінців насіння *Pinus pallasiana* D. Don та *Picea abies* (L.) Karst. з природних популяцій і насаджень урбанізованих та техногенно забруднених територій. Встановлено, що рівень цитогенетичних порушень у *P. pallasiana* в декілька разів вище, ніж у *P. abies* в умовах техногенних екотопів.

Comparative analysis of the spectrum and the level of cytogenetic disorders were carried out in cells of rootlets of seeds of *Pinus pallasiana* D. Don and *Picea abies* (L.) Karst. from natural populations and plantations in the urbanized and technogenic contaminated areas. The level of aberrations in *P. pallasiana* is several times higher than that of *P. abies* in the conditions of technogenic ecotopes.

КРАВЕЦ Е.А

ГУ «Институт пищевой биотехнологии и геномики» НАНУ,
04123, Киев, ул. Осиповского, 2а., e-mail: elkrav@online.ua

ЦИТОМИКСИС КАК ФОРМА КЛЕТОЧНОГО (ПРЕДМЕЙОТИЧЕСКОГО) ОТБОРА У РАСТЕНИЙ С НАРУШЕННЫМ ГОМЕОСТАЗОМ

Цитомиксис представляет собой распространенное, хотя и неординарное цитологическое явление, происхождение, значение и генетический контроль которого до сих остаются не вполне ясными. В последние годы накопилось большое число данных, свидетельствующих о том, что цитомиксис является естественным процессом межклеточного взаимодействия, свойственным генеративным, а также вегетативным тканям, как в норме, так и при патологии, в ходе которого по цитомиксическим каналам перемещаются хроматин, органеллы, трофические факторы и сигнальные молекулы [3, 7-11]. Тем не менее, точка зрения о патологической природе цитомиксиса, основанная на его свойственности растениям с выраженной генетической нестабильностью и нарушенным гомеостазом, продолжает превалировать [4-6, 12- 15]. Однако, различные картины цитопатологии, которые сопровождают цитомиксис у этих растений, можно рассматривать и с точки зрения одного из механизмов восстановления – индукцию гибели генетически несбалансированных или нерепарируемых микроспороцитов [1,2]. Одним из направлений в таком подходе к проблеме цитомиксиса является использование мутагенных факторов, в частности, радиации. Целью данного исследования было изучение дозовых зависимостей влияния УФ-В и гамма-облучения на мужскую репродукцию, корреляции между цитомиксисом и фертильностью пыльцы и, как следствие, оценка роли цитомиксиса в репродуктивном потенциале растений.

Материал и методы

Объект исследования – ячмень двухрядный (*Hordeum distichum* L., 2n=14), сорт Скарлет французской селекции. Воздушно сухие зерновки облучали на гамма- установке в дозах 20 и 40 Гр (при мощности 3,3 сГр*мин⁻¹), трехсуточные проростки – УФ-В с помощью ультрафиолетовой лампы *Philips TL 20 W* (со светофильтром) в дозах 0,5; 2,2 и 4,3 кДж/м² при интенсивности 0,5 Вт/м²*сек⁻¹. Через сутки после облучения проростки высаживали в грунт. Фиксацию колосьев проводили от стадии дифференциации спорогенной ткани до созревания пыльцы. Для фиксации использовали смесь Навашина, для окраски временных препаратов- ацетокармин. Степень деструктивного цитомиксиса определяли по числу охваченных цитомиксисом микроспороцитов в поле зрения. Объем выборок при анализе мейоза и тетрад микроспор составлял около 20 пыльников на стадию. Для каждого варианта было исследовано в среднем 50-70 пыльников с микроспорами и по 20 пыльников для анализа развития пыльцевых зерен.

Статистическую обработку данных проводили с использованием функций программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Микроспорогенез. Основным типом патологии в микроспорогенезе при воздействии облучения является цитомиксис. Интенсивный цитомиксис охватывал около 20% микроспороцитов при УФ облучении и до 23 % при гамма воздействии (рис. 1 а – г). Наибольшая цитомиксическая активность наблюдалась в ходе первого мейотического деления; во втором делении активность цитомиксиса снижалась, примерно, вдвое. При этом, в метафазе 1 деления «транзиторный» хроматин перетекал по одиночным, реже двойным мостам, в виде тяжей, отдельных хромосом или микроядер от клетки к клетке. «Транзиторный» хроматин, по-видимому, не включается в состав ядра клеток, через которые мигрирует, хотя может влиять на спорогенез.

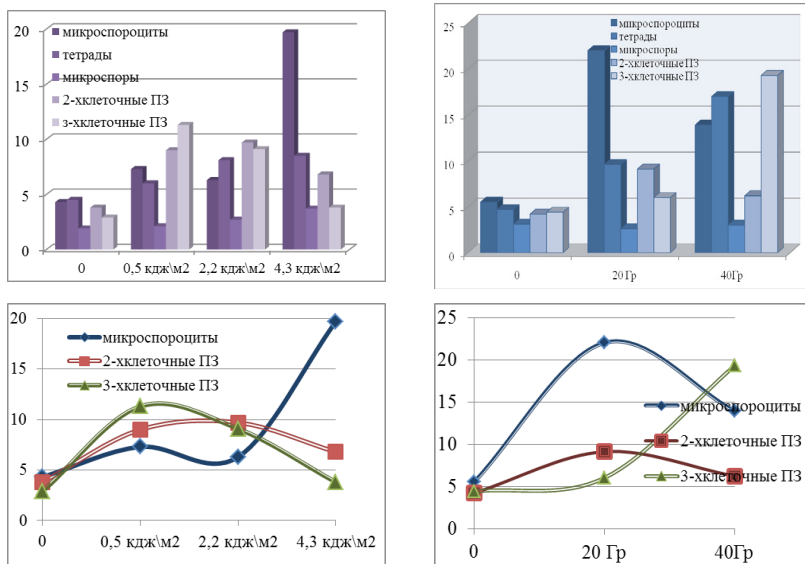


Рис. 1. Дозовые зависимости индукции цитопатологий на разных фазах развития пыльника: а, в – дозовые зависимости уровня нарушений при УФ-В облучении; б, г – дозовые зависимости уровня нарушений при гамма-облучении.

Основная масса сверхкомплексного хроматина в большинстве случаев элиминировалась в межклеточном пространстве или в составе синцитиев. Большинство микроспороцитов во всех вариантах опыта заканчивала мейоз с образованием правильных, реже, генетически несбалансированных тетрад, триад или диад.

Дозовые зависимости индукции цитомиксиса характеризовались нелинейностью (рис. 1 а – г). Цитомиксис заметно усиливался при максимальной дозе УФ-В – 4,3 кДж/м²; а при 20 Гр его активность была выше, чем при 40 Гр. Между активностью цитомиксиса и частотой патологий в тетрадах микроспор наблюдалась положительная корреляция (0.4 – 0.7). Следовательно, цитомиксис может быть причиной образования несбалансированных тетрад, однако, оба эти типа нарушений могут быть и следствием другой причины – мутагенеза, индуцированного облучением.

Развитие пыльцевого зерна (ПЗ). Большинство нарушений микрогаметогенеза после облучения характеризовались неспецифичностью: возрастали полиморфизм ПЗ, частота изменения полярности микроспоры и ПЗ, «рассинхронизация» развития, увеличивался процент «малоплазменных» ПЗ. Изменение полярности микроспоры привело к образованию пары симметричных ядер или клеток. Как отмечалось нами в более ранних работах [1], гамма-облучение может индуцировать также специфические нарушения гаметогенеза, связанные с поздней инактивацией спермиев в пыльцевом зерне. В этом случае пыльцевые зерна нормальной морфологии содержат дегенерирующие спермии, что, возможно является следствием генетической несбалансированности. Причины появления “малоплазменных” пыльцевых зерен связаны с нарушением синтеза цитоплазмы в микроспоре или вегетативной клетке. Спермии в таких ПЗ останавливаются в развитии, не заканчивая цикла своей дифференцировки.

Дозовые зависимости индукции нарушений в ходе развития пыльцевого зерна характеризовались нелинейностью (рис. 1 в, г). Зависимость уровня стерильности зрелых ПЗ от дозы УФ носила отрицательный, а от гамма-облучения – положительный характер. С возрастанием дозы **ультрафиолета** число аномальных ПЗ сначала возрастало, а затем снижалось (рис. 1 а, в). При максимальной экспозиции ультрафиолета уровень стерильности пыльцы приближался к контролю. Отмечена положительная корреляция между цитомиксисом и числом патологий на стадии тетрад (0.7) и микроспор (0.9). Между интенсивностью цитомиксиса и стерильностью ПЗ наблюдалась отрицательная корреляция (-0.32). При **гамма-воздействии** дозовые зависимости носили иной характер (рис. 1 б, г). Положительная корреляция между цитомиксисом и патологиями в тетрадах (0.4) сменялась на отрицательную между цитомиксисом и уровнем стерильности микроспор (-0.9). Значительная разница в показателях стерильности двухклеточных и трехклеточных ПЗ вероятно связана с поздней инактивацией спермиев в пыльцевом зерне. Между интенсивностью цитомиксиса и стерильностью двухклеточных ПЗ наблюдалась высокая положительная корреляция (0.99), а с трехклеточными ПЗ – слабopоложительная (0.09).

Примечательно, что повреждения, индуцированные малыми дозами ультрафиолета, не устранялись ни репарацией, ни клеточным отбором, и сохранялись во многих клеточных поколениях. Они оставались недоступ-

ными действии даже гаплонтного (гаметического) отбора, определяя относительно высокий (9-11%) процент стерильности пыльцевых зерен. С повышением экспозиции УФ-В очевидно «включались» восстановительные механизмы – репарация ДНК и клеточный отбор. Перегибы дозовых кривых и формирование дозонегативных участков дают основание говорить о пороговом эффекте в реакции на ультрафиолет, обусловленном, вероятно, числом повреждений ДНК и других макромолекул, запускающих репарационные процессы и клеточный отбор. В отношении гамма-облучения пороговый уровень повреждения (по активизации цитомиксиса), вероятно, формировался в пределах 20 Гр. Отрицательная корреляция между цитомиксисом и стерильностью пыльцевых зерен при УФ облучении и между цитомиксисом и стерильностью микроспор при гамма- воздействии может указывать на функцию цитомиксиса как клеточного отбора, который активизируется при превышении порогового уровня повреждения микроспороцитов в условиях индуцированного (или спонтанного) мутагенеза. Следовательно, благодаря цитомиксису, в ходе мейоза популяция микроспороцитов может избавляться от избыточного мутационного груза. Кроме того, через цитомиксис может регулироваться численность функционирующих микроспороцитов и устраняться их избыточность. Активность цитомиксиса, как это ни парадоксально, может регулировать не только продуктивность, но и жизнеспособность пыльцы.

Выводы. Ультрафиолетовое и гамма-облучение проростков ячменя индуцировало активизацию цитомиксиса и рост числа неспецифических и специфических патологий в ходе микроспорогенеза и развития пыльцевого зерна. Отмечена негативная корреляция между цитомиксисом и стерильностью микроспор (при гамма-облучении), а также между цитомиксисом и стерильностью зрелых пыльцевых зерен (при УФ-В-облучении). В связи с этим, цитомиксис рассматривается как форма клеточного (предмейотического) отбора, которая активизируется при превышении порогового уровня повреждения ДНК (или генетического дисбаланса) микроспороцитов. Предполагается, что в условиях индуцированного мутагенеза цитомиксис регулирует состояние и численность микроспороцитов, ограничивает мутагенез и способствует, тем самым, сохранению фертильности пыльцевых зерен.

Литература

1. Гродзинский Д.М., Кравец Е.А., Хведынич О.А., Коломиец О.Д., Банникова В.П. Формирование репродуктивной системы растений, подвергшихся воздействию хронического облучения // Цитология и генетика. – 1996. – Т. 30, N3. – С.36-45.
2. Кравец Е.А. Клеточные и тканевые механизмы восстановительных процессов в вегетативных и генеративных меристемах при воздействии облучения // Цитология и генетика. – 2009. – 43, N 1. – С. 11-22.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ: Логос. – 2005. – 723 с.

4. Орлова И.Н. Цитомиксис – В кн. Эмбриология цветковых растений. Т.1.-СПб. – 1994. – С.115-117.
5. Поддубная-Арнольди В.А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. – М.: Наука. – 1976. – 507 с.
6. Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Особенности цитомиксиса в материнских клетках пыльцы у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) с мутантным фенотипом // Цитология. – 2007. – Т. 49. № 10. – С. 870-875.
7. Bahl J. R. and Tyagi B. R. Cytomixis in pollen mother cells of *Papaver dubium* L. // Cytologia. – 1988. – V.53. – P.771-775.
8. Bedi Y.S. Cytomixis in woody species // Proc. Indian Acad. Sci. (Plant Sci.).- 1990. V.100. – P.233-238.
9. Bellucci M., Roscini C., Mariani A. Cytomixis in the Pollen Mother Cells of *Medicago sativa* L. // J. Heredity. – 2003. -V. 94. N6. – P.512-516.
10. Heslop-Harrison J. Cytoplasmic connections between angiosperms meiocytes // Ann.Bot. – 1966. – 30. – P.221-230.
11. Liu H., Guo G-Q., He Y-K., Lu Y-P., Zheng G-C. Visualization on intercellular movement of chromatin in intact living anthers of transgenic tobacco expressing histone 2B-CFP Fusion Protein // Caryologia. – 2007. – V. 60. N1-2. – P. 1-20.
12. Mantu D.E., Sharma A.K. Cytomixis in pollen cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (L.) Alston. // Cytologia. – 1982. – V. 48. – P.201-207.
13. Singhal V.K., Gill B. Cytomixis in some woody species // Biologica. – 1985. -V.1. – P. 168-175.
14. Lattoo S.K., Khan S. Bamotra S., Dhar A.K. Cytomixis impairs meiosis and influences reproductive success in *Chlorophytum comosum* (Thunb) Jacq.- an additional strategy and possible implications // J. Biosci. – 2006. – V.31. N5. – P.629-637.
15. Singhal V.K., Kumar P. Impact of cytomixis on meiosis, pollen viability and pollen size in wild populations of Himalayan poppy (*Meconopsis aculeate* Royle) // J. Biosci. – 2008. – 33. – P. 371-380.

Резюме

Ультрафіолетове і гамма-облучення проростків ячменя індукувало активізацію цитоміксиса і зростання числа патологій в чоловічій репродуктивній сфері рослин. Предполагается, что цитомиксис представляет собой форму клеточного отбора, которая активизируется при превышении порогового уровня повреждения ДНК (или генетического дисбаланса) микроспороцитов.

Ультрафіолетове та гамма-опромінення проростків ячменю індукувало активізацію цитоміксису і зростання кількості патологій у чоловічій репродуктивній сфері рослин. Припускається, що цитоміксис є формою клітинного добору, яка активізується при перевищенні порогового рівня ушкодження ДНК (або генетичного дисбалансу) микроспороцитів.

UV-B irradiation and gamma- irradiation of barley germs induced an increase in cytomixis and number of pathologies in the man reproductive sphere. It is presumed that cytomixis present a form of cell selection which was induced by an excess of microsporo-cyte disturbances (or genetical disbalance).

¹МАРТИНЕНКО О.І.,¹КИРИЛЕНКО Т.К.,¹СТЕПАНЮГІН А.В.,
¹ЮРКЕВИЧ Л.Н.,²АДАМЧУК-ЧАЛА Н.І.,³ПЛОДНІК Д.П.,
¹ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А.І.

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, Київ, вул.Заболотного, 150, e-mail: Martynenko.Olena@gmail.com;

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України;

³Національний університет харчових технологій

ДЕТЕРМІНАЦІЙНІ ЗМІНИ ПЕРЕБІГУ ПРОЦЕСУ НУКЛЕЇНОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ У КЛІТИНАХ ЛИСТКІВ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ ІЗАТІЗОНУ

Розкриття механізмів відповіді рослинного організму на впливи зовнішніх стимулів – одне з найактуальніших фундаментальних і екологічно важливих завдань сучасної фітобіології. Нагальність вирішення цієї непростой проблеми тісно пов'язано із необхідністю розробки нових технологій вирощування рослин із застосуванням екзофакторів різного походження – фізичних, біологічних, хімічних. Серед хімічних агропрепаратів, що почали застосовувати у рослинництві, препарат Ізатизон (Із) (метисазон + диметилсульфоксид + поліетиленгліколь-400), відомий своєю ефективною протівірусною, протипухлинною і антибактерійною дією [1]. Проте вплив цього чинника на розвиток рослинних організмів вивчено недостатньо. Зважаючи на те, що відповідь рослин на дію зовнішнього чинника формується на різних рівнях їхньої організації, доцільно провести комплексне вивчення біологічних ефектів Із. Відсутність інформації щодо впливу Із на функціонування рослинного геному зумовило мету нашої роботи – дослідити дію препарату Із на перебіг одного з фундаментальних клітинних процесів – метаболізму нуклеїнових кислот (МНК) та встановити його зв'язок з клітинними і морфологічними змінами, асоційованими із розвитком.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на проростках пшениці сорту «Асоціативна», вирощених у лабораторних умовах на твердому субстраті (пісок). Насіння перед посадкою попередньо зволожували і одноразово обробляли протягом 1 години концентрованим препаратом Із. Для оцінки швидкості росту проростків пшениці визначали щодобовий приріст надземної частини рослин, починаючи з 3-ї – 4-ї доби експерименту. Загальний кількісний вміст нуклеїнових кислот (НК) у листках пшениці визначали за модифікованим методом послідовного хімічного гідролізу рослинного зразка з подальшим спектрофотометричним аналізом лужних і кислотних фракцій отриманих гідролізатів [2]. Оцінку вмісту НК у листках проростків здійснювали щоденно, починаючи з 4 доби розвитку рослин протягом 15 діб. Кількісну оцінку рівнів нуклеїнового метаболізму в клітинах листків досліджуваних проростків проводили із застосуванням величини співвідношення РНК / ДНК [3]. Дослідження ультраструктури ядер меристемних клітин апексу пагону пше-

ниці «Асоціативна» в окремі періоди росту (6 доба) здійснювали за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії згідно [4].

Результати та обговорення

Аналіз чутливості рослин до дії Із на фенотипічному рівні проводили за показниками проростання посівного матеріалу та морфометричних характеристик проростків. Показано, що Із здатний синхронізувати процес проростання зернят та проявляти тенденцію до його стимулювання (на 37% за даними на 3-ю добу росту рослин). Крім того, за дії Із спостерігалися зміни інтенсивності росту надземної частини проростків пшениці. Так, на 6-ту добу експерименту швидкість росту дослідних рослин порівняно з контролем знижувалася на 23%, тоді як на 17 – 18 добу відбувалося підвищення цього показника на 10%.

Відомо, що ключову роль у клітинних відновлювальних процесах, активованих у відповідь на дію будь-якого екзофактора відіграють РНК і ДНК. Відсутність інформації щодо впливу Із на характер накопичення нуклеїнових кислот (НК) у рослинному організмі зумовило необхідність вивчення зміни показників нуклеїнового гомеостазу у проростках пшениці після їхньої обробки препаратом. Отримані результати (рис.1) свідчать про існування істотних відмінностей між характером онтогенетичних варіацій у рівнях накопичення НК у листках контрольних і дослідних рослин. Так, у процесі росту контрольних варіантів відмічалася загальна тенденція до тривалого постійного зниження вмісту РНК та зростання кількості ДНК, що, ймовірно, пов'язано із збільшенням проліферуючих клітин у листках таких проростків. У динаміці розвитку дослідних зразків пшениці прослідковувалося гальмування спадання рівнів вмісту РНК (особливо на 9-12 та 16-19 добу), що свідчить про більш стабільний рівень метаболічних процесів в таких клітинах (фаза диференціації до зрілих форм). Прискорення накопичення РНК і ДНК, яке відбувається під впливом Із, може забезпечувати стимуляцію як диференціації, так і проліферації клітин листків [5]. Загалом отримані результати є свідченням того, як зміни вмісту НК інтегруються у фізіологічні відповіді клітин пшениці на дію Із.

Для формування інтегрального уявлення про реакцію геному пшениці на дію Із дослідили особливості перебігу (МНК) як одного з фундаментальних клітинних процесів, асоційованого з функціонуванням геному. З цією метою за допомогою РНК/ДНК – аналізу проведено 15-ти добовий біомоніторинг динаміки змін рівнів активності процесу МНК у клітинах листків контрольних і дослідних проростків. Нині величина співвідношення РНК/ДНК вважається не тільки інтегральним показником метаболічної активності клітини, швидкості біосинтезу РНК, новим типом біологічних констант, але й індикатором функціонально активної частини геному [6]. Аналіз кривих (рис.2), які описують характер диференційної активності МНК в клітинах листків контрольних і дослідних проростків, виявив здатність Із індукувати зниження рівнів активності цього процесу у середньому на 8%

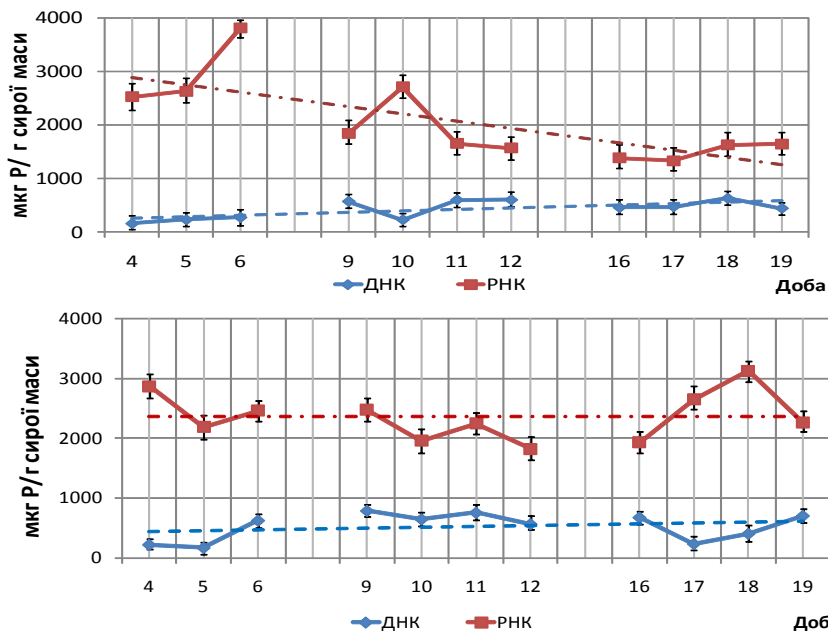


Рис. 1. Вміст РНК і ДНК у листках проростків пшениці сорту «Асоціативна»: А-контрольні зразки, Б – оброблені Ізатізоном

– 10% у залежності від доби росту рослин і змінювати його ритміку на протилежну порівняно з контролем майже на всіх досліджуваних проміжках часу. Ці дані вказують на існування у клітинах рослин Із-чутливих регуляторних механізмів, спрямованих, ймовірно, на активацію адаптаційно-компенсаторних систем. Підсилює ці припущення встановлений нами екотічний характер активності процесу МНК, який опосередковано може відображати активацію певних наборів генів. Адже показано, що екотічна експресія компонентів, залучених у формування відповіді рослин на абіотичні стреси, призводить до підвищення стрес- толерантності рослинних організмів [7].

Додатковим підтвердженням вищенаведених даних слід вважати і результати електронно-мікроскопічного дослідження стану меристемних клітин пагону пшениці контрольних і дослідних рослин з різним рівнем МНК, визначеного за величиною РНК/ДНК-індексу. Так, в клітинах 6-ти добових пагонів на ультраструктурному рівні виявлено істотні відмінності між контрольними (РНК/ДНК- індекс 14,0) та дослідними (РНК/ДНК-індекс 4,0) варіантами. Контрольні клітини характеризувалися більшим діаметром ядра, величина якого досягала 11,3 мкм, і ядерць – 4,7 мкм, тоді як у до-

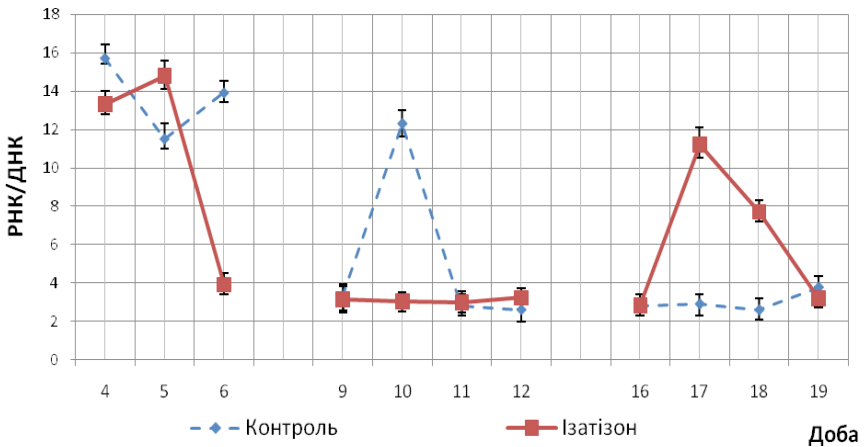


Рис. 2. Особливості перебігу процесу метаболізму нуклеїнових кислот в клітинах листків проростків пшениці під впливом Ізатизону

* Різниця значень між контролем та дослідом вірогідна, $P < 0,05$

сліді ці параметри становили 7,1 мкм і 2,5 мкм відповідно. Різнилися клітини і за значеннями щільності рибосом на 1 мкм³ цитоплазми: якщо в контролі ця величина складала $3445,21 \pm 128,15$, то в досліді – $1879,08 \pm 79,85$. Спостерігалися морфологічні зміни в ядерному компартменті 6-ти денних дослідних меристемних клітин, які відображалися у переході ядерець з компактного, вельми активного типу, до вакуолізованого типу згідно [4] з помірним рівнем функціональної активності.

Висновки

Отже, результати комплексного дослідження біологічних ефектів Із, отриманих на фенотипічному, клітинному і біохімічному рівнях організації рослин, цілком узгоджуються між собою і дозволяють дійти висновку про те, що Із – фізіологічно активний препарат і може ектопічно змінювати перебіг процесу МНК, що, ймовірно, є наслідком активації адаптаційно-компенсаторних процесів в клітинах листків пшениці. Запропоновано величину співвідношення РНК/ДНК використовувати для кількісної оцінки ступеню впливу хімічного чинника на функціональну активність рослинного геному.

Література

1. Заїка Л.А., Болсунова О.І., Потопальський А.І. Противірусні, протипухлинні та імуномодельючі властивості препарату Ізатизон: Монографія. – К.: Колоб'іг, 2010. – 212 с.
2. Мартиненко Е.И., Кириленко Т.К., Алхімова Е.Г. Метод выделения ДНК из растений // Доп. НАН України. – 2004. – №7. – С. 171 – 175.

3. Reef R., Ball M.C., Feller I.C., Lovelock C.E. Relationships among RNA:DNA ratio and elemental stoichiometry in mangrove trees // *Functional Ecology*. – 2010. – Vol. 24. – P. 1064 – 1072.

4. Адамчук-Чала Н.І., Соболь М.А. Структурно-функціональні зміни меристематичних клітин проростків гороху під дією кліностагування // *Наук.Вісник Ужгород. Ун-ту. Сер. Біол.* 2008.- Вип.22. – С. 155 – 160.

5. Максимович Р.М. Аналіз росту і розвитку নেত্রি (Xantium). / За ред. проф. О. Демківа. – Львів: Наукове товариство ім. Шевченка, 2003. – 203 с.

6. Переверзев Б.Л. Подход к экспериментальному изучению функции генома клетки // *Рос. хим. журнал*. – 2001. – №1. – С. 88 – 91.

7. Umezawa T., Fujita M., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 17. – P. 113 – 122.

Резюме

Проведено комплексне дослідження біологічних ефектів ізатизону (Із) на проростках пшениці. РНК/ДНК – аналізом виявлено Із-залежні ектопічні зміни характеру диференційної активності процесу нуклеїнового метаболізму в рослинних клітинах. Запропоновано величину співвідношення РНК/ДНК використовувати для оцінки ступеня дії хімічного чинника на функціональну активність геному.

Проведено комплексное исследование биологических эффектов изатизона (Из) на проростках пшеницы. РНК/ДНК-анализом выявлено Из-зависимые эктопические изменения характера дифференциальной активности нуклеинового метаболизма в растительных клетках. Предложено величину соотношения РНК/ДНК использовать для оценки степени действия химического фактора на функциональную активность генома.

We conducted a comprehensive study of biological effects of izatison (Iz) on the wheat sprouts. Using RNA/DNA analysis we found Iz-dependent ectopic changes in the nature of differential activity of nucleic metabolism process in the plant cells. We suggest an amount of the RNA/DNA ratio that can be used for qualitative and quantitative evaluation of a chemical factor effect on a functional activity of a genome.

МАШКИНА О.С.^{1,2}, КАРПЕЧЕНКО Н.А.²

¹*Воронежский государственный университет,
Россия, 394006, Воронеж, Университетская площадь, д.1,
e-mail: olga_mashkina@yahoo.com*

²*ФГУП НИИ лесной генетики и селекции
Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru*

РАЗМНОЖЕННЫЙ *IN VITRO* КЛОН МИКСОПЛОИДНОГО ТОПОЛЯ СЕРЕЮЩЕГО (*POPULUS CANESCENS* SM.) КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ ПРОИЗРАСТАНИЯ

Тополь – одна из быстрорастущих и хозяйственно-ценных древесных пород, а также удобный модельный объект для генетико-селекционных ис-

следований. Это одна из наиболее продвинутых в селекционном отношении пород. Для него получены не только хозяйственно – ценные гибриды, но и сорта [1,2]. Тополь – первое древесное растение, у которого в 2006 году был полностью расшифрован геном (третий растительный объект после арабидопсиса и риса).

Тополь сереющий (*Populus canescens* Sm), являющийся спонтанным гибридом между топодем белым и осиной, по продуктивности древостоев, качеству древесины и другим показателям значительно превосходит тополя других видов, произрастающих в лесах Воронежской области. Однако, внедрение его ценных форм и сортов в практику лесного хозяйства сдерживается плохой укореняемостью черенков обычным методом. Особый практический интерес представляют триплоидные тополя ($2n=3x=57$), нередко проявляющие соматический гетерозис. Практическая ценность миксоплоидов (характеризующихся наличием в тканях клеток с различным числом хромосом) заключается в довольно частом сочетании у них высокой продуктивности с адаптивностью к разным экологическим условиям (в том числе экстремальным). Это важно, в частности, для создания полезащитных полос и использования в озеленительных посадках в промышленных городах, особенно испытывающих антропогенную нагрузку.

Оптимальными условиями для произрастания тополя являются пойменные почвы с близким залеганием грунтовых вод. Хорошо растет на чернозёме. Наименее пригодна сухая песчаная почва, поэтому данный фон выращивания можно рассматривать как неблагоприятный. Выращивание одного и того же клона (представляющего собой совокупность генетически сходных растений) в контрастных эдафических условиях произрастания, позволит оценить его норму реакции (пластичность), как одного из необходимых этапов сортоиспытания и районирования; будет способствовать пониманию цитогенетических механизмов адаптации растений.

Целью настоящих исследований явилась оценка цитогенетической стабильности и ДНК-генотипирование размноженного *in vitro* клона триплоидного тополя сереющего (имеющего миксоплоидную природу) в контрастных эдафических условиях произрастания.

Материалы и методы

Объектом исследования послужил размноженный *in vitro* [3] клон аллотриплоидного ($2n=3x=57$) тополя сереющего (сорт “Хоперский 1”), отобранного А.И. Сиволаповым в Хоперском заповеднике [2]. По данным автора материнское дерево является миксоплоидом с преобладанием в соматической ткани триплоидных клеток с 57 хромосомами (74%). Остальные 26% приходится на долю диплоидных клеток с 38 хромосомами (11,4%), анеуплоидных (11,7%) и тетраплоидных – 2,9%. Размноженный *in vitro* клон сохранил миксоплоидную природу исходного дерева с преобладанием (60-70%) триплоидных ($2n=3x=57$) клеток в соматической ткани. Растения (рамы) микроразмноженного клона были высажены в контрастных эда-

фических условиях – на черноземе (Семилукский питомник НИИЛГиС) и песке (село Ступино, Рамонский р-н, Воронежская обл.).

Цитогенетическую стабильность клона оценивали у 12-летних растений по: а) частоте и спектру (типам) патологий митоза (ПМ) в клетках листовой меристемы; частота ПМ вычислялась как отношение числа клеток с нарушениями в мета-, ана-, телофазе митоза к общему числу просмотренных делящихся клеток (на тех же стадиях), в %; спектр ПМ представлен как процентное отношение каждого вида патологий к общему числу патологических митозов; б) уровню миксоплоидии (проценту клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модалного триплоидного ($2n=3x=57$)); в) ядрышковой активности (доли интерфазных клеток с тем или иным количеством ядрышек, в %).

Для ДНК-генотипирования использовали молодые листья распускающихся почек. ДНК выделяли по стандартным методикам для растительных тканей с применением СТАВ-буфера, которую затем использовали для проведения ПЦР с девятью RAPD-праймерами. Из них наиболее информативными оказались пять праймеров, проявляющих достаточно высокую степень полиморфизма. Число амплифицированных фрагментов ДНК варьировало в зависимости от праймера от 4 (праймер Oligo 12, Oligo 19) до 6 (праймер Oligo 1, Oligo 4, Oligo 6), а их размеры – от 129 до 7236 п.н.

Результаты и обсуждение

Сравнение спектров продуктов амплификации ДНК показало, что все проанализированные образцы (независимо от места их произрастания) оказались идентичными между собой (рис.1), что подтверждает их принадлежность к одному и тому же клону.

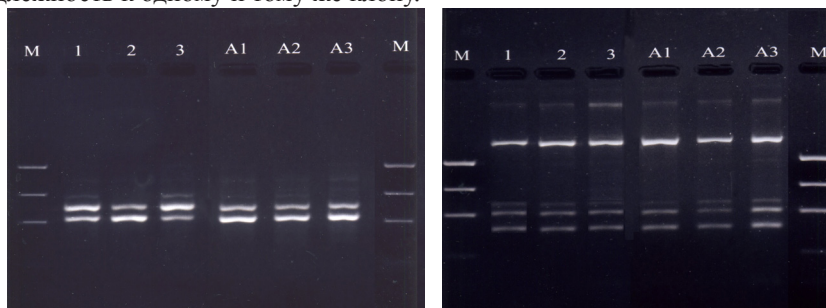


Рис. 1. Спектры продуктов амплификации ДНК образцов клона миксоплоидного тополя сереющего с использованием RAPD-праймера Oligo 12 (слева) и Oligo 19 (справа). М – маркеры длины фрагментов 1000-100 п.н., 1-3 и А1-А3 – номера растений, произрастающих на сухом песке (1-3) и черноземе (А1-А3).

Установлено, что в неблагоприятных условиях произрастания (сухой песок) миксоплоидный клон характеризуется более высокой (по сравнению с растениями, произрастающими на черноземе) внутриклоновой неод-

нородностью по высоте и изученным цитогенетическим показателям, что проявляется в следующем (таблица).

1. Существенно повышается (в 1,6 раз) уровень миксоплоидии. Это происходит в основном за счет значительного (почти в 8-10 раз) увеличения содержания анеуплоидных клеток (до 25-41% у отдельных рамет против 3-4% на черноземе) с гипердиплоидным и гипотриплоидным набором хромосом. Напротив, у рамет клона, произрастающих в оптимальных условиях (на чернозёме) сохраняется уровень миксоплоидии, свойственный исходному клону и материнскому дереву (соответственно 33,2% и 30,5%). Причем, если в Семилукском питомнике в основном встречались анеуплоидные клетки с числом хромосом $2n = 46, 48, 50, 52$, то в Ступинском стационаре (на песке) спектр анеуплоидных клеток расширился от $2n=42$ до $2n=54$. Нарастание гетерогенности (полиморфизма) клеточных популяций по числу хромосом, по-видимому, может обеспечить наиболее эффективную реализацию функции генов в конкретных неблагоприятных условиях среды.

Таблица

Цитогенетическая характеристика растений клона миксоплоидного тополя сереющего в различных условиях произрастания

Анализируемые показатели	Семилукский питомник (чернозем)	Ступинский стационар (сухой песок)
Число изученных растений	3	3
Высота 11-летних растений, м	$11,9 \pm 0,6$	$5,6 \pm 1,9$
Число делящихся клеток	1076	1120
Патологии митоза, % $\bar{X} \pm S_x$	$1,7 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,9^{***}$
Пределы варьирования ПМ, min-max, %	0,0 – 16,7	0,7 – 22,4
% микроядер	0,0	$0,24 \pm 0,05$
% клеток с числом хромосом:		
–триплоидных ($2n=3x=57$)	$66,8 \pm 3,3$	$47,4 \pm 5,3^{**}$
–диплоидных ($2n=2x=38$)	$29,5 \pm 3,1$	$16,8 \pm 1,0^*$
–анеуплоидных ($2n=42-54$)	$3,7 \pm 0,3$	$35,8 \pm 5,4^{**}$
Уровень миксоплоидии, %	$33,2 \pm 3,3$	$52,6 \pm 5,3^*$
Суммарное количество клеток с 3+8 ядрышками, %	$5,4 \pm 0,5$	$9,8 \pm 0,3^*$

Примечание: различия между средними значениями (чернозем – песок) достоверны при * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

2. Существенно увеличивается частота (в 5 раз) и расширяется спектр патологических митозов, что привело к возникновению анеуплоидии и повышению уровня миксоплоидии. Так, на песке спектр ПМ был в два раза шире и представлен 8 типами, чем на черноземе (4 типа). В большинстве случаев спектр ПМ был представлен мостами в анафазе и телофазе (до 50%

на песке, что свидетельствует о достаточно высоком здесь уровне мутационного процесса), отставаниями хромосом в метакинезе и анафазе-телофазе, которые могут привести к неравномерному распределению хромосом между дочерними клетками, возникновению анеуплоидии и нарастанию генетической гетерогенности клеточных популяций. По-видимому, значительная часть выявленных нарушений митоза у рамет клона, произрастающих в оптимальных условиях (на чернозёме) репарируется, т.к. микроядра не были обнаружены. Существенным отличием спектра ПМ у клона, произрастающего в неблагоприятных условиях (на сухом песке) является появление нежизнеспособных нарушений: агглютинации хромосом в метафазе и анафазе, а также сложных нарушений митоза, включающих множественные ПМ (отставание хромосом + обособление группы хромосом в анафазе, мосты + отставание хромосом в анафазе и др.).

3. Усиливается метаболическая активность клеток, что проявилось в увеличении ядрышковой активности – доли интерфазных клеток с 3-8 ядрышками (вместо типичных 1-2). Причем, только в неблагоприятных условиях произрастания (на песке) были отмечены случаи появления остаточных ядрышек в метафазе митоза (рис. 2), присутствие которых рассматривают как проявление эпигенетической изменчивости и связано с активностью генов рРНК, обычно ингибированных на этой стадии. Это приводит к дополнительному синтезу белков и может рассматриваться как цитологическое проявление компенсаторного механизма, обеспечивающего клетку необходимым количеством белка при воздействии негативных условий произрастания.

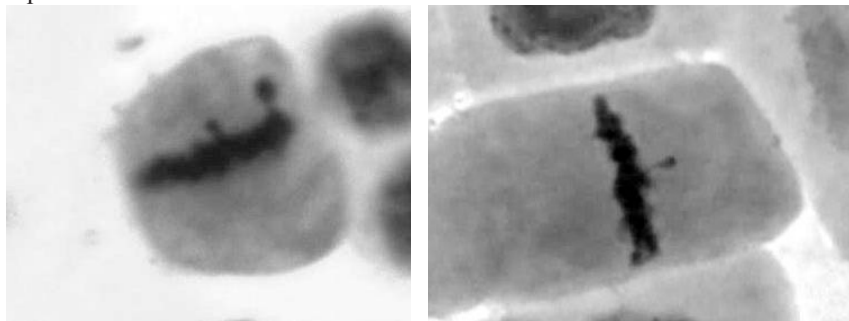


Рис.2. Остаточные ядрышки в метафазе митоза у растений клона миксоплоидного тополя сереющего, произрастающего в Ступинском стационаре Воронежской области. Увеличение $10^{\times} \times 100^{\times} \times 1,5^{\times}$

Выводы

Миксоплоидный клон аллотриплоидного тополя сереющего, произрастающий в неблагоприятных эдафических условиях (на сухом песке) характеризуется более высокой внутриклоновой цитогенетической неоднородностью (а, следовательно, и генетической гетерогенностью соматичес-

ких клеток) по сравнению с растениями того же клона, произрастающими в оптимальных условиях (на черноземе). Генетическая и эпигенетическая изменчивость, проявляющаяся в изменении уровня миксоплоидии (соотношении триплоидных, диплоидных и анеуплоидных клеток) в зависимости от условий среды, изменении характера экспрессии генов (в миксоплоидной ткани, при появлении остаточных ядрышек в метафазе митоза, повышении количества ядрышек в интерфазных клетках), по-видимому, способствует адаптации анализируемого клона к неблагоприятным условиям произрастания. Продуктивный аллотриплоидный тополь сереющий, имеющий миксоплоидную природу, характеризуется достаточно широкой нормой реакции, что расширяет возможности для его практического использования.

Литература

1. Царев А.П. Сортоведение тополя. – Воронеж : ВГУ, 1985. – 152 с.
2. Сиволапов А.И. Тополь сереющий. генетика, селекция, размножение. – Воронеж: ВГУ, 2005. – 157с.
3. Машкина О.С., Сиволапов А.И., Табацкая Т.М. Методические рекомендации по выращиванию посадочного материала сортов тополя сереющего с использованием технологии *in vitro*. – Воронежская гос. лесотех. академия. – Воронеж, 2011. – 30 с.

Резюме

Проведена сравнительная цитогенетическая оценка 12-летних растений размноженного *in vitro* клона триплоидного тополя сереющего (имеющего миксоплоидную природу) в контрастных условиях произрастания. Обсуждаются вопросы адаптации растений к неблагоприятным эдафическим условиям на клеточном и субклеточном уровнях.

Проведена порівняльна цитогенетична оцінка 12-річних рослин розмноженого *in vitro* клона триплоїдної тополі сірючої (що має миксоплоїдну природу) в контрастних умовах зростання. Обговорюються питання адаптації рослин до несприятливих едафічних умов на клітинному та субклітинному рівнях.

A comparative data of cytogenetic investigations of 12-year-old plants of *in vitro* multiplication clone of triploid poplar grey (having mixoploid nature) in contrasting growing conditions have been presented. The problems of cytogenetic adaptation of plants to unfavorable edaphic conditions have been discussed.

СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С.¹, ПИМЕНОВ А.В.¹, ТАШЕВ А.Н.², ЕФРЕМОВА Т.Т.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru

²Лесотехнический университет, Республика Болгария, 1756 София, ул. Климент Охридски, 10, e-mail: atashev@mail.bg

АДАПТИВНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ХВОЙНЫХ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ ПРОИЗРАСТАНИЯ

Основными лесообразующими видами умеренной зоны северного и южного полушарий являются представители класса хвойные (*Coniferopsida*). Хвойные растения имеют обширные ареалы и произрастают в различных, в том числе отличающихся высокой экстремальностью, экологических условиях. Выявление адаптивных особенностей, характеризующих изменчивость генома хвойных при воздействиях стрессовых факторов окружающей среды, позволяет оценивать микроэволюционные процессы, происходящие в популяциях данной группы растений, и прогнозировать их репродуктивную стратегию в экстремальных местопроизрастаниях.

Материалы и методы

Семена проращивали в чашках Петри, проростки обрабатывали 1% р-ром колхицина в течение 4 часов, затем фиксировали спиртово-уксусной смесью (3:1). Перед окрашиванием материал протравливали 4 % железоаммонийными квасцами в течение 15 мин. Окрашивали проростки 1% р-ром ацетогематоксилина. Для просмотра использовали «давленные» препараты, приготовленные стандартным способом. Препараты просматривали под микроскопом Axiostar-plus. Число хромосом подсчитывали в метафазных клетках, хромосомные мутации анализировали на стадии метафазы и анателофазы (без предобработки колхицином). Окраску ядрышек и их подсчет в интерфазных ядрах производили р-ром азотнокислого серебра в течение 6 ч при 60°. Количественное определение ДНК в образцах хвои проводили на спектрофотометре BioRad Smartspec Plus совместно с НП «Сибирский центр лесной сертификации», г. Красноярск.

Результаты и обсуждение

В условиях естественной экстремальности – на границах видовых ареалов и за их пределами (зона сухих степей, Нижнее Поволжье; зона тундры, п-ов Таймыр), на болотах (Западная Сибирь), в горных массивах (Крконоше, Пирин, Рила, Западные Родопы), а также при техногенных воздействиях (окрестности гг. Красноярск, Норильск) в популяциях хвойных широко распространена изменчивость числа хромосом. Отклонения от диплоидного числа хромосом у хвойных в экстремальных условиях среды выражаются в возникновении полиплоидии, миксоплоидии и анеуплоидии, появ-

лении добавочных хромосом (Седельникова и др., 2010а). Наиболее часто встречается миксоплоидия, способствующая увеличению адаптивного потенциала растений в неблагоприятных условиях произрастания, поскольку сочетание клеток разной ploидности оптимизирует гормональный баланс, повышает изменчивость генома и обеспечивает его пластичность (Кунах, 2011). Имеется прямая связь степени экстремальности условий произрастания и антропогенной нагрузки с уровнем варибельности хромосомных чисел и встречаемости клеток с числом хромосом, отличных от диплоидного, в семенном потомстве деревьев. Так, наиболее высокая для хвойных изменчивость хромосомных чисел ($2n = 19, 20, 24, 48$; $2n = 21, 23, 24, 27$; $2n = 24, 25, 36$; $2n = 24, 36$; $2n = 24, 36, 48$; $2n = 24, 48$) наблюдалась в популяциях субарктической расы лиственницы сибирской (*Larix sibirica* f. *polaris*), произрастающей на п-ове Таймыр на северо-восточной границе видового ареала в зоне влияния аэрозольных сернистых эмиссий ГМК «Норильский никель» и испытывающей кумулятивное влияние естественной и техногенной экстремальности. В данной популяции лиственницы нами впервые для вида описаны добавочные хромосомы ($2n = 24 + 1B$). Примечательно, что таймырские популяции лиственницы сибирской обнаруживают очень высокую степень генетической дифференциации (Биоразнообразие лиственниц..., 2010).

У представителей рода *Picea* (Ель), в котором особенно распространены добавочные хромосомы, их появление нередко приурочено к экстремальным условиям произрастания деревьев, например, на болотах, в горах. В популяциях ели сибирской (*Picea obovata*) в болотных экотопах Западной Сибири добавочные хромосомы отмечены в полиплоидных клетках ($2n = 48 + 1B$), а в некоторых случаях – в клетках, содержащих кольцевую хромосому. Совсем недавно впервые для вида добавочные хромосомы ($2n = 24 + 1-2B$) найдены нами у ели обыкновенной (*Picea abies*) на юго-западной границе видового ареала в Западных Родобах, на высоте 1500 м над уровнем моря (данное природное местообитание ели обыкновенной занесено в Красную книгу Болгарии и строго охраняется в соответствии с Бернской конвенцией). Установлено, что наличие добавочных хромосом затрагивает функционирование всего генома и может обуславливать рост уровня его изменчивости и повышение полиморфизма популяций растений, в частности, хвойных, при воздействии стрессовых факторов (Муратова, 2000; Кунах, 2010, 2011).

Усиление метаболической активности клеток растений в экстремальных условиях существования связано с различными механизмами увеличения генетического материала. В качестве примера можно привести обнаружение нами у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), произрастающей на болоте в условиях постмелиоративного стресса, кроме полиплоидных клеток, гигантской хромосомы, параметры которой нехарактерны для нормального кариотипа. Вызывает интерес тот факт, что дерево, в потомстве

которого найдена гигантская хромосома, проявляет признаки гетерозиса (Седельникова, Пименов, 2007). Увеличение объема хромосом зиготы и накопление значительного количества ДНК в ядре и цитоплазме в процессе созревания яйцеклетки наблюдается у сосен обыкновенной и сибирской (*Pinus sylvestris* и *Pinus sibirica*), что не исключает вероятность проявления у них скрытой политении (Nagl, 1967; Ермаков и др., 1981).

Изменчивость количества ДНК в соответствии с флуктуациями окружающей среды рассматривается некоторыми авторами в качестве одного из основных трендов экологической эволюции растений (Ohri, 1998). Изучение структурно-функциональной организации ряда родов растений в зависимости от их «геологического» возраста показало, что глобальные колебания климатических факторов сопряженно воздействуют на геном растений. Причиной увеличения содержания ДНК в ядерном геноме растений может служить неблагоприятность климатического или почвенного жизнеобеспечения. Индуцированный температурным или другим стрессом рост генома расширяет ресурс адаптивной изменчивости (Гамалей, 2011). Адаптивное значение вариабельности размера генома и ее зависимость от внешних факторов обосновывается для различных видов хвойных (Murgay, 1998; Ahiya, Neale, 2005). Так, для сосен установлена корреляционная связь между климатическими факторами и количеством ядерной ДНК – увеличение ее содержания отмечается у растений в более аридных условиях произрастания (Wakamiya et al., 1993). В результате проведенного нами исследования содержания ДНК в хвое деревьев *Pinus sylvestris*, произрастающих в Западной Сибири, установлено, что ее количество у отдельных особей на болоте евтрофного типа («Обское болото») может существенно возрастать. В то же время, на смежном суходоле содержание ДНК в хвое деревьев более выровнено. При этом показано, что уровень генетического полиморфизма в популяциях *Pinus sylvestris*, произрастающих на болотах Западно-Сибирской равнины, значительно выше, чем в смежных популяциях данного вида в благоприятных условиях на суходолах (Ларионова, Экарт, 2010).

В работах последних лет обсуждается изменчивость размера генома хвойных в связи со степенью активности рибосомных генов в популяциях данной группы растений, произрастающих в различных условиях среды (Ahiya, Neale, 2005). Вариабельность числа и распределения локусов рибосомных генов в хромосомах хвойных являются не только основными различиями их кариотипов, отражающими генетическую дифференциацию, но и представляют собой изменения, регулируемые внешними факторами. Характерное для популяций хвойных в экстремальных местообитаниях увеличение количества ядрышкообразующих районов хромосом, в которых локализованы кластеры рибосомных генов, и числа ядрышек в интерфазных ядрах могут интерпретироваться в качестве адаптаций, регулирующих процессы метаболизма растений в стрессовых условиях (Седельникова и др., 2010б).

Факторы среды, модифицирующие геномную изменчивость, приводят к усилению мутационных процессов в популяциях хвойных, произрастающих в экстремальных экотопах. Эти популяции характеризуются высоким (5.1-22.8%) уровнем встречаемости хромосомных нарушений и аномалий митоза, расширением их спектра, включающего редкие типы перестроек. У хвойных на болотах, в горах, на южной и северной границах видовых ареалов и за их пределами, в зонах, подверженных техногенным загрязнениям, выявлены кольцевые и дицентрические хромосомы, фрагменты, остаточные ядрышки, перичцентрические инверсии, пульверизация и агглютинация хромосом, а также многополюсные расхождения, фрагменты, мосты, отстающие и забегающие хромосомы, С-митоз. Большое количество хромосомных нарушений наблюдается в клетках деревьев при резком изменении условий их произрастания на болотах в результате постмелиоративного стресса, вызываемого осушительной мелиорацией. Наиболее высоким уровнем хромосомных мутаций разнообразного типа отличаются насаждения хвойных, испытывающие «давление» комплекса факторов, сочетающих воздействие техногенного загрязнения и природной экстремальности. В условиях такой «критической» экстремальности окружающей среды состояние хвойных древостоев характеризуется как ослабленное или угнетенное, вплоть до их полной гибели. Например, в популяциях *Larix sibirica*, произрастающих на границе распространения вида в зоне влияния выбросов ГМК «Норильский никель», мутации были обнаружены в каждой пятой клетке, доступной для анализа, а признаки деградации деревьев проявлялись в снижении их прироста, пожелтении хвои, дефолиации, усыхании.

К настоящему времени опубликованы многочисленные данные, подтверждающие высокий уровень хромосомных нарушений у хвойных, произрастающих в естественно экстремальных экотопах и в условиях различного по характеру и степени антропогенного загрязнения. Оценка степени воздействия стрессовых экологических факторов и их комбинаций на геном хвойных с применением в качестве тест-критериев различных цитогенетических показателей используется для мониторинга состояния окружающей среды (Muratova, Sedelnikova, 2000; Машкина и др., 2009). Возникновение различных типов мутаций в популяциях *Pinaceae* в экстремальных местообитаниях, с одной стороны, свидетельствует о деструктивных процессах в клетках растений, с другой – может отражать высокую степень экологической пластичности.

Таким образом, закономерности адаптивной трансформации генома хвойных, проявляющиеся в изменчивости количества хромосом и содержания ДНК, усилении активности рибосомных генов и увеличении ядрышкового материала в интерфазных ядрах, а также в индукции мутационных процессов и полиморфизме по хромосомным перестройкам, отражают процессы микроэволюции и модификации видов в экстремальных условиях произрастания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 30 «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

Литература

1. *Биоразнообразие лиственниц Азиатской России* / Отв. ред. С.П. Ефремов, Л.И. Милютин. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео». – 2010. – 159 с.
2. *Гамалей Ю.В.* Криофиты Евразии: происхождение и структурно-функциональная специфика // Ботан. журн. – 2011. – Т. 96, № 12. – С. 1521-1546.
3. *Ермаков И.П., Баранцева Л.М., Матвеева Н.П.* Цитохимическое изучение ДНК в процессе созревания яйцеклетки в раннем эмбриогенезе у *Pinus sibirica* Du Tour // Онтогенез. – 1981. – Т. 12, № 4. – С. 339-344.
4. *Кунах В.А.* Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений // Жебраковские чтения «Преобразование геномов». Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси. – Минск. – 2011. – С. 3-53.
5. *Ларионова А.Я., Экарт А.К.* Генетическое разнообразие и дифференциация болотных популяций сосны // Хвойные бореальной зоны. – 2010. – Т. XXVII, № 1-2. – С. 120-126.
6. *Машикина О.С., Калаев В.Н., Мурая Л.С., Леликова Е.С.* Цитогенетические реакции семенного потомства сосны обыкновенной на комбинированное антропогенное загрязнение в районе Новолипецкого металлургического комбината // Экологическая генетика. – 2009. – Т. VII, № 3. – С. 17-29.
7. *Муратова Е.Н.* В-хромосомы голосеменных // Успехи соврем. биол. – 2000. – Т. 120, № 5. – С. 452-465.
8. *Седельникова Т.С., Муратова Е.Н., Пименов А.В.* Изменчивость хромосомных чисел голосеменных растений // Успехи соврем. биол. – 2010а. – Т. 30, № 6. – С. 557-568.
9. *Седельникова Т.С., Муратова Е.Н., Пименов А.В.* Экологическая обусловленность дифференциации кариотипов болотных и суходольных популяций видов *Pinaceae* // Ботан. журн. – 2010б. – Т. 95, № 11. – С. 1513-1520.
10. *Седельникова Т.С., Пименов А.В.* Хромосомные мутации у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в гидроморфных условиях произрастания // Изв. РАН. Сер. биологическая. – 2010. – № 4. – С. 417-422.
11. *Кунах В.А.* Додаткові або В-хромосоми рослин. Походження і біологічне значення // Вісник Українського тов. генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 99-139.
12. *Ahuja M. Raj.* Evolution of genome size in conifers // *Silvae Genet.* – 2005. – V. 54, № 3. – P. 126-137.
13. *Muratova E.N., Sedelnikova T.S.* Karyotypic variability and anomalies in populations of conifers from Siberia and Far East // *Cytogenetic Studies of Forest Trees and Shrubs – Review, Present Status, and Outlook on the Future.* Special issue of the *Forest Genetics.* – Zloven: Arbora Publishers, 2000. – P. 129-141.
14. *Murray B.G.* Nuclear DNA amounts in gymnosperms // *Annals of Bot.* – 1998. – V. 82. – P. 3-15.
15. *Nagl W.* Karyologische Anatomie der Samenanlagen von *Pinus sylvestris* // *Osterr. Bot. Zeitschrift.* – 1967. – V. 112. – P. 349-370.
16. *Ohri D.* Genome size variation and plant systematics // *Annals of Bot.* – 1998. – V. 82. – P. 75-83.

17. *Wakamiya I., Newton R. J., Johnston J. S., Price H. J.* Genome size and environmental factors in the genus *Pinus* // *Am. J. Bot.* – 1993. – V. 80. – P. 1235-1241.

Резюме

Обсуждаются факторы адаптивной изменчивости геномов хвойных в экстремальных условиях произрастания.

Factors of adaptive genome variability of conifers from the extreme environmental conditions are discussed.

ШЕВЦОВА Н. Л.

Институт гідробіології НАН України

Героїв Сталінграда, 12, Київ 04210, Україна, e-mail: shevtsovanl@rambler.ru

ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ВИЩИХ ВОДЯНИХ РОСЛИН У РАДІОЕКОЛОГІЧНОМУ МОНІТОРИНГУ ВОДОЙМ

Найбільшу загрозу з усього спектру дії іонізуючої радіації на живий організм має її мутагенність. Чутливість біологічних тест-систем як індикаторів мутагенної здатності середовища у більшості випадків виявляється вищою, ніж хіміко-аналітичних та радіометричних методів [1].

Одним з ефективних методів оцінювання генетичної небезпеки навколишнього середовища є облік цитогенетичних порушень. Частота хромосомних аберацій з високою ступінню корелює з частотою точкових мутацій, які пошкоджують індивідуальні гени, що контролюють ту чи іншу ознаку організму [2].

Незважаючи на досить великий перелік рослинних тест-організмів [1-3] більшість з них використовують для визначення миттєвої мутагенності водного середовища у лабораторних умовах. При цьому не враховують тривалість дії мутагена, а саме його хронічну дію на протязі місяців чи років. Саме тому, при оцінці мутагенності водойм з довгою історією забруднення радіоактивними та хімічними мутагенами, перевагу мають аборигенні (представницькі) види досліджуваних водойм [4].

У більшості досліджень з визначення мутагенного ефекту дії іонізуючої радіації в природних умовах використовують наземні рослини, здебільшого, види родини злакових [5]. Найчастіше хромосомні порушення, викликані іонізуючою радіацією, аналізують на проростках насіння, зібраних з рослин на радіаційно неблагополучних територіях [3, 5]. Роботи, що аналізують цитогенетичні порушення у вегетуючих вищих водяних рослинах з водойм, що зазнають радіонуклідного забруднення, практично відсутні.

Метою нашої роботи є дослідження можливості використання для оцінки мутагенного потенціалу водойм з тривалою історією радіонуклідного забруднення показників частоти абераційних пошкоджень та кількості

мульти-аберантних клітин у кореневих меристем деяких видів вищих водяних рослин, типових для літоралі водойм географічної зони півночі та центру України.

Матеріал і методика

В 2006-2010 рр. у водоймах, розташованих на території Чорнобильської зони відчуження, відбирали проби вищих водяних рослин, які належать до 2-х основних екологічних груп: – з плаваючим на поверхні води листям, укорінені: лагаття сніжно-біле – *Nymphaea candida* J. et C. Presl; глечики жовті – *Nuphar lutea* (L.) Smith. – повітряно-водні рослини: їжача голівка пряма – *Sparganium erectum* L., куга озерна (схеноплект) – *Schoenoplectus lacustris* (L.) Palla L., осока гостра – *Carex acuta* L.; очерет звичайний – *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Steud., рогіз вузьколистий – *Typha angustifolia* L., рогіз широколистий – *Typha latifolia* L., лепешняк великий – *Glyceria maxima* (C. Gartm.), сусак зонтичний – *Butomus umbellatus* L., ситник розлогий – *Juncus effusus* L.; стрілолист стрілолистий – *Sagittaria saggitifolia* L., півники болотні – *Iris pseudacorus* L. [6]

Паралельно проводили відбір проб у водоймах з фоновим рівнем радіонуклідного забруднення. Потужність поглиненої дози на рослини літоралі визначалася сумою доз від внутрішніх і зовнішніх джерел опромінення що наведена за даними Д.І. Гудкова та ін., 2009 [7]

Цитогенетичний аналіз проводили в клітинах апікальних меристемних тканин коренів вищих водяних рослин. Рівень хромосомних аберацій визначали за модифікованим для макрофітів анафазним методом [8]. Визначали частоту аберантних анафаз (ЧАА) та середню кількість аберацій на аберантну клітину (ЧАК). З огляду на розрахунки статистичної достовірності для кожної точки відбору аналізували не менше 10 коренів із вибірки не менш ніж 1000 анафаз для обчислення. До аберантних клітин відносили клітини в анафазі чи ранній телофазі, що містили фрагменти і мости. Хромосомні аберації класифікували за такими типами: фрагменти одинарні, фрагменти парні, одинарні мости, парні мости, мости з фрагментами. В клітинах, що містили аберації, вираховували показник середньої кількості аберацій на аберантну клітину. При анафазному методі аналізування у клітинах, які містять велику кількість аберацій, інколи буває складно розрізнити кількість та тип цих аберацій. Тому такі клітини, які містили більше ніж 2 (1 парна) аберації були виділені у клас клітин з множинними абераціями.

Показники хромосомних порушень обробляли стандартними статистичними методами [9]. Мікроскопічний аналіз проводили за допомогою світлового мікроскопу Primostar (фірми “Carl Zeiss”, Німеччина) зі збільшенням $\times 1000$ під масляною імерсією.

Результати та обговорення

Дослідження проводили у 2006-2010 рр. на водоймах Зони відчуження ЧАЕС та водоймах м. Києва та Київської області. За збільшенням поглиненої дози на вищі водяні рослини ці водойми розташовані у ряду – оз.Вербне, м. Київ

» Київське водосховище (с. Лютіж) > Київське водосховище (с.Страхолисія) > водойма-охолодник ЧАЕС > Янівський затон > оз. Азбучин > оз. Далеке > оз. Глибоке. Найвищі показники ЧАА – 7-12 %, зареєстровані у рослин найбільш забруднених водойм, що розташовані на лівобережній частині заплави р. Прип'ять – озерах Глибоке та Далеке, а також у рослин оз.Азбучин (рис.). Найнижчі показники хромосомних порушень на рівні 2% зареєстровані у рослин з Київського водосховища та озера Вербне.

Аналіз даних, отриманих за допомогою анафазного експрес-тесту, виявив значне перевищення спонтанного рівня структурного мутагенезу у видів домінантів та субдомінантів ценозів вищих водяних рослин літоральних зон полігонних водойм. Для водойм з фоновим рівнем радіонуклідного забруднення рівень хромосомних порушень не перевищував рівень спонтанного мутагенезу.

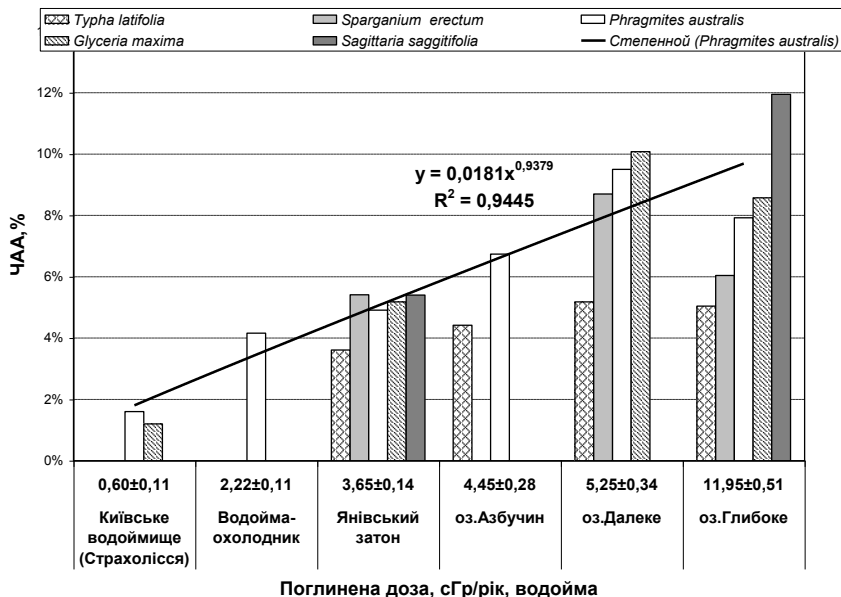


Рис. Середні значення частоти хромосомних аберацій у деяких видах вищих водяних рослин водойм з різним рівнем радіонуклідного забруднення

При проведенні цитогенетичного моніторингу ще одним важливим показником має бути кількість клітин з множинними абераціями, чи показник кількості аберацій на одну аберантну клітину (ЧАК). Хромосомні пошкодження в клітинах меристемних тканин мають властивість частково відновлюватися чи елімінуватися, а перший клітинний поділ може пройти менше ніж 1% мульті-аберантних клітин. Проте, відомо, що деякі хро-

мосомні перебудови можуть існувати тривалий час, передаючись дочірнім клітинам. Механізми довготривалого існування клітин з множинними аберациями ще досліджуються, але індукування появи та тривалого існування мульти-аберантних клітин внаслідок хронічної дії іонізуючого випромінювання вже не викликає сумніву [3, 4, 5].

Найбільші показники ЧАК – 2,2, зареєстровані у рослин водойм лівобережної частини заплави р. Прип'ять для екологічної групи – з плаваючим на поверхні води листям, укорінені та повітряно-водного виду – стрілолиста та стрілолистого, який у досліджених водоймах росте майже повністю зануреним у воду (табл.). Найменші показники зареєстровані для повітряно-водних видів водойм з фоновим радіаційним рівнем – 1,01.

Таблиця

Дозова залежність ЧАК кореневих меристем деяких видів вищих водяних рослин

Водойма	Поглинена доза, сГр/рік	<i>Typha latifolia</i>	<i>Sparganium erectum</i>	<i>Phragmites australis</i>	<i>Glyceria maxima</i>	<i>Nuphar lutea</i>	<i>Sagittaria saggitifolia</i>
Київське водоймище Страхолиця	0,60±0,11	1,03±0,01	-	1,01±0,01	1,04±0,01	1,25±0,04	1,36±0,11
Янівський затон	3,65±0,14	1,23±0,07	1,35±0,04	1,38±0,01	1,37±0,08	1,65±0,12	1,02±0,01
оз.Азбучин	4,45±0,28	1,27±0,05	-	1,49±0,05	-	-	1,55±0,07
оз.Далеке	5,25±0,34	1,45±0,08	1,57±0,08	1,65±0,003	1,75±0,06	1,69±0,11	2,20±0,14
оз.Глибоке	11,95±0,51	1,54±0,08	1,56±0,07	1,68±0,04	1,75±0,11	1,98±0,11	2,01±0,11

Висновки

Генетичні показники – частота хромосомних абераций та кількість абераций на одну аберантну клітину, досліджених видів вищих водяних рослин прямо корелюють з потужністю поглинутої дози, яку отримує рослина. Встановлена степенева функція кореляції величини ЧАА згідно рівнянню $y=0,0181 \times x^{0,9379}$ з коефіцієнтом достовірності апроксимації $R=0,95$.

Серед досліджуваних видів вищих водяних рослин найбільш чутливими до радіонуклідного забруднення за показниками генетичних порушень є види: глечики жовті *Nuphar lutea*, стрілолист стрілолистий *Sagittaria saggitifolia*, лепешняк великий *Glyceria maxima* очерет звичайний, *Phragmites australis*.

Згідно проведених досліджень генетичних показників деяких видів вищих водяних рослин найбільш напружений мутагенний стан спостерігається у водоймах лівобережної заплави р. Прип'ять.

Література

1. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ // Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. – Женева, ВОЗ, 1989. – 212 с.

2. Дмитриева С.А., Парфенов В.И. Кариология флоры как основа цитогенетического мониторинга / С.А. Дмитриева, В.И.Парфенов // Минск: Наука и техника, 1991. – 231с.

3. Застосування рослинних тест-систем для оцінки комбінованої дії факторів різної природи / [Гродзинський Д.М., Шиліна Ю.В., Куцоконь Н.В. та інші] // Методичні рекомендації по оцінці допустимих рівнів радіонуклідного та хімічного забруднення та їх комбінованої дії. – Київ, 2006. – 59 с.

4. Романенко В. Д. Основы гидроэкологии / Романенко В. Д./К.:Обереги, 2001. – 728 с.

5. Современное состояние наземных экосистем Восточно-Уральского радиоактивного следа: уровни загрязнения, биологические эффекты / [Позолотина В.Н., Молчанова И.В., Караваева Е.Н. и др.] // Екатеринбург: Изд-во „Гощицкий”, 2008. – 204 с.

6. Определитель высших водных растений Украины / [Доброчаева Д.Н., Котом М.И., Прокудин Ю.Н. и др.] // Киев: Наук. Думка, 1987. – 548 с.

7. Радиоэкологические проблемы водных экосистем в Чернобыльской зоне отчуждения / [Гудков Д.И., Кузьменко М.И., Киреев С.И. и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология., 2009, Т.49, 2. – С. 192–202.

8. К методике определения хромосомных нарушений у высших водных растений на примере тростника обыкновенного и стрелолиста стрелолистного / [Шевцова Н.Л., Гудков Д.И., Стойка Ю.А., Сивак Е.В.] // Наукові записки. Серія: біологія. Тернопольський Національний університет ім. В.Гнатюка. - 3(26), 2005. – с.479-481.

9. Закс Л. Статистическое оценивание./ Закс Л. // Москва: «Статистика». – 1976.– 530 с.

Резюме

Изучена возможность использования цитогенетических показателей аборигенных видов высших водных растений литорали в радиоэкологическом мониторинге при радионуклидном загрязнении водоемов. Отмечено несколько наиболее перспективных видов высших водных растений для биоиндикации мутагенности водной среды.

Вивчена можливість використання цитогенетичних показників представницьких видів вищих водяних рослин літоралі у радіоекологічному моніторингу за умов радіонуклідного забруднення водойм. Визначено декілька найбільш перспективних видів вищих водяних рослин для біоіндикації мутагенності водного середовища.

The possibility of the use of cytogenetic indexes of aboriginal species of littoral higher aquatic plants in radioecological monitoring of radionuclides' contaminated water bodies was considered. There were determined several promising species of higher aquatic plants for biological indication of the mutagenicity of the aquatic environment

ШИЛІНА Ю.В.¹, МОРОЗ Ю.І.², ГУЩА Н.І.¹, МОЛОЖАВА О.С.²

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 003680, Київ-143, вул. Заболотного, 148, e-mail: j.shilina@gmail.com

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,
Україна, 003022, Київ, пр. Глушкова 2

РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНА ЕКСПРЕСІЯ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ БАКТЕРІЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ЯК НЕСПЕЦИФІЧНА АДАПТИВНА РЕАКЦІЯ

Аналіз попередніх досліджень свідчить, що у деяких бактерій можлива стимуляція експресії факторів патогенності у відповідь на пошкоджуючу дію різних стресорів [1]. Для таких факторів патогенності характерні неспецифічна токсичність і супресивний вплив на захисні системи господаря, незалежно від його таксономічного положення. До таких факторів вірулентності відноситься піоціанін. Піоціанін (1-5-гідроксиметилфеназин) є пігментом з групи феназинів, який синтезується бактеріями синьогнійної палички та іншими флуоресціюючими видами *Pseudomonas*. Він є одним з факторів вірулентності *Pseudomonas aeruginosa*. Піоціанін викликає різні патологічні ефекти, пов'язані з вірулентністю бактерій по відношенню до людини, тварин та рослин. Відомо, що синтез піоціаніну *P. aeruginosa* необхідний для розвитку симптомів захворювання у рослин [2], зокрема, некрозоутворення. Здатність піоціаніну здійснювати токсичний вплив і викликати загибель клітин різних організмів (бактерій, грибів, ссавців, рослин) вказує на існування еволюційно консервативних фізіологічних мішеней для його дії [3].

До факторів патогенності також можна віднести швидкість розмноження бактерій. Показано, що патогенні бактерії, які швидше ростуть у природних умовах є більш вірулентними [4]. Рівень проліферації штамів *P. aeruginosa* PA14-PCBPP (виділений з клінічного матеріалу) і *P. aeruginosa* PA29-UCBPP (виділений з рослин) корелював зі ступенем розвитку симптомів захворювання [5]. Відомо, що бактерії можуть підвищувати виживаність, збільшуючи швидкість розмноження [4]. Іонізуюче опромінення може стимулювати проліферацію клітин, що є одним з механізмів радіоадаптації клітинних популяцій [6].

У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідити вплив хронічного гамма- та УФ-В-опромінення на синтез піоціаніну та проліферативну активність у різних штамів бактерій *Pseudomonas aeruginosa*.

Матеріали і методи

В дослідженнях використовували різні штами бактерій *Pseudomonas aeruginosa* (фітопатогенні штами – УКМ-В-1' = ATCC 10145 = NCIB 8295 = ВКМ В889 = ІМВ 9024, УКМ-1107 = ІМВ 9095, УКМ-1108 = ІМВ 9096; сапрофітні штами: ІМВ-8614, ІМВ-8615, ІМВ-8616), які були отримані з колекції культур Інституту мікробіології та вірусології Д.К. Заболотного.

Для оцінки впливу УФ-В-випромінення суспензії бактерій 24- і 48-годинних культур опромінювали в дозах 1, 5, 20 і 100 Дж/м² (лампа). Хронічне гамма-опромінення (Cs-137) культур бактерій проводили протягом 8 діб при потужності дози 1·10⁻⁸ Гр/с. Контрольну культуру утримували за тих же умов без опромінення.

Проліферацію бактеріальних клітин оцінювали за оптичною густиною бактеріальної суспензії (СФ-26, $\lambda=690$ нм). Інтенсивність синтезу піоціаніну оцінювали за оптичною густиною культуральної рідини ($\lambda=450, 520$ і 330 нм). Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми Microsoft Office Excel 2003.

Результати та обговорення

Вплив хронічного гамма-опромінення на експресію факторів патогенності фітопатогенними бактеріями P. aeruginosa. Хронічне гамма-опромінення бактерій протягом 8 діб (поглинута доза порядку 0,007 Гр) приводило до зростання кількості піоціаніну у всіх досліджуваних штамів *P. aeruginosa* (рис. 1). Найбільша стимуляція синтезу піоціаніну відмічена у штаму *P. aeruginosa* IMB-9024 (більше 200 % порівняно з неопроміненим контрольним варіантом).

Однією з причин зростання вірулентності патогенних бактерій під впливом стресових факторів є існування, принаймі у деяких з них, взаємозв'язку експресії систем захисту і факторів патогенності, що здійснюється, зокрема, завдяки особливостям функціонування у цих бактерій SOS-системи репарації [7]. Про участь SOS-системи в регуляції експресії піоціаніну свідчать дані про можливість індукції його синтезу налідиксовою кислотою, яка є одним з індукторів SOS-системи репарації [8].

Як відомо, швидкість розмноження патогенів також розглядають як один з факторів патогенності. Встановлено, що хронічне опромінення викликало значне зростання (приблизно у 1,5 рази) проліферативної активності патогенного штаму *P.aeruginosa* 9024 (рис. 1). Зростання інтенсивності розмноження (до 30 %) спостерігали і в інших фітопатогенних штамів *P.aeruginosa* 9095 та *P.aeruginosa* 9096. Виявлено кореляцію між величиною проліферації бактерій та синтезом піоціаніну. Проте, у випадку *P.aeruginosa* IMB-9024 рівень синтезу піоціаніну значно перевищував зростання кількості клітин.

Одержані дані свідчать, що адаптація патогенних бактерій *P. aeruginosa* до дії хронічного гамма-опромінення відбувається через використання принаймі двох механізмів – стимуляції SOS-системи репарації і супречним з нею синтезом факторів патогенності та підвищенням темпів клітинної проліферації.

Таким чином, нами показано, що хронічне гамма-опромінення приводить до стимуляції синтезу піоціаніну фітопатогенними штамми бактерій *P. aeruginosa* та зростання проліферативної активності, що може приводити

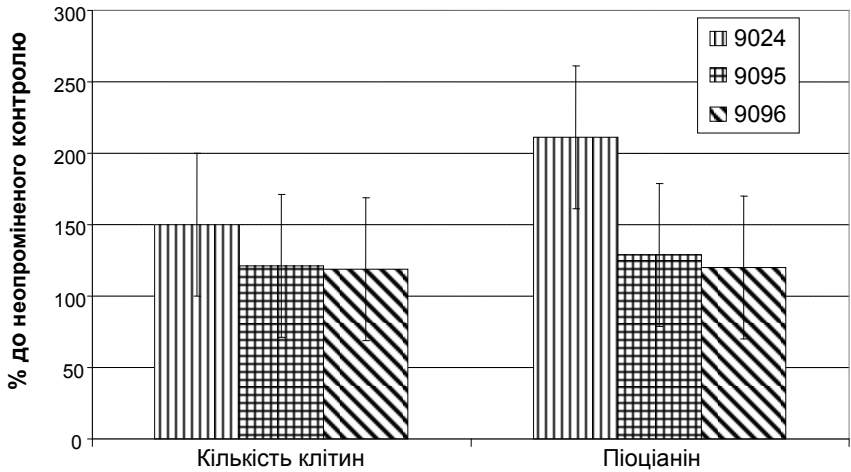


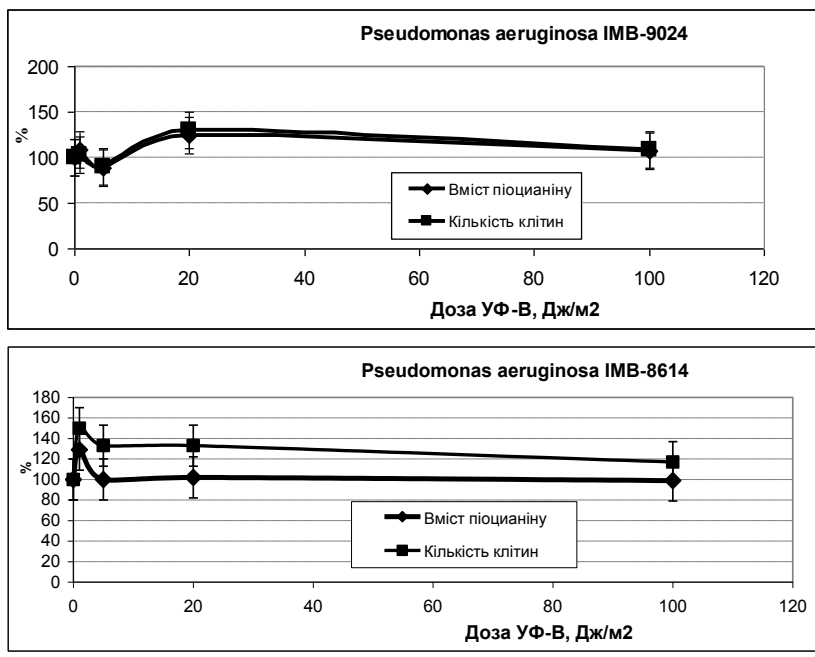
Рис. 1. Вплив хронічного гамма-опромінення на синтез піоціаніну та проліферацію клітин у різних штамів фітопатогенних бактерій *P.aeruginosa*

до збільшення їх агресивності. Такі зміни можуть відбуватися і при дії інших стресових факторів, зокрема УФ-В опромінення.

Вплив УФ-В-опромінення на синтез піоціаніну та проліферативну активність у різних штамів *Pseudomonas aeruginosa*. Дозові залежності впливу УФ-В на синтез піоціаніну у фітопатогенного та сапрофітного штамів бактерій свідчать, що опромінення фітопатогенного штаму 9024 у дозі 20 Дж/м² приводило до значної стимуляції синтезу піоціаніну (більше, ніж на 80 %), в той час як при опроміненні сапрофітного штаму 8614 спостерігали лише незначну стимуляцію тільки при дозі 1 Дж/м² (рис. 2).

У патогенного штаму *P. aeruginosa* 9024 після УФ-В опромінення виявлено однакове зростання кількості клітин і концентрації піоціаніну (рис. 2, А). У сапрофітного штаму 8614 опромінення УФ-В в дозах 1, 5,20 і 100 Дж/м² стимулювало проліферацію клітин, але не впливало, за виключення найнижчої із застосованих доз 1 Дж/м², на кількість утвореного піоціаніну (рис. 2, Б).

Можна припустити, що патогенні штам бактерій володіють еволюційно сформованими механізмами епігенетичної регуляції експресії факторів патогенності у відповідь на пошкоджуючу дію різних стресових факторів. Механізми дії гамма-випромінення та УФ-В відрізняються, проте для дії обох цих факторів характерне зростання концентрації активних форм кисню в опроміненних організмах. Такі сполуки утворюються і при взаємодії фітопатогенних бактерій з рослинами [9, 10], тому патогени набули здатності сприймати їх в якості сигналу для експресії своїх факторів патогенності.



А

Б

Рис. 2. Вплив УФ-В на синтез піоціаніну та проліферацію клітин у фітопатогенного штаму *Pseudomonas aeruginosa* 9024 (А) та сапрофітного штаму *Pseudomonas aeruginosa* 8614 (Б)

Висновки

Встановлено, що такі стресові фактори як хронічне γ -опромінення та УФ-В впливають на властивості бактерій *Pseudomonas aeruginosa*. Встановлено, що як хронічне γ -опромінення, так і УФ-В опромінення можуть стимулювати синтез фітопатогенними штамми бактерій *P. aeruginosa* важливого фактору їх вірулентності – пігменту піоціаніну, для якого характерний широкий спектр дії. Показано, що фітопатогенні бактерії *P. aeruginosa* активно проліферують в умовах радіаційного стресу. Ці фактори можуть бути однією з причин зростання агресивності патогенних бактерій при дії опромінення.

Література

1. Шилина Ю.В., Гуца Н.И., Дяченко А.И., Моложавая О.С., Мороз Ю.И. Экспрессия факторов патогенности фитопатогенных бактерий как неспецифическая адаптивная реакция // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К., 2010. – Т. 9. – С. 107-113.

2. Mavrodi, D.V., Bonsall R.F., Delaney S.M., Soule M. J., Phillips G., Thomashow L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J. Bacteriol. – 2001. – 183. – P. 6454–6465.

3. Ran H., Hassett D.J., Lau G.W. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100, N 24. – P. 14315–14320.

4. Баснакьян И.А., Бондаренко В.М., Мельникова В.А., Белявская В.А. Стрессор-индуцибельные бактериальные белки и вирулентность // Журн. микробиол. – 2001. – № 5. – С. 101-108.

5. Rahme L.G., Stevens E.J., Wolfort S.F. et al. Common virulence factor for bacterial pathogenicity in plants and animals // Science. – 1995. – Vol. 268. – P. 1899-1902.

6. Котеров А.Н., Никольский А.В. Адаптация к облучению in vivo // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1999.- Т.39, № 6.- С. 648-662.

7. Шилина Ю.В., Гуца Н.И., Дяченко А.И., Моложавая О.С., Овсянникова Л.Г., Дмитриев А.П. Роль SOS-системы репарации ДНК в адаптации и эволюции патогенных бактерий // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Т.6. – К.: ЛОГОС, 2009. – С. 96-101.

8. <http://fr.wikipedia.org>

9. Sriprang R., Vattanaviloon P., Mongkolsuk S. Exposure of phytopathogenic *Xanthomonas spp.* to lethal concentrations of multiple oxidants affects bacteria survival in a complex manner // Appl. Env. Microb. – 2000. – № 9. – P. 4017-4021.

10. Klotz M.G., Hutcheson S.W. Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringae* // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – 58, 8. – P. 2468-2473.

Резюме

Досліджено вплив хронічного гамма-опромінення та УФ-В на властивості бактерій *Pseudomonas aeruginosa*. Встановлено стимулюючий вплив опромінення на синтез фітопатогенними штамми бактерій *P. aeruginosa* піоціаніну та їх проліферацію.

Исследовано воздействие хронического гамма-облучения и УФ-В на свойства бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Показано стимулирующее влияние облучения на синтез фитопатогенными штаммами бактерий *P. aeruginosa* пиоцианина и их пролиферацию.

The influence of chronic gamma-irradiation and UV-B on property of bacteria *Pseudomonas aeruginosa* was studied. The stimulant effect of irradiation and on the pyocyanine synthesis and cell proliferation of the phytopathogenic strains *P. aeruginosa* was established.

ЯКИМЧУК Р.А.

Уманський державний педагогічний університет ім. Павла Тичини,
Україна, 20300, Умань, вул. Садова, 2, e-mail: peoplenature@rambler.ru

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ ВПЛИВУ ПРИРОДНИХ РАДІОНУКЛІДІВ ХВОСТОСХОВИЩ УРАНОПЕРЕРОБНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ

Всі живі організми на землі, включаючи людину, постійно зазнають впливу іонізуючого випромінювання від природних джерел. Середня потужність сумарного природного фону близька до 0,1 сЗв/год. +/- 30% [5]. Для населення країн СНД ефективна еквівалентна доза коливається в межах 450-1600 мкЗв [3]. В результаті господарчої діяльності людини в окремих районах України, де гірські породи збагачені вмістом урану, радію і торію, спостерігається технологічне підвищення радіаційного фону, який перевищує середньосвітовий рівень приблизно в півтора рази [2]. Особливий внесок у його формування здійснює уранова промисловість, що призвела до забруднення радіоактивними відходами територій площею 542 га. Утворені хвостосховища містять близько 66 млн. т радіоактивних речовин сумарною активністю більше $4,4 \cdot 10^{15}$ Бк [6]. Оцінюючи можливі наслідки забруднення довкілля природними радіоізотопами, виключну роль відіграє вивчення їх впливу на генетичні структури.

Матеріали і методи

З метою визначення мутагенної активності радіаційного забруднення хвостосховищ «Сухачівське Секція 1» ВО «Придніпровський хімічний завод» (ПХЗ), «Щербаківське» і кар'єру бурих залізняків (КБЗ) ДП «Східний гірничо-збагачувальний комбінат» (Схід ГЗК), проведено цитогенетичний аналіз меристематичних клітин первинних корінців проростків озимої пшениці (*T. aestivum* L.) сортів Альбатрос одеський та Зимоярка. Насіння впродовж 40 год. витримувалось у вологому радіоактивному ґрунті хвостосховищ (потужність експозиційної дози 140-180 мкР/год.). Як контроль, використано ґрунт дослідного сільськогосподарського виробництва Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (смт Глеваха Васильківського р-ну Київської обл.), де протягом багатьох років вивчається спонтанний рівень мутаційної мінливості у рослин озимої пшениці. Відбір проб ґрунту здійснювали у відповідності до стандартних методик [1].

Насіння пророщували при $t = 24-26$ °С. Первинні корінці довжиною 0,8-1,0 см фіксували в «оцтовому алкоголі» та піддавали мацерації дією 1 н. розчину соляної кислоти. Із апікальної меристеми корінців, забарвлених ацетоорсеїном, виготовляли тимчасові давлені препарати. Під час цитогенетичного аналізу, визначаючи частоту виникнення хромосомних аберацій, до уваги брали клітини, які перебували в анафазі та ранній телофазі. Вибір-ка складала не менше 1000 клітин для кожного варіанту.

Результати та обговорення

Серед небезпечних джерел формування техногенної складової підвищеного радіаційного фону Дніпропетровської області є хвостосховища Гідрометалургійного заводу ДП «Схід ГЗК», розміщеного в м. Жовті Води, де накопичено 41,2 млн. т радіоактивних відходів активністю 62,1 тис. Кі та колишнього ВО «ПХЗ» м. Дніпродзержинськ, де протягом 1948-1991 років створено 9 сховищ радіоактивних відходів, в яких зберігається понад 36 млн. т відходів уранового виробництва загальною активністю близько 75 тис. Кі [6]. Основними дозоутворюючими радіоізотопами даних територій є уран-238, радій-226, торій-230, 228, свинець-210, полоній-210, калій-40. Їх сумісна дія на насіння озимої пшениці викликає значне зростання частоти хромосомних перебудов меристематичних клітин первинних корінців. Дія ізотопів ґрунту хвостосховища «Сухачівське Секція 1» ВО «ПХЗ» індукує у сортів Альбатрос одеський і Зимоярка хромосомні аберації з частотою, що в 5,9 та 7,4 рази, відповідно, перевищують контроль (табл. 1).

Схожі наслідки радіаційного ураження мітотичних клітин озимої пшениці зафіксовано і за умов пролонгованої дії вологого ґрунту хвостосховища «Щербаківське» ДП «Схід ГЗК». Частота абераційних клітин у сортів Альбатрос одеський і Зимоярка перевищує контрольний рівень у 5,2 та 5,4 рази, відповідно. Враховуючи, що ґрунти хвостосховищ окрім радіоактивних ізотопів містять ще цілий ряд інших отруйних хімічних елементів (наприклад миш'як, ванадій, селен) та їх сполуки, важкі метали, можна припустити, що високий рівень хромосомних аберацій є наслідком не лише впливу радіоактивного опромінення, але й синергетичного ефекту взаємодії фізичних і хімічних чинників.

Серед хромосомних аберацій найчастіше зустрічаються дицентричні мости хромосомного типу та парні ацентричні фрагменти. Дія ґрунту з хвостосховища балки «Щербаківська» індукує в мітотичних клітинах обох сортів озимої пшениці появу мікроядер.

Особливої уваги заслуговує вивчення цитогенетичних наслідків впливу радіаційних забруднень рекультивованого хвостосховища «КБЗ», що використовується як резервне сховище аварійного скиду Гідрометалургійного заводу ДП «Схід ГЗК». На його площі в 55,6 га зберігається 19,3 млн. т відходів переробки уранової руди з сумарною активністю $990 \cdot 10^{12}$ Бк [4]. За результатами проведеного цитогенетичного аналізу встановлено високу мутагенну активність радіоізотопів ґрунту. Частота появи абераційних клітин перевищує контроль, в залежності від сорту, у 2,7-3,4 рази. Серед хромосомних порушень, які переважно представлені ацентричними фрагментами малих розмірів та дицентричними мостами, зафіксовано появу мікроядер та відстаючих хромосом. Це може свідчити про наявність у ґрунті хвостосховища «КБЗ» не лише факторів радіаційної природи, а й хімічних мутагенних чинників, здатних порушувати функції ниток веретена поділу та викликати анеуплоїдію.

Таблиця 1

Частота і спектр хромосомних аберацій в озимій пшениці за умов пролонгованої дії радіоактивно забруднених ґрунтів хвостосховищ

Місце відбору зразків	Кількість вивчених коріньців (шт.)	Кількість вивчених мітозів (шт.)	Мітози з порушеннями хромосомом		Спектр хромосомних порушень				Відношення фрагменти/мости
			шт.	%	фрагменти (шт.)	мости (шт.)	мікроядра (шт.)	відстаючі хромосоми (шт.)	
Альбатрос одеський									
смт Глеваха (контроль)	39	1034	4	0,39±0,19	4	0	0	0	-
Хвостосховище «Сухачівське Секція 1»	28	955	22	2,30±0,49*	10	12	0	0	0,8
Хвостосховище «Щербаківське»	24	1081	22	2,04±0,43*	11	10	1	0	1,1
Хвостосховище «КБЗ»	25	1038	11	1,06±0,32	4	5	1	1	0,8
Зимоярка									
смт Глеваха (контроль)	21	1129	3	0,27±0,15	3	0	0	0	-
Хвостосховище «Сухачівське Секція 1»	30	1144	23	2,01±0,42*	9	14	0	0	0,6
Хвостосховище «Щербаківське»	24	1086	16	1,47±0,37*	5	10	1	0	0,5
Хвостосховище «КБЗ»	30	1036	10	0,97±0,30*	4	5	1	0	0,8

* – різниця з контролем статистично достовірна при $P_{0,05}$

Висновки

Таким чином накопичені радіоактивні відходи хвостосховищ колишнього ВО «ПХЗ» та ДП «Схід ГЗК» призводять до підвищення природного радіаційного фону та, як наслідок, зростання мутаційної мінливості організмів. За результатами цитогенетичного аналізу встановлено суттєве збільшення частоти хромосомних аберацій за умов пролонгованої дії на насіння озимій пшениці радіоактивних ізотопів ґрунту хвостосховищ. Спектр хромосомних перебудов переважно складають дицентричні мости хромосомного типу, парні ацентричні фрагменти й мікроядра. За дії мутагенних факторів ґрунту рекультивованого хвостосховища «КБЗ» у спектрі порушень мітозу виявлено відстаючі хромосоми, виникнення яких свідчить про можливість індукування в організмів геномних мутацій. Зважаючи на можливість вільного вітрового поширення радіоактивно забрудненого пилу

хвостосховищ, уранова промисловість може складати генетичну загрозу і для організмів прилеглих до промислової зони території.

Література

1. *Беккер А.А., Агаев Т.Б.* Охрана и контроль загрязнения природной среды. – Ленинград: Гидрометеониздат, 1989. – 286 с.
2. *Коваленко Г.Д.* Радиоэкология Украины. – Харьков: ИД «Инжек», 2008. – 264 с.
3. *Майстренко В.Н.* Суперэкоотоксиканты: миф или реальность // Химическая экология: школа-семинар, 1-2 ноября 2001 г.: тезисы докл. – Уфа, 2001. – С. 118-127.
4. Національна доповідь України про безпеку поводження з відпрацьованим паливом та про безпеку поводження з радіоактивними відходами. – К., 2003. – www.sngcu.gov.ua. – 95 с.
5. *Нейфах Е.А.* Большие радиопатогенные загрузки детей от «малых доз» техногенной хронической радиации // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т. 43, № 3. – С. 193-196.
6. *Суматохіна І.М., Дук Н.М., Шевченко О.А.* Промислові відходи як чинник стану екологічної безпеки регіону: оцінка, картографування, управління // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. – 2008. – № 1. – С. 69-75.

Резюме

Радиоактивные отходы предприятий урановой промышленности вызывают существенное возрастание частоты хромосомных aberrаций в озимой пшеницы, среди которых преимущественно встречаются дицентрические мосты хромосомного типа, парные ацентрические фрагменты и микроядра. Появление в спектре нарушений митоза отстающих хромосом свидетельствует о возможном влиянии мутагенов химической природы и индуцировании геномных мутаций.

Радіоактивні відходи підприємств уранової промисловості спричиняють суттєве зростання частоти хромосомних аберацій в озимій пшениці, серед яких переважно зустрічаються дицентричні мости хромосомного типу, парні ацентричні фрагменти та мікроядра. Поява у спектрі порушень мітозу відстаючих хромосом свідчить про можливий вплив мутагенів хімічної природи та індукування геномних мутацій.

Radioactive wastes of uranium industry enterprises cause great growth of chromosomal aberration frequency inside winter wheat. There are disentric bridges of chromosomal type, pair acentric components and micronuclei among them. The presence of mythos transgression of remaining chromosomes is the indicator of chemical nature mutagens possible influence and induction of genome mutations.

HEINZE B.

Federal Research Centre for Forests, Department of Genetics, Austria, 1140 Vienna,
Hauptstrasse 7, e-mail: berthold.heinze@bfw.gv.at

**PHYLOGEOGRAPHY AND THE CONSEQUENCES OF
INTROGRESSION FOR FUNCTIONAL GENOMICS IN A PAIR OF
HYBRIDIZING EURASIAN ASPEN, *POPULUS TREMULA* AND
*P. ALBA***

We are studying the consequences of hybridization and introgression for adaptation and the evolution of long-living tree species. Specifically, we are interested in the contributions to fitness that genes of one species may pass on to the hybridization partner species. The quality and quantity of such contributions may differ across the species' distribution ranges, i.e., different (numbers of) genes may be affected in different regions of their distribution ranges. Eurasian trembling aspen (*Populus tremula*) and white or silver poplar (*P. alba*) are ideal objects for this study, as their distribution ranges are vast and overlapping in many regions, thus forming independent hybrid zones. *P. tremula* has a preference for more upland and mountainous sites, while *P. alba* prefers river floodplain. Spontaneous hybrid zones form where these habitats are in vicinity. Variants in chloroplast DNA sequences are being studied from across the range in *P. tremula*, and from Central European and Mediterranean *P. alba*. Nuclear microsatellite markers measure the degrees of hybridization and introgression, and mark parts of the genome (or of the chromosomes) where introgression is either above of below expectations, and to indicate any geographic sub-structuring of the two species. In the following, an overview will be given on work carried out in this field over the past years.

Materials and Methods

Plant material (winter buds or dried leaves) has been obtained from almost across the entire range of *P. tremula*: from Spain and Scotland in the west, to Turkey in the south, and as far east as Lake Baikal (approx. 500 in total, 300 of which were from Europe excluding Russia). These samples were either collected ourselves, or sent to us by colleagues. For *P. alba*, samples were primarily collected from Eastern Austria and the Danube Basin, with additional samples from Italy and the Mediterranean region.

DNA was extracted as described (Lexer et al. 2005, Fussi et al. 2010), mainly on the basis of commercial kits, e.g. the Sigma Plant Elute DNA extraction kit. Genetic markers (DNA fragments) were amplified by polymerase chain reaction (PCR). For chloroplast DNA variants, this involved fragments: trnDP +trnTP (size approx. 1066 basepairs (bp), cut with restriction enzyme HinfI), rpl16R1516 +rpl16F71R (1180 bp; EcoRI+HhaI), rpl16ex1f + rps3r2 (800 bp; EcoRI+HhaI), rps3f2 + ccmp10R (1020 bp; HhaI+SspI), atpBSAM + rbcLSAM (850 bp; EcoRI), and ccmp10R + trnHM (600 bp; MspI). The primer sequences can be found at the online database for chloroplast DNA primers (Heinze 2007).

DNA fragments were analysed on standard agarose gels (1.5 or 2.0 % agarose in 0.5 X Tris-borate-EDTA buffer), essentially as detailed in Sambrook and Russel (2001). An exception was fragment rpl16R1516 + rpl16F71R, which showed a tandem repeat pattern and was analyzed on a capillary electrophoresis system for exact length determination (Beckman Coulter CEQ 8000), following the manufacturer's recommendations. Chloroplast DNA data were assessed as different banding patterns. Combinations of banding patterns of individual plants for the five markers defined haplotypes. Relationships between haplotypes were visualized with the software NETWORK (<http://www.fluxus-engineering.com>, Bandelt et al. 1999). Frequencies of the different haplotypes (coded by different colours) were depicted on a map.

Nuclear microsatellite markers were selected such that at least one of the 20 markers was representing each of the 19 *Populus* chromosomes (as known from the genome sequence of *Populus trichocarpa*, Tuskan et al. 2006) – these were analyzed in the European samples only: GCPM_1719, GCPM_1158, PTR_4, ORPM_220, WPMS_14, WPMS_17, ASP_112322, WPMS_16, PTR_8, PTR_2, ORPM_344, ORPM_29, PMGC_2885, WPMS_20, GCPM_1812, GCPM_1894, ORPM_86, Yin_2, ORPM_214, ORPM_206. Again, the Beckman Coulter CEQ 8000 capillary electrophoresis automat was used for exactly determining allele sizes. Further details are given in Fussi (2010). Data were analyzed with the software packages STRUCTURE (Falush et al. 2003), NEWHYBRIDS (Anderson & Thompson 2002) and CNDm (Basten & Asmussen 1997), in order to detect the number of underlying genetic entities, possible hybrid classes (F1, F2 and backcrosses), and any associations (disequilibria) between chloroplast and nuclear data (details in Fussi 2010).

Results and Discussion

Distinct groups of haplotypes were detected for *P. tremula* and *P. alba*. Within the groups, haplotypes differed by only a few mutations. Some trees, apparently hybrids and introgressed individuals, showed a chloroplast type of the “opposite” species (i.e. morphology and chloroplast type differed). One exception was found for *P. alba* haplotypes in the Mediterranean, which differed by a number of mutational steps, and which were closer to *P. tremula* than to *P. alba* (Fussi et al. 2010). This indicates that despite frequent hybridization, the two species are good taxonomic groups, but *P. alba* may be worth a more detailed re-assessment regarding possible geographic subspecies. The complication with such an analysis is the frequent occurrence of extended clones (Van Loo et al. 2008, Fussi et al. 2012). Overall, 40 haplotypes were detected from across the *P. tremula* range. Surprisingly, Western Russia and even Siberia seem to be dominated by the same chloroplast genetic variants (haplotypes) as Europe. Just a few variants were present in most populations, but the frequency of individual haplotypes did not change much across this vast geographic scale. One important exception, though, was the area around Lake Baikal, where a new, more distantly related haplotype appeared. This may indicate a separate colonization history for

Eastern Siberia and the Russian Far East, a finding in accordance with general views on floristic diversity in Eurasia.

The nuclear microsatellites likewise confirmed that the two species hybridize in nature, not only in the F1 generation, but also forming advanced generations. Most of these individuals were classified as F2 or further advanced. This indicates an interesting preference for mating among hybrids, which could be explained by a number of hypotheses. One such hypothesis is the coherence of co-adapted gene complexes from each species at least as a haploid set in the hybrids (Lindtke et al., unpublished). Within species, small differences in allele frequencies defined the individual populations. This is again in accordance with previous findings (De Carvalho et al. 2010, Lexer et al. 2010).

Chloroplasts are totally “controlled” by gene products from the nucleus; maybe this system of regulation works well only if these gene products and the chloroplast itself are co-adapted. As a proxy for the whole nuclear genome, we checked our nuclear microsatellite markers (approx. one per chromosome) and questioned whether they were associated with one of the haplotype groups. This involved testing whether alleles that were more frequent in one species had a preference for chloroplast haplotypes of the same species. This was indeed statistically supported: overall, trees that had two species-associated alleles at a locus had more often a haplotype from the “correct” group (associated with the same species). The calculation of cytonuclear disequilibrium within the group of hybrids using haplotype clades revealed clear deviation of random distribution at six loci. The results of calculations using “singular” haplotypes instead of haplotype clades revealed cytonuclear disequilibrium at 10 loci. Several haplotypes were affected from significant associations – H15, H17, H33, H41 und H45. Among these, H15 is the second most frequent *P. alba* haplotype, and H41 and H45 are the most frequent *P. tremula* haplotypes, while H33 connects the *P. alba* and *P. tremula* groups, and was associated most often with intermediate genotypes. Most probably migration movements between Central Europe and Spain played a role for the patterns concerning this haplotype H33 (see also Fussi et al. 2010), however, migration should result in cytonuclear disequilibrium at all loci (Asmussen et al. 1989, Latta et al. 2001). The most common haplotype within *P. alba* (H21) did not show significant disequilibrium – it was more evenly associated with diverse genotypes, frequently including *P. tremula* alleles.

Conclusions

Taken together, these results can be explained by a dominance of directional forces – migration, assortative mating and selection (the latter two in combination) could have contributed to this pattern, whereas genetic drift or random mating are a less likely explanation. In the future, genomic resolution should be increased, e.g., by analysing more markers or even complete genomes. With that, individual loci, or even sets of loci which are in linkage disequilibrium in hybrid zones and contribute predominantly to this pattern, should be detectable. The findings support a view of plant genomes as being highly flexible – while some

parts of the genome are indifferent to hybridization and introgression, other parts form strong associations that affect fitness negatively when disrupted through these processes. Exactly these genes are important for keeping species together in evolution, while any potential new associations that may form in further generation hybrids may contribute to speciation, i.e., the formation of new species through initial hybridization.

Acknowledgement

I am grateful to Barbara Fussi, Renate Slunsky, to all colleagues who sent samples, and to Christian Lexer (University of Fribourg, CH) for the project collaboration. I thank Yuri and Mariana Belokon and Roman Volosyanchuk for translating the summaries. Project funding by the Austrian Academy of Science (DOC-fFORTE grant to B. Fussi) and the Jubilee Fund of the City of Vienna (Migrationsforschung) is gratefully acknowledged.

Literature

1. Anderson E.C., Thompson E.A. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. // *Genetics* – 2002. – vol. 160, № 3. – P.1217-1229.
2. Asmussen M.A., Arnold J., Avise J.C. The effects of assortative mating and migration on cytonuclear associations hybrid zones. // *Genetics* – 89. – vol. 122, № 4. – P.923-934.
3. Bandelt H., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* – 1999. – vol. 16, № 1. – P.37-48.
4. Basten C.J., Asmussen M.A. The exact test for cytonuclear disequilibria. // *Genetics* – 97. – vol. 146, № 3. – P.1165-1171.
5. De Carvalho D., Ingvarsson P.K., Joseph J., Suter L., Sedivy C., Macaya-Sanz D., Cottrell J., Heinze B., Schanzer I., Lexer C. Admixture facilitates adaptation from standing variation in the European aspen (*Populus tremula* L.), a widespread forest tree. // *Mol. Ecol.* – 2010. – vol. 19, № 8. – P.1638-1650.
6. Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies // *Genetics* – 2003. – vol. 164, № 4. – P.1567-1587.
7. Fussi B., Bonello J., Calleja E., Heinze B. Combining the use of molecular techniques and archival documentary evidence to trace the origin of *Populus alba* in a Central Mediterranean archipelago // *Eur. J. For. Res.* – 2012. – vol. 131, № 2. – P.347-354.
8. Fussi B., Lexer C., Heinze B. Phylogeography of *Populus alba* (L.) and *Populus tremula* (L.) in Central Europe: secondary contact and hybridisation during recolonisation from disconnected refugia // *Tree Genet. Genomes* – 2010. – vol. 6, № 3. – P.439-450.
9. Fussi B. Phylogeography, flowering phenology and cytonuclear interactions of *Populus alba* and *P. tremula*. Dissertation. – Vienna: University of Vienna, Faculty of Life Sciences. – 2010. – 158 pp.
10. Heinze B. A database of PCR primers for the chloroplast genomes of higher plants. *Plant Meth.* – 2007. – vol 3, № 4.
11. Latta R.G., Linhart Y.B., Mitton J.B. Cytonuclear disequilibrium and genetic drift in a natural population of Ponderosa Pine. // *Genetics* – 2001. – vol. 158, № 2. – P.843-850.

12. Lexer C., Fay M.F., Joseph J.A., Nica M.-S., Heinze B. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression // Mol. Ecol. – 2005. – vol. 14, № 4. – P. 1045-1057.

13. Lexer C., Joseph J.A., van Loo M., Barbara T., Heinze B., Bartha D., Castiglione S., Fay M.F., Buerkle C.A. Genomic admixture analysis in European *Populus* spp. reveals unexpected patterns of reproductive isolation and mating // Genetics – 2010. – vol. 186, № 2. – P.699-712.

14. Sambrook J., Russell, D.W. Molecular Cloning. 3rd edition. – Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2001. – 2344 pp.

15. Tuskan G.A., DiFazio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., et al. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray) // Science – 2006. – vol. 313, № 5793. – P.1596-1604.

16. Van Loo M., Joseph J.A., Heinze B., Fay M.F., Lexer C. Clonality and spatial genetic structure in *Populus x canescens* and its sympatric backcross parent *P. alba* in a Central European hybrid zone // New Phytol. – 2008. – vol. 177, № 2. – P.506-516.

Summary

Populus tremula and *P. alba* are a pair of hybridizing species with contrasting evolutionary adaptations. Chloroplast and nuclear DNA markers indicated that hybridization extends beyond the first generation, but both species are well-defined by these markers. Linkage disequilibrium between nuclear markers and the chloroplast, or among nuclear markers, indicate that species are defined and “held together” by such associations among certain loci.

Populus tremula и *P. alba* – пара гибридизирующихся видов с различными эволюционными адаптациями. Хлоропластные (хпДНК) и ядерные ДНК-маркеры указывают на гибридизацию, идущую далее 1-го поколения, но виды четко различаются по этим маркерам. Неравновесие по сцеплению по ядерным и хпДНК-маркерам показывает, что виды разграничены и объединены по ассоциациям некоторых локусов.

Populus tremula і *P. alba* – пара гібридизуючих видів з відмінними еволюційними адаптаціями. Хлоропластні (хпДНК) та ядерні ДНК-маркери вказують на гібридизацію, що заходить далі ніж 1-ше покоління, але види чітко відрізняються за цими маркерами. Нерівновага за зчепленням за ядерними та хпДНК-маркерами показує, що види розмежовані і об'єднані за асоціаціями певних локусів.

ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., РОЖНОВА Н.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: apomixis@anrb.ru

SSAP И SCAR МАРКЕРЫ АПОМИКСИСА У ФОРМ *BOECHERA* СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE*

Апомиксис – это бесполое размножение цветковых растений семенами без участия генетической рекомбинации и сингамии (слияния мужской и женской гамет) [1–3]. Исследование молекулярных механизмов функционирования апомиксиса преследует главную мечту селекционеров – использовать апомиксис для закрепления гетерозиса в селекции важнейших сельскохозяйственных культур. Прикладное использование апомиксиса обещает экономические и социальные выгоды, превышающие выигрыш от «зеленой революции», решившей проблему голода во многих развивающихся странах. Так, только прибыль от мирового производства апомиктического риса оценивается более чем в 2.5 млрд. \$ в год [4]. Решение проблемы закрепления гетерозиса у основных хлебных злаков позволило бы увеличить их производство на 15 – 30% на уже освоенных площадях [5]. Это особенно актуально для Республики Башкортостан, в экономике которой велик удельный вес сельского хозяйства, при этом пахотные площади занимают 4 млн. га, а посевы зерновых и зернобобовых – более 2 млн. га.

Очевидно, для конструирования апомиксиса *de novo* соответствующие гены должны быть клонированы и секвенированы и на их основе созданы трансгенные растения. Однако вплоть до настоящего времени точные механизмы, контролирующие переход растений от полового на апомиктическое размножение остаются слабо понятыми [3, 5, 6]. Цель настоящей работы: представить и обсудить результаты собственных исследований, посвященных созданию мультилокусных SSAP и монолокусных SCAR маркеров апомиксиса.

Материалы и методы

В качестве объекта исследований использовали растения видового комплекса *Boecheera*, высокополиморфного таксона из семейства *Brassicaceae*, включающего как амфимиктические, так и апомиктические генотипы (табл.1). Видовой комплекс *Boecheera* – привлекательная система для изучения апомиксиса, поскольку это высоко полиморфный таксон, включающий как сексуальные, так и апомиктические формы, проявляющие апомиксис на разных уровнях пloidности, включая диплоидный $2n=2x=14$ (крайне ред-

кое явление при апомиксисе), триплоидный $2n=3x=21$ и тетраплоидный $2n=4x=28$.

Последовательности SSAP маркеров апомиксиса были использованы нами для дизайна SCAR праймеров. Дизайн SCAR праймеров для SCAR анализа выполняли, используя программы Oligo 4.0 и PrimerSelect, а сами праймеры синтезировали в фирме Синтол (Russia). ДНК секвенирующие реакции выполняли, используя ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов используя DNA ABI PRISM 310 sequencer. SCAR маркеры апомиксиса были протестированы с ДНК двух форм с половым размножением и одной формы с апомиктическим размножением. Специфическую амплификацию осуществляли на основе SCAR праймеров, заглубленных на 5 нуклеотидов с 5'- и 3'- концов. Условия специфической амплификации были следующими: $1 \times$ ПЦР коктейль содержал по 250 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов, по 10 пмоль каждого из праймеров и 2 ед. Taq-полимеразы. Профиль ПЦР: 94°C 2 мин – (94°C 45 с, 55°C 1 мин, 72°C 1 мин) \times 20 – 72°C 10 мин. Амплифицированные фрагменты фракционировали в 1.0–1.5% -ных агарозных гелях, которые окрашивали бромистым этидием. SCAR праймеры были также протестированы на других видах семейства *Brassicaceae* при мягких условиях ПЦР. Все наработанные фрагменты были выделены из геля и секвенированы. Если последовательность не была чистой, ПЦР продукт клонировали в pGem векторе и клоны секвенировали, чтобы оценить число аллелей.

Таблица 1.

Коллекция форм растений рода *Boechera* семейства *Brassicaceae* с бесполосемянным (Аро) и половым (Sex) способами размножения.

№№	Виды и формы	Способ размножения	Источник происхождения
Голландская коллекция			
1	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #36-1	Аро	Dr. Kim Boutilier, Plant Research International, Netherlands
2	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #6-3	Аро	
3	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #5-10	Аро	
4	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #4-2	Аро	
5	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #8-7	Аро	
6	<i>Arabis drummondii</i> 2x #10	Sex	
Немецкая коллекция			
7	<i>Arabis holboellii</i> Rc#1	Аро	Dr. Thomas Mitchell- Olds, Max Planck Institute of Chemical Ecology, Germany
8	<i>Arabis holboellii</i> cg#25	Аро	
9	<i>Arabis drummondii</i> 4	Sex	
10	<i>Arabis drummondii</i> 11	Sex	

Результаты и обсуждение

Понимание молекулярных механизмов наследования апомиксиса является важной предпосылкой для успешного использования его потенциала у сельскохозяйственных растений. Необыкновенно важная роль МГЭ в дизайне и функциональной активности геномов позволяет надеяться на их непосредственное участие в реализации полового и апомиктического размножения у растений [4]. Теоретической основой наших молекулярно-генетических исследований в области апомиксиса стала 0-гипотеза об активное участие МГЭ в реализации гаметофитного апомиксиса [4].

В ходе НИР 2008 – 2010 г.г. методом SSAP были обнаружены маркеры апомиксиса у бочечер: на основе non-LTR ретротранспозона, *Cin4a+Vtat* с размерами 220 п.о., 240 п.о. и 380 п.о., и маркер на основе ДНК транспозона, *Isaak+Vcaa* размером 230 п.о. Показано, что манифестация марке-

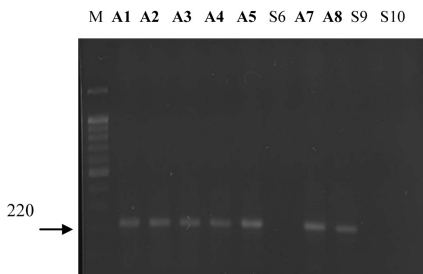


Рис. 1. Маркер апомиксиса *SCAR_Cin_220*. М – маркеры молекулярного веса. 1 – 10 – генотипы растений из коллекции растений, 1 – 6 – коллекционный материал из Нидерландов, 7 – 10 – коллекционный материал из Германии. А – генотипы растений *Boecheera holboellii* с апомиксисом (бесполое размножение). S – генотипы растений *Boecheera stricta* с амфимиксисом (половое размножение).

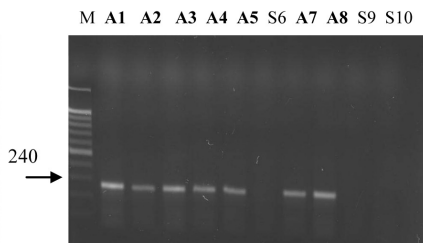


Рис. 2. Маркер апомиксиса *SCAR_Cin_240*. См. обозначения к рис. 1.

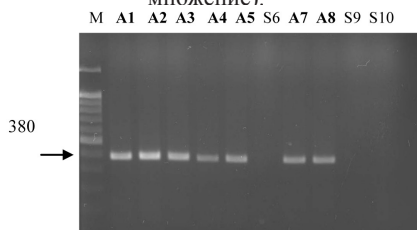


Рис. 3. Маркер апомиксиса *SCAR_Cin_380*. См. обозначения к рис. 1.

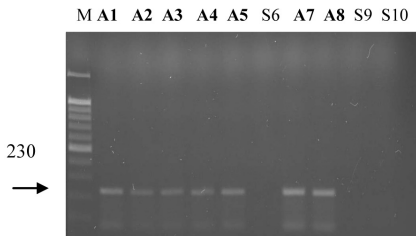


Рис. 4. Маркер апомиксиса *SCAR_Isaac_230*. См. обозначения к рис. 1.

ров апомиксиса, видимо, не связана с уровнем ploидности форм *Boecheera holboellii*. Исследована экспансия маркеров апомиксиса среди 50 объектов растительного происхождения с апомиксисом и амфимиксисом из семейств *Brassicaceae*, *Crassulaceae* и *Poaceae*. Так, предварительные маркеры апомиксиса Cin4a+Vtat размером 220 п.о. и 240 п.о. обнаружены также у ряда половых форм *Brassicaceae*, а маркер Isaak+Vcaa размером 230 п.о. обнаружены только у форм *Boecheera holboellii* с бесполосеменным размножением. Осуществлено независимое многократное секвенирование молекулярных маркеров, ассоциированных с апомиксисом. Установлено сходство фрагмента Cin4a+Vtat размером 220 п.о. в генобанке с 5 последовательностями (гомология 85 – 93%). Обнаружено сходство фрагмента Cin4a+Vtat размером 240 п.о. в генобанке с 9 последовательностями арабидопсиса (гомология 91%). Установлено сходство фрагмента Cin4a+Vtat размером 380 п.о. в генобанке с короткими последовательностями до 20 нуклеотидов. Существенной гомологии не выявлено. Обнаружено сходство фрагмента Isaak+Vcaa размером 230 п.о. в генобанке с 2 последовательностями (гомология 100%).

В 2011 г. на основе четырех мультилокусных SSAP маркеров были созданы четыре монолокусные SCAR маркеры апомиксиса: SCAR_Cin_220 (рис. 1), SCAR_Cin_240 (рис. 2), SCAR_Cin_380 (рис. 3) и SCAR_Isaac_230 (рис. 4). Начато контрольное секвенирование полученных SCAR маркеров апомиксиса. Показано совпадение нуклеотидных последовательностей мультилокусных SSAP маркеров и монолокусных SCAR маркеров. Для SCAR маркеров апомиксиса показана возможная гемизиготность (существование генетического локуса в виде единственного аллеля у апомиктичных генотипов). Сконструированные SCAR маркеры апомиксиса будут использованы для выделения и идентификации геномных локусов, вовлеченных в реализацию апомиксиса. Таким образом, предварительные данные могут свидетельствовать в пользу гипотезы о транспозонной природе апомиксиса у цветковых растений, в частности у форм *Boecheera holboellii*.

Таким образом, в ходе реализации заявленного проекта в 2011 году осуществлена конвертация полученных SSAP маркеров в SCAR маркеры. В 2012-2013 годах будет проведен скрининг и выделение геномных последовательностей, ассоциированных с апомиксисом у боечер, а затем проведен анализ геномного распределения и филогенетических взаимоотношений ДНК последовательностей среди видов рода *Boecheera* и апомиктов из других таксонов. В перспективе выполнение настоящего проекта позволит перейти к прямому поиску и функциональному анализу генов-кандидатов, а затем и позиционному клонированию основных элементов коадаптивного геномного комплекса, контролирующего гаметофитный апомиксис.

Выводы

1. Подобраны SCAR праймеры к концевым последовательностям SSAP маркеров апомиксиса. SCAR праймеры получены удлинением SSAP

маркеров на 5 нуклеотидов с обоих концов. Оптимизированы условия для гнездовой амплификации SCAR–ПЦР.

2. На основе подобранных SCAR праймеров были получены SCAR маркеры апомиксиса: SCAR_Cin_220, SCAR_Cin_240, SCAR_Cin_380 и SCAR_Isaak_230. Начато контрольное секвенирование полученных SCAR маркеров апомиксиса.

3. Осуществлена пробная амплификация SCAR маркеров с препаратами ДНК из видов с половым размножением (*Boechea stricta* и *Arabidopsis thaliana*) и апомиксисом (*Boechea holboellii*).

4. Показана возможная гемизиготность полученных маркеров апомиксиса SCAR_Cin_220, SCAR_Cin_240, SCAR_Cin_380 и SCAR_Isaak_230

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 11-04-97039 р_поволжье_а, 12-04-00117-а и 12-04-01854-а).

Литература

1. Хохлов С.С. Апомиксис: классификация и распространение у покрытосеменных растений // Успехи современной генетики. 1967. Т. 1. С. 43 – 105.

2. Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic control of gametophytic apomixis: current status of knowledge // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. 2004. Section B. V.58. № 5/6. P. 167 – 174.

3. Ozias-Akins P., van Dijk P.J. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants // Annu. Rev. Genet. 2007. V. 41. P. 509 – 537.

4. McMeniman S. and Lubulwa G. Project Development Assessment: An Economic Evaluation of the Potential Benefits of Integrating Apomixis into Hybrid Rice. // Working Papers WP28. 1997. <http://www.aciar.gov.au/downloads/publications/Workingpapers/wp28/wp28.pdf>

5. Соколов В.А. Будет ли следующая «зеленая революция»? // Наука и жизнь. 2003. №3. С. 25 – 31.

6. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А. Мобильные генетические элементы в эволюции пола у растений // Генетика. 2010. Т.46, № 11. С. 1445–1457.

Резюме

На основе мультилокусных SSAP маркеров апомиксиса были получены монолокусные SCAR маркеры: SCAR_Cin_220, SCAR_Cin_240, SCAR_Cin_380 и SCAR_Isaac_230, для которых показана возможная гемизиготность (существование генетического локуса в виде единственного аллеля). Созданные SCAR маркеры будут использованы в качестве гибридационных проб для выделения и идентификации генов апомиксиса.

On the basis of multiloci SSAP markers of apomixis, monolocus SCAR markers: SCAR_Cin_220, SCAR_Cin_240, SCAR_Cin_380 and SCAR_Isaac_230 have been received. Probable hemizygous (existence of a genetic locus in the form of the only single allele) of the created apomixis markers was shown. Created SCAR markers will be used as the probes for the isolation and identification of apomixis genes.

ГРИШИН С.Ю., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я.

Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского,
Россия, 241000, Брянск, ул. Бежицкая, 14, e-mail: greyxxxx@mail.ru

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДНК-МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТРАКНОЗУ ANTJM1, ANTJM2 У РОССИЙСКИХ И БЕЛОРУССКИХ СОРТОВ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* (L.))

Антракноз является одним из самых вредоносных заболеваний, поражающим представителей рода *Lupinus*, способным в годы эпифитотий значительно снижать показатели урожая [6]. Болезнь вызывается патогенными грибами *Colletotrichum lupini* [4], разновидности которых инфицируют, широко используемые в мировом сельскохозяйственном производстве виды люпина – узколистный (*Lupinus angustifolius* (L.)), желтый (*Lupinus luteus* (L.)) и белый (*Lupinus albus* (L.)). Благодаря наличию сортов, обладающих относительно высокой устойчивостью к антракнозу, узколистный люпин в настоящее время более распространен по сравнению с другими культурными видами этого рода [2].

В Австралии, где узколистный люпин занимает крупнейшие в мире сельскохозяйственные площади, два сорта, Wonga и Tanjil, имеющие одинаковое происхождение, проявляют высокую устойчивость к антракнозу. Австралийскими генетиками и селекционерами было выявлено, что устойчивость этих сортов к возбудителю антракноза контролируется одним доминантным геном – *Lanr1* [5]. Методами на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) были разработаны два кодоминантных ДНК-маркера, сцепленных с геном *Lanr1* – AntjM1 и AntjM2. Маркер AntjM1 оказался не достаточно эффективен, так как он выявляет «ложный» устойчивый аллель в некоторых сортах, которые проявляют неустойчивость на инфекционных фонах. Маркер AntjM2, как более надежный, используется в австралийской программе селекции люпина узколистного на резистентность к антракнозу [7].

С помощью маркеров AntjM1 и AntjM2 можно оценить наличие аллеля устойчивости к антракнозу гена *Lanr1* в российских и белорусских сортах люпина узколистного. Использование достижений современной молекулярной генетики при скрещивании и отборе селекционного материала может существенно ускорить создание новых высокоустойчивых к антракнозу сортов и гибридов люпина. Генотипы, в которых будут присутствовать один или несколько неаллельных генов устойчивости к антракнозу, должны проявлять более высокую фенотипическую резистентность к инфекции [3].

Цель настоящей работы заключалась в исследовании маркерных аллелей AntjM1, AntjM2, сцепленных с геном *Lanr1* устойчивости к антракнозу, у 14 сортов люпина узколистного российской и белорусской селекции.

Материалы и методы

В исследовании использовали семена семи российских сортов: Радужный, Сидерат 38, Смена, Кристалл, Снежить, Белозерный 110, Надежда, а также двух австралийских сортов Kalya и Wonga (селекционный материал ВНИИ люпина РАСХН). Кроме того, для изучения были выбраны семена семи белорусских сортов люпина узколистного: Гелена, Миртан, Митан, Першачвет, Прывабны, Хвалько, Ян (селекционный материал научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию).

Для каждой из трех повторностей ПЦР-анализа геномную ДНК выделяли из отдельного семени. Экстракцию проводили 2% SDS в STE буфере. Депротеинизацию осуществляли смесью фенол/хлороформ (1:1). Препараты нуклеиновых кислот осаждали этиловым спиртом, высушивали и растворяли в дистиллированной воде. Полученный раствор обрабатывали РНКазой [1]. Определение концентрации и качества выделенной ДНК осуществляли по флюоресценции включенного бромистого этидия после электрофоретического разделения в агарозном геле.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Использовали ферменты и реактивы фирмы «СибЭнзим» (Россия). Праймеры синтезировались фирмой «Синтол» (Россия).

Применяли сайт-специфичные праймеры на маркеры AntjM1 (AntjM1MS: 5'-CATCCTCACATATGAAGC-3', AntjM1SR: 5'-AAACCCATTGTTGTTGTTG-3') и AntjM2 (AntjM2P1: 5'-TCATCTCTAAATCCTATCTCAG-3', AntjM2P2: 5'-GTAGAAAATATCATTCAGAAAAG-3'), разработанные авторами [5, 7].

Состав реакционной смеси объемом 10 мкл.: 5-10 нг геномной ДНК, 0,25 мкМ каждого праймера, 0,5 ед. Taq-полимеразы E 338, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTPs, 1 мкл B321 AS буфера (67мМ Tris-HCl (pH8,8 при 25°C), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween-20).

Условия амплификации: начальная денатурация при 94 °C – 2 минуты; 30 циклов: денатурация при 94 °C – 30 сек., отжиг (52 °C для праймеров на маркер AntjM1 и 54 °C для праймеров на маркер AntjM2) – 30 сек., элонгация при 72 °C – 30 сек. Заключительная элонгация при 72 °C – 5 минут.

Разделение фрагментов ДНК проводили в 8% нативном полиакриламидном геле с использованием камеры для вертикального электрофореза «VE-20» (Хеликон, Россия). Продукты ПЦР разделяли в течение 4-4,5 часов при напряжении 270-300 вольт. Гель помещали в раствор бромистого этидия (концентрация 0,5 мг/л) на 20-30 минут. После окрашивания и визуализации на сканере гелей GelDocXR (BioRad, США) длины маркерных аллелей рассчитывали с помощью программы QuantityOne, поставляемой вместе со сканером гелей. Для оценки размера продуктов ПЦР применяли фрагменты маркеров M 19, M 07 («СибЭнзим»). В качестве основного контроля для определения длины маркерных аллелей использовали продукты

ПЦР с ДНК сорта Wonga, длина которых была определена австралийскими исследователями секвенированием [5, 7].

Результаты и обсуждение

С ДНК каждого из сортов люпина узколистного, включенных в исследование, были получены маркерные фрагменты, длины которых воспроизводились во всех трех повторностях ПЦР-анализа. Одному сорту соответствовал единственный маркерный аллель. Соответствующие гетерозиготным генотипам сочетания в одном продукте ПЦР нескольких аллелей одного и того же кодоминантного маркера в исследованных образцах ДНК люпина не выявлены.

Следует особо отметить, что представленные в исследовании длины маркерных аллелей AntjM1, AntjM2 имеют приближенное значение, рассчитанное на основе сопоставления между подвижностью фрагментов ДНК различной длины в ПААГе, что менее точно и информативно, по сравнению с определением длины фрагмента в ходе секвенирования нуклеотидного состава последовательности ДНК.

Результаты анализа маркерных аллелей AntjM1 для исследованных сортов представлены на рисунке 1.

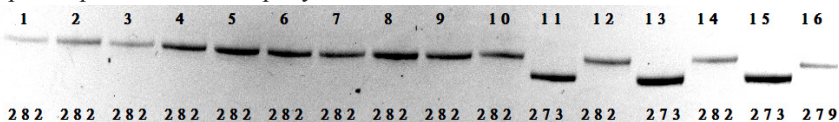


Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами AntjM1MS и AntjM1SR для ДНК сортов: 1-Радужный, 2-Сидерат 38, 3-Смена, 4-Кристалл, 5-Снежить, 6-Белозерный 110, 7-Надежда, 8-Прывабны, 9-Першацвет, 10-Митан, 11-Гелена, 12-Миртан, 13-Хвалько, 14-Ян, 15-Kalya, 16-Wonga.

Внизу указаны длины фрагментов ДНК в парах нуклеотидов.

При использовании в ПЦР праймеров AntjM1MS и AntjM1SR для сортов Радужный, Сидерат 38, Смена, Кристалл, Снежить, Белозерный 110, Надежда, Миртан, Митан, Першацвет, Прывабны, Ян был получен ДНК-фрагмент одинаковой длины (282 пары нуклеотидов). Разница с длиной маркерного аллеля сорта Wonga (279 п.н.) составила 3 пары нуклеотидов. Сортам Гелена, Хвалько, Kalya был определен ДНК-фрагмент, который отличался по длине от двух других аллелей на 9 и 6 пар нуклеотидов соответственно и составлял 273 п.н.

По литературным данным известно, что в состав ДНК-маркера AntjM1 входит микросателлитная последовательность $(TTG)_n$. Устойчивому аллелю соответствует $(TTG)_6$. Восприимчивых аллелей может быть два: один содержит в своем составе последовательность $(TTG)_4$, а другой – $(TTG)_7$. То есть восприимчивый аллель AntjM1 может быть на 3 п.н. длиннее или на 6 п.н. короче устойчивого аллеля [5, 8]. Поэтому фрагменты ДНК длиной

282 п.н. и 273 п.н. были идентифицированы как восприимчивые маркерные аллели, а фрагмент длиной 279 п.н. – как устойчивый.

Результаты анализа маркерных аллелей *AntjM2*, для исследованных сортов представлены на рисунке 2.

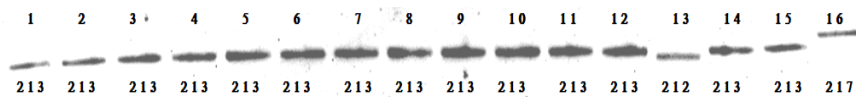


Рисунок 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами *AntjM2P1* и *AntjM2P2* для ДНК сортов: 1-Радужный, 2-Сидерат 38, 3-Смена, 4-Кристалл, 5-Снежить, 6-Белозерный 110, 7-Надежда, 8-Ян, 9-Гелена, 10-Першацвет, 11-Митан, 12-Прывабны, 13-Миртан, 14-Хвалько, 15-Kalya, 16-Wonga. Внизу указаны длины фрагментов ДНК в парах нуклеотидов.

Для большинства сортов были выявлены фрагменты ДНК длиной 213 п.н., соответствующие восприимчивому аллелю маркера *AntjM2*. ДНК-маркер, сцепленный с геном *Lanr 1* устойчивости к антракнозу, был получен только для сорта Wonga (217 п.н.). Для сорта Миртан был выявлен восприимчивый аллель длиной 212 пар нуклеотидов.

По данным австралийских исследователей для последовательности ДНК-маркера *AntjM2*, полученного с праймерами *AntjM2P1* и *AntjM2P2*, известно три восприимчивых аллеля и один устойчивый, характерный для сортов Wonga и Tanjil. Длина устойчивого аллеля составляет 217 пар нуклеотидов. Восприимчивые аллели короче устойчивого, длина их составляет 216 п.н, 213 п.н. и 212 п.н. Они образуются из последовательности устойчивого аллеля в результате делеций: одного нуклеотида Т (216 п.н.), последовательности ТТАС (213 п.н.), либо Т и ТТАС (212 п.н.) [8].

Таким образом, в настоящей работе не обнаружены устойчивые аллели ДНК-маркеров *AntjM1*, *AntjM2* в исследованных российских и белорусских сортах люпина узколистного. На основании наличия восприимчивых маркерных аллелей можно предположить отсутствие у сортов Радужный, Сидерат 38, Смена, Кристалл, Снежить, Белозерный 110, Надежда (русской селекции) и сортов Гелена, Миртан, Митан, Першацвет, Прывабны, Хвалько, Ян (белорусской селекции) аллеля гена *Lanr 1*, контролирующего устойчивость к антракнозу сортов Wonga и Tanjil.

Выводы

По результатам, полученным после ПЦР-анализа ДНК в трехкратной повторности, можно сделать вывод о том, что в генотипах исследованных сортов российской и белорусской селекции, отсутствуют устойчивые маркерные аллели *AntjM1*, *AntjM2*, сцепленные с геном *Lanr1* устойчивости к антракнозу.

ДНК сортов Радужный, Сидерат 38, Смена, Кристалл, Снежить, Белозерный 110, Надежда, Митан, Першацвет, Прывабны, Ян содержат воспри-

имчивые аллели по двум маркерам AntjM1 и AntjM2 длиной 282 п.н. и 213 п.н. соответственно.

ДНК сортов Гелена, Хвалько, Kalya имеют восприимчивый аллельный фрагмент маркера AntjM1 длиной 273 п.н. и восприимчивый маркерный аллель AntjM2 – 213 п.н.

ДНК сорта Миртан содержат восприимчивый аллель маркера AntjM1 длиной 282 п.н. и восприимчивый аллельный фрагмент маркера AntjM2 длиной 212 п.н.

ДНК сорта Wonga единственная в исследовании, для которой были получены устойчивые аллели по двум маркерам AntjM1 и AntjM2 – соответственно 279 п.н. и 217 п.н.

Литература

1. Дрейпер Дж. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: пер. с англ. / Дж. Дрейпер [и др.] – Москва. – 1991. – 408 с.

2. Краевская В.А. Особенности развития антракноза на узколистом люпине // Биология и совершенствование агротехники сельскохозяйственных культур. – 2010. – № 11 – С. 70-72.

3. Куницын, Н.С., Такунов И.П. Люпин. Генетика, селекция, гетерогенные посевы. – Клинцы. – 2006. – 576 с.

4. Nirenberg, H.I. Description of *Colletotrichum lupini* comb. Nov. in modern terms / H.I. Nirenberg, U. Feiler, G. Hagedorn // Mycologia. – 2002. – Vol. 94. – P. 307-320.

5. Yang, H. Development and implementation of a sequence-specific PCR marker linked to a gene conferring resistance to anthracnose disease in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) / H. Yang [et al.] // Mol. Breed. – 2004. – Vol.14. – P. 145-151.

6. Yang, H., Sweetingham, M.W. The taxonomy of *Colletotrichum* isolates associated with lupin anthracnose // Aust. J. Agric. Res. – 1998. – Vol. 49. – P. 1213-1223.

7. You, M. A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding / M. You [et al.] // Cellular and molecular biology letters. – 2005. – Vol. 10. – P. 123–134.

8. Anthracnose Resistance / Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture // The University of Western Australia. Дата обновления: 2.03.2012. URL: <http://www.clima.uwa.edu.au/921966> (дата обращения: 14.03. 2012)

Резюме

Выявлены аллели ДНК-маркеров AntjM1 и AntjM2 для 14 сортов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* (L.)) российской и белорусской селекции. В настоящем исследовании не обнаружены маркерные аллели, соответствующие наличию гена *Lanr1* устойчивости к антракнозу.

There was investigated allelic polymorphism of sequence-specific markers AntjM1 and AntjM2 from DNA of 14 cultivars narrowleaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Russian and Belorussian selection. Resistance marker bands AntjM1, AntjM2 have not been revealed.

ДУПЛИЙ В.П., МАТВЕЕВА Н.А., ШАХОВСКИЙ А.М., КИЩЕНКО Е.М.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: jojna56@gmail.com

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *rbcL* МОХООБРАЗНЫХ АНТАРКТИКИ *SANIONIA GEORGICOUNCINATA* И *WARNSTORFIA* *FONTINALIOPSIS*

Прошло не так много времени, с тех пор, как П. Хеберт предложил использовать короткую стандартную последовательность ДНК для идентификации видов [1, 2]. В настоящее время в международном проекте Barcode of Life, направленном на разработку универсального способа идентификации живых организмов, уже участвует более 40 стран. Такая популярность объясняется невероятными успехами в видовой идентификации животных по последовательности гена цитохром С оксидазы I (*coxI*). Однако для растений использование именно ДНК неприменимо, что заставляет искать другие стандартные последовательности или их комбинации. Для мохообразных задача осложняется как малым объемом накопленных данных, так и необходимостью оптимизации ряда молекулярно-биологических процедур. Нами предпринята попытка определить, возможна ли идентификация двух видов мохообразных, собранных на антарктическом острове Галиндез и культивируемых в *in vitro* коллекции, *Sanionia georgicouncinata* (Müll. Hal.) Ochyra & Hedenas и *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochyra, по последовательности гена *rbcL*.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили культивируемые *in vitro* растения *W.fontinaliopsis* и *S. georgicouncinata*. Для выделения общей ДНК использовали ранее оптимизированную нами методику. При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры, специфичные гену *rbcL*, предложенные Kress W.J. и Erickson D.L. (2007) [3]. Секвенирование последовательности гена проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

Результирующий контиг секвенирования получали сравнением прямой и обратнoкомплементарной последовательностей, используя программу CLC Main Workbench (CLC bio). Гомологичные последовательности подбирали из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Автоматическое выравнивание, подсчет количества замен на сайт и построение дерева методом максимального правдоподобия проводилось в программе MEGA5 (MEGA Software Development Team). Многомерное шкалирование было выполнено в среде программирования R (The R Foundation for Statistical Computing).

Результаты и обсуждение

Среди участков – кандидатов на использование в ДНК-штрихкодировании наиболее изученным для мохообразных является хлоропластный ген *rbcL* (более сотни записей в Генбанке). Кроме того, в 2009 году [4] CBOL Plant Working Group предложила использовать фрагменты генов *rbcL* и

matK в качестве стандартных. В той же работе отмечалась высокая разрешающая способности *rbcL* (87%) для криптогам даже при самостоятельном использовании. Совокупность этих фактов определила наш выбор гена *rbcL* для изучения возможности использовать его для видовой идентификации мхов Антарктики.

В работе использовали выращиваемые в стерильных условиях растения, что исключало возможное присутствие в образцах ДНК других видов, поскольку мохообразные в Антарктике часто произрастают в тесных сообществах нескольких видов. Результаты секвенирования последовательности гена *rbcL* для двух видов мохообразных приведены в таблице.

Таблица.

Последовательности секвенированных фрагментов генов *rbcL* растений *W.fontinaliopsis* (образец №7) и *S. georgicouninata* (образец №8).

№ образца	Последовательность нуклеотидов
7	САААСАGАGАCТAААGСAGGТGТТGGАТТAАAGСТGGТGТTААAGАТ TACAGATTAACCTATTACTCCAGATTATCAGACTAAAGAACTGATAT TTTAGCAGCATTTGGAATGACTCCTCAACCAGGAGTACCAGCTGAAGA GGCAGGAGCGCAGTAGCTGCGGAATCTTCCACTGGTACATGGACTAC TGTTTGGACTGATGGACTTACTAGTCTTGATCGTTATAAAGGACGATGCT ATGATATTGAAGCAGTTCCTGGAGAAGATAATCAATATATTGCTTATGTT GCTTACCCATTAGATTTATTTGAAGAAGGTTCTGTTACCAATTTATTTAC TTCTATTGTTGGTAATGTTTTGGATTTAAAGCTTTACGAGCTTTACGCT AGAAGATTTACGTATTCCTCCAGCTTATTCAAAACCTTTCCAAGGCCCA CCTCATGGTATTCAAGTTGAAAGAGATAAATTAATAAATATGGTCGTCC CATTATTAGGATGCACTATTAAGCCAAAATTAGGTTTATCTGCTAAAAAC TATGGTAGAGCTGTATATGAATGTCTTCGTGGTGGACTTGATTTCAAAA AGATGATGAAAACGTAAATTCTCAGCCTTTTATGCGTTGGAGAGATCGA TTCTTATTTG
8	САААСАGАGАCТAААGСAGGТGТТGGАТТAАAGСТGGТGТTААAGАТ TACAGATTAACCTATTACTCCAGATTATCAGACTAAAGAACTGATAT TTTAGCAGCATTTGGAATGACTCCTCAACCAGGGGTACCCGCTGAAGA GGCAGGAGCTGCAGTAGCTGCGGAATCTTCCACTGGTACATGGACAAC TGCTGGACTGATGGACTTACCAGTCTTGATCGTTATAAAGGACGATGC TATGATTTGAAGCAGTTCCTGGAGAAGAGAATCAATATATTGCTTATGT TGCTTACCCATTAGATCTATTTGAAGAAGGTTCTGTTACCAATTTATTTAC TTCTATCGTTGGTAATGTTTTGGATTTAAAGCTTTACGAGCTTTACGCT AGAAGATTTACGTATTCCTCCAGCTTATTCAAAACCTTTCCAAGGCCCA CCTCATGGTATTCAAGTTGAAAGAGATAAATTAATAAATATGGTCGTCC ATTATTAGGATGTAATTAACCAAAAATTGGGTTTATCTGCTAAAAACT ATGGTAGAGCTGTATATGAATGTCTTCGTGGTGGACTTGATTTCAAAA AGATGATGAAAATGTAATTTCTCAACCTTTTATGCGTTGGAGAGATCGA TTCTTATTTG

Ранее нами было установлено, что, как для сосудистых, так и для мохообразных растений Антарктики используемые праймеры дают единственный репликон размером до 750 п.н., а полученные последовательности не нуждаются в ручном выравнивании, что соответствует требованиям для фрагментов ДНК, используемых в штрихкодировании.

Полученные сиквенсы гена *rbcL* были сопоставлены с имеющимися в Генбанке его последовательностями для мохообразных. Всего сравнивали 81 последовательность, включая секвенированные нами, но для большей наглядности на рис. 1 и 2 представлены интерпретации генетических расстояний только ближайшего окружения изучаемых образцов. Не показан довольно плотный изолированный кластер представителей нескольких родов семейства Врусеев.

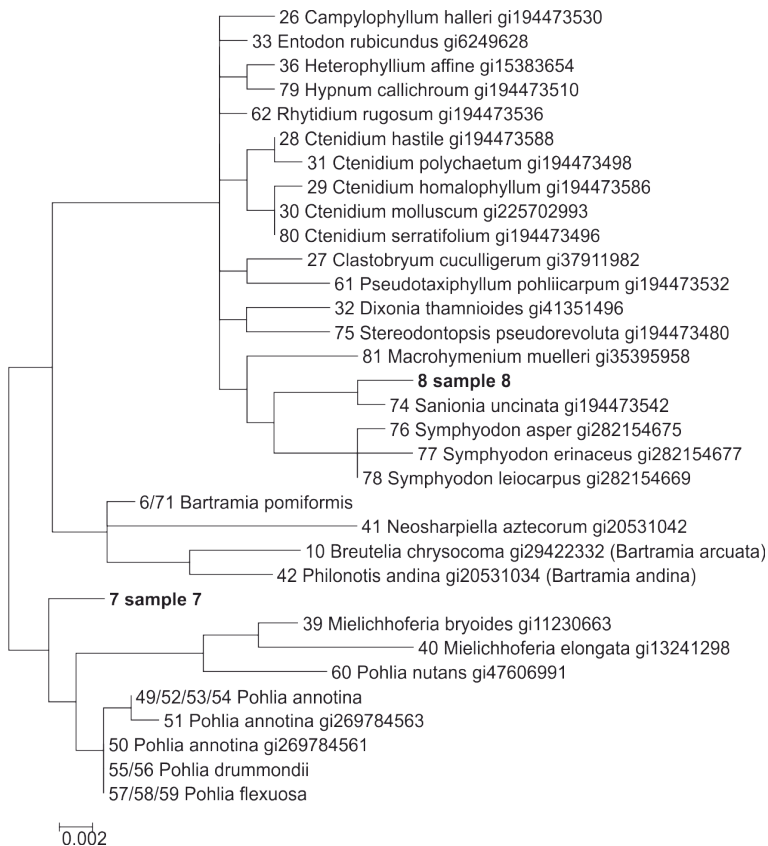
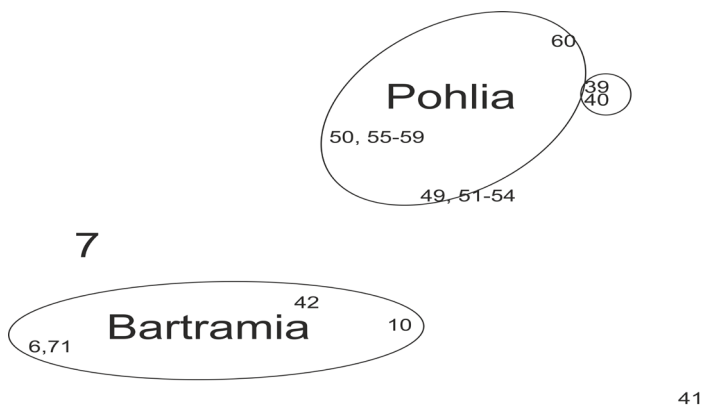


Рис. 1 – Дерево генетических расстояний между последовательностями гена *rbcL* мхов, построенное методом максимального подобия: 7 – определенная нами последовательность для *W. fontinaliopsis*, 8 – для *S. georgicouninata*



Нурпnum, Symphyodon и др.

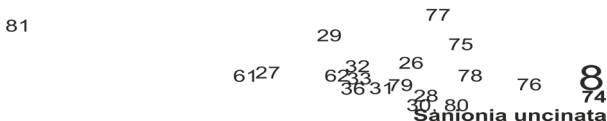


Рис. 2. Генетические расстояния, представленные в двухмерном пространстве методом многомерного шкалирования: 1–81 – последовательности из Генбанка, принимавшие участие в сравнении (см. рис.1), 7 и 8 – сиквенсы растений *W. fontinaliopsis* и *S. georgicouncinata* соответственно).

На момент написания статьи в Генбанке не было сиквенсов гена *rbcL* для изучаемых видов. Сиквенс *rbcL* исследуемого нами образца *S. georgicouncinata* оказался наиболее гомологичным последовательности того же гена единственного представителя своего рода – *S. uncinata*, а также других растений семейства. *W. fontinaliopsis*, также относящаяся к *Amblystegiaceae*, находится в отдалении от представителей своего семейства. То же наблюдали и для рода *Pohlia*, удаленного от остальных родов *Bryaceae*.

Для однозначного определения вида достаточно, чтобы его представители имели одну или несколько уникальных последовательностей определенного участка ДНК. Для наших образцов (№№ 7 и 8), как и для большинства приведенных на рисунках, это правило выполняется, т.е. данные

виды, вероятно, могут быть идентифицированы только по последовательности гена *rbcL*.

Однако, определение видов с использованием только одного участка ДНК не всегда возможно. Так, например, для образцов 30 и 80 (рис.1, *Stenidium molluscum* и *C. serratifolium*), как и для представителей рода *Pohlia*, одной последовательности могут соответствовать два и более видов одного рода. Следует отметить, что для других представителей семейства Врусееа, куда входит и род *Pohlia*, наблюдается еще меньшее генетическое разнообразие по участку *rbcL*, например, одной последовательности ДНК может соответствовать 14 видов, относящихся к четырем родам. В связи с этим предложение ряда исследователей использовать одновременно несколько стандартных последовательностей может быть актуально и для мохообразных.

Выводы

Определены последовательности гена *rbcL* антарктических мхов *W. fontinaliopsis* и *S. georgicouninata* с использованием культивируемых *in vitro* растений. Полученные сиквенсы отличаются от известных последовательностей гена *rbcL* других видов, что позволяет использовать этот участок хлоропластной ДНК для однозначной идентификации растений указанных видов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального антарктического научного центра.

Литература

1. Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. et al. Biological identifications through DNA barcodes. // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2003a. – vol. 270. – P. 313–322.
2. Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., deWaard, J.R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2003b. – vol.270(Suppl.). –P. S596–S599.
3. Kress W.J., Erickson D.L. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region// PLoS ONE. – 2007. – vol. 2, № 6. – e508.
4. Hollingsworth P. M., Forrest L. L., Spouge J. L. et al. A DNA barcode for land plants // PNAS. – 2009. – vol.106, № 31. – P. 12794–12797.

Резюме

Проведено секвенирование гена *rbcL* антарктических мхов *Warnstorfia fontinaliopsis* и *Sanionia georgicouninata* с использованием культивируемых *in vitro* растений. Полученные последовательности на настоящий момент можно считать уникальными, что позволяет использовать этот участок хлоропластной ДНК для идентификации растений указанных видов.

Проведено секвенування гена *rbcL* антарктичних мохів *Warnstorfia fontinaliopsis* та *Sanionia georgicouninata* з використанням культивованих *in vitro* рослин. Отримані послідовності на теперішній час можна вважати унікальними, що дозволяє використовувати цю ділянку хлоропластної ДНК для ідентифікації рослин зазначених видів.

The *rbcL* gene sequencing of Antarctic mosses *Warnstorfia fontinaliopsis* and *Santonia georgicouncinata* cultivated *in vitro* were analyzed. These sequences are unique which allows to determine indicated above species by *rbcL* gene nucleotide sequence.

**КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ЛЕВИНА Т.А.,
КРИНИЦЫНА А.А., ЖУЧЕНКО А.А.***

ГНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН,

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, e-mail: recombination@iab.ac.ru

**Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,*

Россия, 119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, ГСП 1

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ И ИНТРОГРЕССИИ ГЕНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЖВИДОВЫХ ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАЗУ *RECA ESCHERICHIA COLI*

Традиционная селекция растений - наиболее простой и надежный способ создания новых сортов, в чем можно убедиться, ознакомившись с «Государственным реестром селекционных достижений, допущенных к использованию», который ежегодно публикуется Государственной комиссией Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений. Согласно этому документу практически все отечественные и многие зарубежные сорта получены классическими методами, а именно гибридизацией и последующим отбором в потомстве гибридов форм, сочетающих комплекс хозяйственно-ценных генов.

Центральным элементом комбинативной схемы селекции является мейотическая рекомбинация (кроссинговер) у гибридов, которая создает биологическое разнообразие в их потомстве и обеспечивает правильную сегрегацию гомологичных хромосом в профазе I мейоза. Однако генетические ограничения, накладываемые параметрами молекулярного процесса кроссинговера в мейозе, не позволяют полностью использовать весь потенциал генетической изменчивости, имеющийся у гибридов. Эта проблема усугубляется при вовлечении в скрещивания дикорастущих видов растений, которые являются донорами новых хозяйственно-ценных генов. У отдаленных гибридов подавление кроссинговера в профазе I мейоза нередко нарушает сегрегацию гомеологичных хромосом, ограничивает интрогрессию генов из хромосом дикорастущих видов в хромосомы культурных растений и может приводить к стерильности. Разработка методов индукции мейотической рекомбинации между гомеологичными хромосомами является актуальной задачей современной генетики, селекции и биотехнологии растений.

В соматических клетках растений табака экспрессия гена *recA E. coli* усиливала количество сестринских хроматидных обменов [1, 2]. В мейозе у внутривидовых гибридов томата экспрессия гена *recA E. coli* увеличивала частоту кроссинговера между гомологичными хромосомами и повышала долю рекомбинантных генотипов в фенотипической структуре их потомства [3]. Эти результаты позволили нам предположить, что экспрессия гена *recA* в клетках межвидовых гибридов растений может улучшить их фертильность или повысить интрогрессию генетического материала из хромосом дикорастущих видов в хромосомы культурных растений.

Материалы и методы

Нетрансгенные растения культурного томата (*Solanum lycopersicum*), содержащие во второй хромосоме рецессивные маркерные гены *wwwv*, *dd* и *awaw*, а также их трансгенные аналоги, экспрессирующие ген *recA E. coli* получены нами ранее [3]. Дикорастущие представители томатов *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrochaites* содержали во второй хромосоме маркерные доминантные гены *WvWv*, *AwAw* и *DD*. Молекулярно-биологический анализ растений F₁ проводили методами ПЦР, с использованием разработанных ранее праймеров [4].

Результаты и обсуждение

У томатов существуют репродуктивные барьеры, которые ограничивают или полностью подавляют межвидовую гибридизацию, особенно когда в качестве материнских форм применяются дикорастущие самонесовместимые виды. При использовании в качестве материнских форм растений культурного томата вероятность получения межвидовых гибридов существенно возрастает [5]. Поэтому для получения отдаленных гибридов нами было проведено опыление маркерных нетрансгенных и трансгенных, экспрессирующих ген *recA E. coli*, растений культурного томата (*S. lycopersicum*) пылью четырех дикорастущих видов томатов *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, *S. cheesmaniae*, *S. pimpinellifolium* и *S. habrochaites*.

В результате межвидовой гибридизации в трех комбинациях скрещиваний были получены плоды, содержащие зрелые семена (табл. 1). Все первые плоды, полученные при опылении пылью *S. habrochaites*, оказались бессемянными, а остальные содержали разбухшие и нежизнеспособные проростки (табл. 1).

Для комбинации скрещиваний F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*) в настоящее время не удалось создать нетрансгенные гибриды F₁ (*S. lycopersicum* x *S. pimpinellifolium*) без которых проведение сравнительного анализа не представляется возможным.

Поскольку все материнские растения *S. lycopersicum* были с рецессивными генами (*wwwv awaw dd*), а все полученные межвидовые гибриды имели фенотип (*Wv- Aw- D-*), т.е. проявляли признаки дикорастущего вида-опылителя (*WvWv AwAw DD*), то это гарантировало их гибридность. Межви-

довые гибриды в одной комбинации скрещивания, как трансгенные, так и нетрансгенные, морфологически друг от друга не отличались.

Молекулярно-биологический анализ ДНК гибридов F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) и F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*) показал, что все 28 растений содержат в геноме последовательность целевого гена *recA* (рис. 1).

Таблица 1.

Количество межвидовых гибридов в различных комбинациях скрещиваний.

Комбинация скрещивания	Целевой ген	Количество семян F ₁ , шт.	
		Получено	Проросло
<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	<i>recA</i>	60	12
	-	40	10
<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. cheesmaniae</i>	<i>recA</i>	83	16
	-	25	10
<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. pimpinellifolium</i>	<i>recA</i>	58	15
	-	0	-
<i>S. lycopersicum</i> x <i>S. habrochaites</i>	<i>recA</i>	0	-
	-	0	-

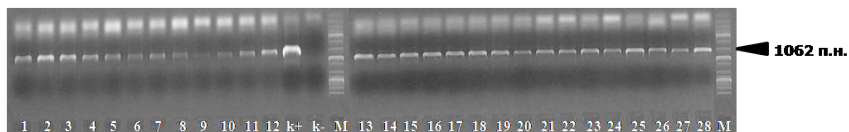


Рис. 1. Амплификация ДНК из межвидовых гибридов томатов с праймерами к последовательности гена *recA E.coli*: 1-12 - F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) и 13-28 - F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*).

Анализ экспрессии гена *recA E.coli* методом обратной транскрипции у пяти растений из группы F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) и F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*) подтвердил наличие соответствующей мРНК в клетках трансгенных гибридов (рис. 2).

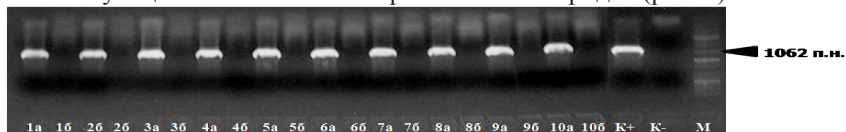


Рис. 2. Амплификация кДНК (а) и totalной РНК (б) из межвидовых гибридов томатов с праймерами к последовательности гена *recA E.coli*: 1-5 - F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) и 6-10 - F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*).

Пять трансгенных гибридов F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) и F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*), а также три нетрансгенных растения F₁ (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*)

и F₁ (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*) были высажены в теплицу для сравнительного изучения мейотической рекомбинации и фертильности. Установлено, что межвидовые гибриды разных комбинаций скрещиваний имели различный уровень фертильности пыльцы на отдельных этапах вегетационного периода, но в среднем за сезон он составил 70 % у всех форм (рис. 3).

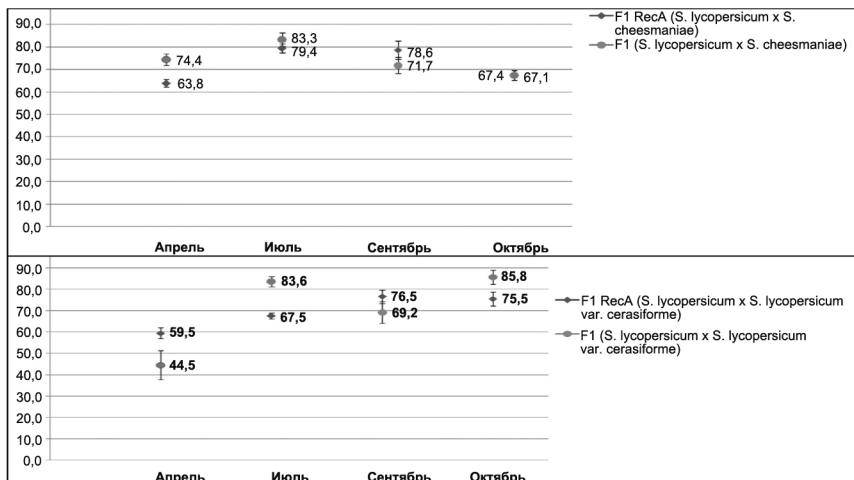


Рис. 3. Уровень фертильности пыльцы у межвидовых гибридов томатов на различных этапах вегетационного периода.

Следует отметить, что фертильность пыльцы у исходных родительских форм, а именно, у маркерных трансгенных и нетрансгенных растений культурного томата и представителей дикорастущих видов *S. cheesmaniae* и *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* за время вегетации практически не менялась и составляла 90-100 %.

На начальном этапе вегетации (апрель), когда в теплице было прохладно (16-18°C), межвидовые трансгенные и нетрансгенные гибриды в разных комбинациях скрещиваний имели достоверно различающиеся уровни фертильности. По мере повышения температуры до 24-30°C различия между гибридами F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*) и F₁ (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*) исчезли и более не проявлялись. Ранее Rick не обнаружил сильных отклонений от нормального прохождения мейоза у гибридов *L. esculentum* (*S. lycopersicum*) x *L. chesmanii* (*S. cheesmaniae*), однако Георгиевой и Сатировой были получены аналогичные гибриды с фертильностью от 20 до 95 % и с разной степенью нарушения мейоза, в том числе у поколения F₂ [6, 7]. В апреле гибриды F₁ RecA (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) имели фертильность на 15 % выше, чем их нетрансгенные аналоги, которые, однако, с наступлением благоприятных условий обогнали их по этому показателю. Летом F₁ RecA (*S. lycopersicum*

х *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) показывали на 15 % более низкий, но зато более стабильный уровень фертильности, чем их нетрансгенные аналоги (рис. 3). В сентябре с понижением температуры фертильность пыльцы у F_1 (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) снизилась до уровня у F_1 RecA (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*). Однако в середине октября фертильности пыльцы у трансгенных и нетрансгенных гибридов этой комбинации опять вернулась к показателям середины лета, что, скорее всего, было связано началом отопительного периода. Повторные сравнительные эксперименты по изучению фертильности будут проведены в контролируемых условиях.

Для сравнительной оценки частоты мейотической рекомбинации и интрогрессии генов с трансгенных и нетрансгенных гибридов F_1 было получено около 25000 семян F_2 . Исследования продолжаются.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-244.2011.4.

Литература

1. Reiss B., Klemm M., Kosak H., Schell J. RecA protein stimulates homologous recombination in plants // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. № 7. P. 3094-3098.
2. Reiss B., Schubert I., Kopchen K. et al. RecA stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by *Agrobacterium* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. № 7. P. 3358-3363.
3. Комахин П.А., Комахина В.В., Милокова Н.А., Жученко А.А. Анализ частоты мейотической рекомбинации у трансгенных гибридов томата, экспрессирующих гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* // *Генетика*. 2012. Т.48, №1. с.30-39.
4. Комахин П.А., Комахина В.В., Милокова Н.А., Голденкова-Павлова И.В., Фадина О.А., Жученко А.А. Трансгенные растения томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licBM3*, как модель для изучения мейотической рекомбинации // *Генетика*. 2010. Т. 46. №12. С. 1635-1644.
5. Mutschler M., Liedl B. Interspecific crossing barriers in *Lycopersicon* and their relationship to self-incompatibility. In: Williams E (ed) Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. *Kluwer Academic*, Netherlands. 1994. pp 164–188.
6. Жученко А.А. Генетика томатов. *Штиинца*. 1973. 659 с.
7. Георгиева Р., Сатинова В. Генетика и селекция. Г.4. 1971. С. 217-231.

Резюме

Получены межвидовые трансгенные гибриды томатов F_1 (*S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) и F_1 (*S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae*), экспрессирующие ген *recA* *E. coli*, а так же их нетрансгенные F_1 -аналоги. Для сравнительной оценки частоты мейотической рекомбинации и интрогрессии генов с трансгенных и нетрансгенных гибридов F_1 было получено около 25000 семян F_2 .

Transgenic tomato hybrids F_1 *S. lycopersicum* x *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* and F_1 *S. lycopersicum* x *S. cheesmaniae* with *recA* expression and also nontransgenic analogs of these plants have been developed. To compare recombination frequency and gene introgression about 25000 F_2 seeds have been obtained from transgenic and non-transgenic F_1 hybrids.

ЛЕМЕШ В.А.¹, МОЗГОВА Г.В.¹, ГРУШЕЦКАЯ З.Е.¹, ТРУХАНОВЕЦ Н.Л.¹,
ПИЛЮК Я.Э.², БАКАНОВСКАЯ А.В.², ЗЕМЦОВА Л.В.³, САМАТАДЗЕ Т.Е.,
АМОСОВА А.В.³, МУРАВЕНКО О.В.³

¹ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Республика Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27; ²РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию», Республика Беларусь, 222160, Жодино, ул. Тимирязева, 1; ³Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Российская Федерация, Москва, ул. Вавилова, 32, строение 1, e-mail: V.Lemesh@igc.bas-net.by

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОМ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ХРОМОСОМНЫХ И ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА РАПСА (*BRASSICA NAPUS L.*)

Рапс - одна из наиболее ценных и перспективных культур в общемировом производстве растительных масел, поскольку характеризуется высокой масличностью и оптимальным для питания соотношением всех физиологически важных жирных кислот. Одним из основных направлений селекции сортов рапса пищевого назначения является увеличение содержания в семенах белка, масла, оптимизация его жирнокислотного состава и создание сортов типа «000» – безэруковых, низкоглюкозинолатных и желто-семянных, и типа «0000» - со значительно сниженным содержанием линоленовой кислоты (3-6%). Сложность ведения селекции у рапса заключается в том, что он является природным аллополиплоидом, возникшим в результате скрещивания сурепицы *Brassica campestris* (n = 10, геном AA) с капустой огородной *Brassica oleracea* (n = 9, геном CC) и последующего удвоения числа хромосом. Большинство хозяйственно-ценных признаков (толщина семенной оболочки, содержание линолевой, линоленовой и эруковой кислоты в рапсовом масле и др.) контролируются совместно генами А и С геномов, что значительно затрудняет процесс отбора и закрепления признаков методами классической селекции. Для успешного проведения селекционной работы в настоящее время активно развиваются методы маркер - ассоциированного отбора, которые позволяют выявлять хозяйственно-ценные гены в родительских растениях до опыления, эффективно различать гомо- и гетерозиготы, и избежать, таким образом, высева последующих поколений для выявления признака.

Важным направлением селекции рапса является оптимизация качественного состава масла, что решается путем изменения соотношения высокомолекулярных непредельных жирных кислот – олеиновой (С18:1), линолевой (С18:2), линоленовой (С18:3). Снижение в рапсовом масле уровня линоленовой кислоты до 2-4% и повышение содержания олеиновой кислоты до 80% приводит к снижению скорости окисления масла [2]. В этой связи целью проводимой нами научно-исследовательской работы являлась

идентификация А- и С-геном-специфических хромосомных и ДНК-маркеров для оценки геномного и хромосомного полиморфизма рапса по генам, контролирующим уровень ненасыщенных жирных кислот в масле, и, в последующем, направленного их использования для маркирования генотипов в ходе селекционного процесса при выведении новых сортов с улучшенным качеством рапсового масла. Оригинальность идеи состояла в использовании комплексного подхода к изучению аллополиплоидного генома рапса на основе сочетания тонких методов молекулярного и цитогенетического анализа. Такие исследования проводятся впервые.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили генотипы ярового и озимого рапса белорусской селекции – сорта Антей, Неман, Гранит, Смак, Водолей, Явар, Гермес, Алмаз, Кромань, Гедемин, Магнат, Прамень, Янтарь, Добродей, Арсенал, Маяк, Лидер, Мартын, Зорный, Скиф-2, межсортовые гибриды: Кромань х Гермес₆, Кромань х Прамень₆, Рассвет х Прамень₄, Рассвет х Гермес₆, сорто-линейный гибрид F₁ Рубин, сортообразцы *gr* 7304 (получен с участием сорта Гранит), С10/05, 6-04-03, растения F₂, полученные от скрещивания индивидуальных растений сортообразца *gr*. 7304 и сортов Гермес и Антей, а также генотипы рапса российской селекции – сорта Викрос, Луговской, Новик, Подмосковный, Грант, Лауреат, ВИК2, Северянин, сортообразец 3-48.

Процедура приготовления хромосомных препаратов для гибридизации с оптимальной морфологией хромосом проводилась согласно [1]. Исследование хромосомного полиморфизма проводилось с помощью ряда методов дифференциального окрашивания (С-, Ag-ЯОР-, OR-, DAPI-, FPG-) и гибридизации *in situ* (FISH) с известными последовательностями ДНК (рибосомные гены и теломерные повторы), ранее адаптированные для изучения мелкохромосомных растений [1, 2].

Идентификация генов, контролирующих уровень содержания олеиновой и линоленовой кислот, проводилась с использованием аллель-специфических маркеров к мутантным аллелям генов *FAD2* и *FAD3c*, как описано в работе [3], а также разработанных нами маркеров к мутантным аллелям генов *FAD3 A* и *C* геномов *Brassica napus L.*

Жиринокислотный состав масел определяли методом газожидкостной хроматографии [4].

Результаты и обсуждение

Для селекции рапса одной из существенных проблем является аллополиплоидный характер его генома. В формировании селекционно ценного признака участвуют оба родительских генома, причем аллели, определяющие признак, могут быть практически идентичны. В этой связи возможным решением проблемы выявления доли участия определенного генома в развитии признака может быть определение локализации хозяйственно-

ценного локуса на хромосоме с помощью хромосомных и геном-специфических ДНК-маркеров.

В ходе научно-исследовательской работы проведено исследование хромосомного полиморфизма 23 сортов ярового и озимого масличного рапса и 2 сортообразцов рапса российской (3-48) и белорусской селекции (*зр. 73704*). Показано, что изученные нами сорта рапса имеют сходные рисунки распределения C- и DAPI-бэндов. Наиболее крупные гетерохроматические районы выявлены на хромосомах у яровых сортов Новик, Викрос, Грант, а на хромосомах озимых сортов Мартын, Северянин обнаружены самые мелкие гетерохроматические районы. Изучение локализации рибосомных РНК генов с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) выявило большое число сайтов 5S и 45S рДНК, количество которых варьирует в зависимости от сорта. В кариотипах сортов российской селекции выявлено 14-16 сайтов 5S рДНК, а в кариотипах сортов белорусской селекции на 2-6 сайтов 5S рДНК меньше. Число хромосом с сайтом 45S рДНК, варьирует в кариотипах изученных сортов от 12 до 14, но, при этом, изменяется и число функционально активных ЯОР хромосом. Разработан новый вариант метода геномной гибридизации (GISH) позволяющий проводить геномную гибридизацию и FISH на одних и тех же метафазных пластинках. Метод позволяет по GISH-маркерам различать А- и С –геномы, а по расположению 45S и 5S рДНК и DAPI-бэндингу различать все хромосомы. С помощью разработанного GISH-FISH метода выявлен полиморфизм озимых и яровых сортов рапса по числу и интенсивности гибридизационных сигналов как при GISH с ДНК сурепицы, так и при FISH с последовательностями 45S и 5S рДНК, что делает перспективным использование GISH-ДНК сурепицы вместе с 45S и 5S рДНК и DAPI-бэндами в качестве маркеров для генотипирования сортов и форм рапса.

С целью идентификации А- и С-геном-специфических молекулярных маркеров для оценки геномного полиморфизма рапса проведен анализ распределения мутантных аллелей главных генов, контролирующих повышенный уровень содержания олеиновой (*FAD2*) и пониженный - линоленовой (*FAD3c*) кислоты в семенах рапса у 15 сортов, 1 сортообразца и 1 сортолинейного гибрида ярового рапса и 4 сортов озимого рапса белорусской и российской селекции. Выявлено, что частота мутации по гену *FAD2* у исследованных яровых сортов варьировала от 0 до 100%. Наиболее высокая частота мутации по гену *FAD2* выявлена у 3 сорта ярового рапса (Алмаз, Антей, Магнат). Выявлены генотипы с высокой частотой мутантных аллелей *FAD2* и *FAD3c* генов: сортообразец ярового рапса *зр. 7304* (80,0% по *fad2* и 36,0% по *fad3c*), сорта озимого рапса Северянин и Маяк (100% по *fad2*, 50% и 40% по *fad3* соответственно).

Известно, что жирнокислотный состав семян рапса меняется в зависимости от аллельного состава *FAD2* и *FAD3* генов и соотношения мутантных аллелей *fad2*, *fad3a* и *fad3c* и аллелей дикого типа – *FAD2*, *FAD3A* и

FAD3C. Для идентификации аллелей генов, контролирующих синтез линоленовой кислоты и выявления генотипов с повышенным ее синтезом, нами разработаны геном-специфические ДНК-маркеры, позволяющие дифференцировать мутантные аллели и аллели дикого типа генов *FAD3 A* и *C* геномов рапса (рисунок). Для этого нами было проведено самоопыление 16 индивидуальных растений сортообразца *зр.* 7304 (РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию»), характеризовавшегося высокой частотой мутации по *FAD2* и *FAD3c* генам. Жирнокислотный анализ самоопыленного поколения выявил растения с пониженным содержанием линоленовой кислоты. Разработка молекулярных маркеров проводилась на двух генотипах, контрастных по уровню содержания линоленовой и олеиновой кислот, полученных нами в результате самоопыления индивидуальных растений сортообразца *зр.* 7304. Впоследствии выявление мутантных аллелей *FAD3* генов проводилось на F2 поколении гибридов, полученных нами при скрещивании индивидуального растения сортообразца *зр.* 7304 с повышенным содержанием олеиновой и пониженным – линоленовой ненасыщенных жирных кислот и белорусских сортов Гермес и Антей, содержание в которых олеиновой кислоты составляет 58,15% и 57,95% соответственно, а линоленовой – 10,76% и 11,87% соответственно.

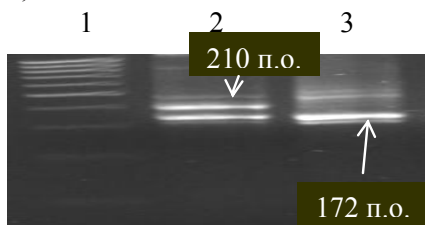


Рисунок. Кодоминантный аллель-специфический ДНК-маркер к *FAD3* гену *C*-генома *Brassica napus* L. 1 – маркер молекулярной массы 1 kb, 2 - гетерозиготные растения рапса с пониженным содержанием линоленовой кислоты, 3 – гомозиготные растения рапса с повышенным содержанием линоленовой кислоты

На следующем этапе исследований проводилось физическое картирование геном-специфических фрагментов *FAD3* генов (размер – ок 1000 п.о.), используемых в качестве матрицы для идентификации мутантных аллелей и аллелей дикого типа А и С-геномов *Brassica napus* на хромосомах рапса с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). В результате сравнения данных геномного и хромосомного анализа А- и С-геномов было установлено, что монокопийные локусы размером около 1 kb неприменимы в качестве зондов для гибридизации и для точной локализации уникальных генов требуется ряд перекрывающихся ПЦР-фрагментов меньшего размера суммарной длиной не менее 2,5-3 kb. В настоящее время ведется работа по хромосомной локализации геномных фрагментов *FAD3* генов.

Выводы. Разработаны геном- и аллель-специфические маркеры к генам *FAD3 Brassica napus L.*, контролирующим уровень содержания полиненасыщенной линоленовой жирной кислоты в рапсовом масле и методика, позволяющая идентифицировать мутантные аллели и аллели дикого типа *FAD3* генов, принадлежащие сурепице *Brassica campestris* и капусте огородной *Brassica oleracea*. Маркеры позволяют достоверно дифференцировать в больших популяциях генотипы, несущие мутацию по генам *FAD3 A* и *C* геномов *Brassica napus* и быстро детектировать на любой стадии селекционного процесса растения с пониженным содержанием линоленовой кислоты в рапсовом масле, что определяет низкую скорость окисления (прогоркания) рапсового масла, минуя стадию трудоемкого и дорогостоящего биохимического анализа жирнокислотного состава семян. Разработан комплекс специфических хромосомных и геномных цитогенетических маркеров, позволяющий генотипировать сорта и формы рапса. В настоящее время ведется работа по хромосомной локализации геном-специфических ПЦР-маркеров к хозяйственно-ценным генам *Brassica napus*.

Литература

1. Муравенко О.В., Зеленин А.В. Исследование хромосомной организации геномов мелкохромосомных растений // Генетика. - 2009. - Т. 45, № 11. - С. 1516–1529.
2. Семенова О.Ю., Саматадзе Т.Е., Зеленин А.В., Муравенко О.В. Сравнительное изучение геномов видов льна секции *Adenolinum* и *Stellerolinum* с использованием флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) // Биол. мембраны. - 2006. - Т. 23, № 6. - С. 453–460.
3. Лемеш В.А., Мозгова Г.В., Грушецкая З.Е., Пилюк Я.Э., Бакановская А.В., Хотылева Л.В. Идентификация мутантных аллелей генов *FAD2* и *FAD3C* в сортах ярового рапса (*Brassica napus L.*) белорусской селекции. // Доклады НАН Беларуси. - 2011. - Т. 55, № 3. - С. 88 – 91.
4. ГОСТ Р 51483-99. - М., 1999.–7 с.

Резюме

Разработан комплекс геном-специфических молекулярных и цитогенетических маркеров, которые рекомендуется использовать в селекционных программах для направленного маркирования генотипов ярового и озимого рапса по *FAD3* аллелям с целью ускорения создания высокопродуктивных сортов с повышенным содержанием олеиновой и пониженным – линоленовой жирных кислот в рапсовом масле.

A complex of genome-specific molecular and cytogenetic markers was developed. It is recommended to use the identified genome-specific markers in breeding programs for the genotyping of spring and winter rape accessions for *FAD3* alleles. Using this markers have to accelerate the development of high-yielding varieties with favorable fat acid composition.

ПАНЧУК І.І., КАСІЯНЧУК Р.М., ВОЛКОВ Р.А.

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського 2, Чернівці, 58012, e-mail: irina.panchuk@gmail.com

ВПЛИВ ІОНІВ ЗАЛІЗА НА ТРАНСКРИПЦІЮ ГЕНІВ АРХ АРАБІДОПСИСУ

Частина мікроелементів, необхідних для життєдіяльності рослин є важкими металами (ВМ). Проте у концентраціях вищих за оптимальні ці елементи є токсичними [6, 7]. Антропогенний вплив на біосферу призводить до зростання вмісту ВМ в оточуючому середовищі. Це становить небезпеку для живих організмів, оскільки підвищені концентрації ВМ негативно впливають на перебіг багатьох біохімічних процесів [3, 4, 5], зокрема порушується окисно-відновна рівновага у клітині [12], втрачається активність багатьох ензимів, що в кінцевому рахунку призводить до загибелі.

До металів, іони яких у надмірних концентраціях є токсичними для клітини, належить залізо. Токсичність заліза визначається тим, що за фізіологічних умов цей елемент може змінювати свою валентність і каталізувати перетворення пероксиду водню у гідроксил радикали згідно до реакції Фентона [5, 7, 8]. Наслідком цього є активація процесів перекісного окислення ліпідів та розвиток оксидативного стресу.

Зменшення продукції гідроксил радикалів у клітині може бути досягнуто шляхом зниження концентрації пероксиду водню. Відповідно, можна було припустити, що за дії іонів заліза може зростати експресія генів, що кодують пероксидази та каталази, тобто ензими, здатні розщеплювати пероксид водню. Для перевірки цього припущення ми вирішили порівняти рівень мРНК аскорбат пероксидази (АРХ) у листках *Arabidopsis thaliana* за нормальних умов та за дії іонів заліза.

У рослин АРХ кодується мультигенними родинami [2, 9, 13]. Зокрема у *A. thaliana* виявлено 8 генів, які кодують три цитозольні (*Apx1*, *Apx2*, *Apx6*), три мікосомальні (*Apx3*, *Apx4*, *Apx5*) та дві хлоропластні ізоформи АРХ (*sApx*, *tApx*) [9, 11, 14]. Встановлено, що у *A. thaliana* експресія індивідуальних генів *Apx* диференційно регулюється протягом сенесценсу [11] та залежить від концентрації пероксиду водню у клітині. Відповідно, у даній роботі було здійснено визначення рівню мРНК для всіх восьми генів *Apx* у *A. thaliana*.

Матеріали та методи

Для дослідження використовували рослини *A. thaliana* екотипу Columbia 0 віком 4,5-5-тижнів. Рослини вирощували у ґрунті в культиваційній кімнаті за температури 20°C в умовах 16-годинного світлового дня. Для проведення стресової обробки відокремлювали надземну частину рослин від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке середовище Мурасіге-Скуга (0,5x MS), що містило 0,5 та 5 мМ Fe-EDTA. Для того, щоб врахувати можливий вплив EDTA на експресію, паралельно проводили обробку рос-

лин відповідними концентраціями Na-EDTA. Крім того, в якості контролю використовували рослини, які інкубували на середовищі 0,5x MS. Обробку проводили у темряві при температурі 20°C протягом 2 (короткотривалий стрес) та 12 (довготривалий стрес) годин. Як показує досвід нашої лабораторії, 2 години відповідають мінімальному часу, за якого слід очікувати накопичення токсиканта та розвитку стресової відповіді у листках.

Виділення поліА⁺-мРНК, її конвертування у кДНК за допомогою зворотної транскриптази та умови проведення кількісної ПЛР на ампліфікаторі iCycler (Bio-Rad, США) з використанням ген-специфічних праймерів були описані раніше [9]. Результати піддавали статистичній обробці із застосуванням *t*-тесту [1].

Результати та обговорення

Для вивчення можливих змін у транскрипції генів, що належать до мультигенної родини *Arx* арабідопсису за дії іонів заліза було проведено визначення рівня мРНК восьми генів із використанням кількісної ПЛР у реальному часі (real time RT-PCR). Для порівняння було також визначено рівень мРНК актину *Act2*, рівень експресії якого у тканинах листа вважається відносно стабільним [10].

Отримані нами дані показують (Рисунок), що в умовах короткотривалої дії різних концентрацій іонів заліза рівень мРНК цитозольної *Arx1* та хлоропластної стромальної *sArx* зростає. Підвищення рівня експресії цих генів корелювало із концентрацією заліза, застосованої для обробки. Так, рівень мРНК *Arx1* за дії 0,5 та 5 мМ Fe-EDTA зростає відповідно у 4,1 та у 11 разів порівняно зі зразками, що інкубувались в присутності Na-EDTA. Рівень мРНК *sArx* збільшувався відповідно у 3 та 5,5 разів. У порівнянні з контролем зростання рівня мРНК спостерігалось лише при використанні для обробки 5 мМ Fe-EDTA і становило у 3,3 рази для *Arx1* та 2 рази для *sArx*.

Рівень експресії всіх інших генів *Arx* залишався практично без змін у дослідних рослин порівняно до контролю, тоді як рівень мРНК *Act2* знижувався у 1,5-2 рази.

В умовах довготривалого стресу 0,1 мМ Fe-EDTA викликає сильніше зростання рівню мРНК *Arx1* та *sArx*, яке становило, відповідно, 18 та у 23 рази порівняно зі зразками, що зазнали впливу Na-EDTA. У порівнянні з контролем рівень мРНК *Arx1* та *sArx* зростає у 7,2 та у 6,5 разів. Крім того, за умов довготривалої обробки спостерігались зміни – у 2-5 разів – рівня мРНК *Arx5*, *Arx6* та *Act2*.

Висновки

Надмірне підвищення концентрації іонів заліза у клітинах листка арабідопсису викликає зростання рівня мРНК генів, що кодують різні ізоформи АРХ, що імовірно пов'язано із посиленням транскрипції цих генів. Отже, АРХ задіяна у відповіді рослинної клітини на стрес, викликаний іонами заліза. Проте різні ізоформи АРХ імовірно грають різну роль у захисті клітини, оскільки рівень транскриптів різних *Arx* зростає по-різному.

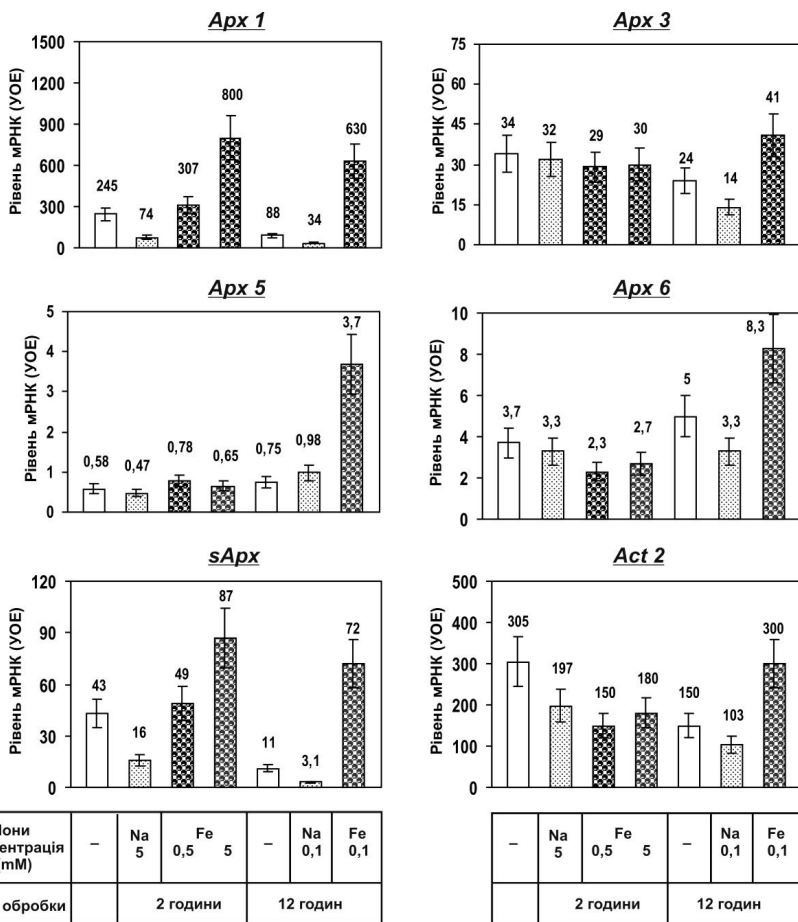


Рисунок. Рівні мРНК генів, що кодують різні ізоформи APX у листках *Arabidopsis thaliana* після обробки Fe-EDTA та Na-EDTA протягом 2 та 12 годин. Рівень поліА⁺-мРНК визначали методом кількісної RT-PCR. Рівні експресії представлено у порівнянні з рівнем мРНК для актину-2 у необробленому листі, який прийнято за 100 умовних одиниць експресії (YOE).

Література

1. Лакін Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Газарян И.Г., Хушпұльян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – Р. 303-322.
3. Топчій Н.М. Вплив важких металів на фотосинтез // Физиол. биохим. культурных растений. – 2010. – Т. 42, №2. – С. 95-103.

4. *Benavides M. P., Gallego S.M., Tomaro M.L.* Cadmium toxicity in plants // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 17. – P. 21-34.
5. *Connolly M.L., Guerinot M.L.* Iron stress in plants // *Genome Biol.* – 2002. – Vol. 3, No 8. – P. 1024.1-1024.4.
6. *Hall J.L.* Cellular mechanisms for heavy metal detoxification // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53, No 366. – P. 1-11.
7. *Hall J.L., Williams L.E.* Transition metal transporter in plants // *J. Exp. Bot.* – 2003. – Vol. 54, No 393. – P. 2601-2613.
8. *Mittler R., Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F.* Reactive oxygen gene network of plants // *Trends Plant Sci.* – 2004. – Vol. 9, No 10. – P. 490-498.
9. *Panchuk I.I., Volkov R.A., Schöffl F.* Heat stress- and HSF-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 838-853.
10. *Panchuk I.I., Volkov R.A., Schöffl F.* Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR // *J Exp Bot.* – 2003. – Vol. 54, No 391. – P.2343-9.
11. *Panchuk I.I., Zentgraf U., Volkov R.A.* Expression of the *Apx* gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana* // *Planta.* – 2005. – Vol. 222. – P. 926-932.
12. *Ravet K.T, Touraine B., Boucherez J., Briat J.-F., Gaymard F., Cellier F.* Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis* // *Plant J.* – 2009. – Vol. 57. – P. 400-412.
13. *Santos M., Gousseau H., Lister Foyer C, Creissen G, Mullineaux P.* Cytosolic ascorbate peroxidase from *Arabidopsis thaliana* L. is encoded by a small multigene family // *Planta.* – 1996. –Vol. 198. – P. 64-69.
14. *Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M. Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K.* Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes // *J. Exp. Botany.* – 2002. – Vol. 53, No 372. – P. 1305-1319.

Резюме

Для восьми генів, кодируючих ізоферменти аскорбат пероксидази (АРХ) определялись изменения уровня мРНК в ответ на накопление ионов железа в тканях листьев арабидопсиса. Обработка Fe-EDTA в течение 2 часов приводила к заметному возрастанию уровня мРНК *Apx1* и *sApx*. После 12 часовой обработки эффекты усиливались. Дифференциальная транскрипция генов *Apx* может быть частью ответа на стресс, вызванный ионами железа.

Для восьми генів, які кодують ізоферменти аскорбат пероксидази (АРХ), було визначено зміни рівню мРНК у відповідь на накопичення іонів заліза у тканинах листків арабідопсису. Обробка Fe-EDTA протягом 2 годин призводила до помітного зростання рівня мРНК *Apx1* та *sApx*. Після 12 годинної обробки ефекти посилювались. Диференційна транскрипція генів *Apx* може бути частиною відповіді рослин на стрес, викликаний іонами заліза.

Changes of mRNA levels of eight genes coding for ascorbate peroxidase (APX) isoenzymes in response to accumulation of iron ions in leaf tissues of arabidopsis were evaluated. Two hours treatment with Fe-EDTA results in remarkable increase of *Apx1* and *sApx* mRNA levels. After 12 hours treatment the effects were enhanced. The differential transcription of *Apx* genes appears to contribute to iron stress response.

СИВОЛАП Ю.М

*Южный биотехнологический центр НААН, Украина, 65036, Овидиопольская дор. 3,
E-mail : genome2006@mail.ru*

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГЕНОМА И МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ

Развитие технологий улучшения растений основывается на достижениях в познании структуры генома. Исследование организации и изменчивости генома является одним из важнейших направлений молекулярной биологии и молекулярной генетики. Понятие «геном» введено в 20-х годах прошлого столетия в период формирования основных генетических терминов. профессором ботаники Гамбургского университета Хансом Винклером, определение которого актуально и в настоящее время. Его первым обозначением генома было «портмоне слов ген и хромосома». В дальнейшем он предложил считать геномом «гаплоидный набор хромосом с локализованными в нем генами». Среди других биологических систем геном может выступать в виде генетической категории вида и дискретной генетической системы в сложном аллополиплоидном виде.

Геном –наследственная информация, кодируемая у высших организмов ДНК. На протяжении многих лет анализ генома является одним из важнейших направлений генетических исследований. Геном растений долгое время не был популярным объектом, что было связано с несовершенством методов молекулярно-генетического анализа растительных клеток. Прогресс в исследовании организации и изменчивости структуры ДНК во второй половине 20-века открыл возможности существенного углубления представления о геноме. Достижения в познании организации и вариабельности генома стали основой современной биотехнологии, которая вывела на новый более эффективный уровень фармакологию, судебную медицину и, особенно, растениеводство.

За четыре десятилетия в методологии исследования генома пройден путь от анализа кинетики реассоциации ДНК к использованию наиболее эффективного метода определения молекулярно-генетического полиморфизма - ПЦР-анализа и сиквенирования. Сугубо теоретические в недавнем прошлом направления исследований стали определяющим фактором современного растениеводства.

Представление о геноме расширилось в зависимости от создания и использования методов анализа организации и специфичности наследственного материала. В эволюции исследования генома определился ряд этапов. Одним из движущих факторов познания генома было разрешение ряда «парадоксов», возникших после установления материального носителя наследственности. Если вся ДНК представлена генами, то количество их в геноме невообразимо велико, т.е. G – парадокс. Представление, что количество ДНК в геноме увеличивается по мере эволюционного совершенства, не

всегда соответствует действительности, С парадокс. Многие виды животных и растений имеют в геноме ДНК больше, чем человек. После «С-парадокса» мы сталкиваемся с явлением не зависимости сложности организма от числа генов, с «N-парадоксом». Размер генома у эукариот варьирует более, чем 80 000 кратно, количество белок кодирующих генов изменяется всего 20 кратно.

Эволюционную продвинутость организма последнее время связывают с усложнением системы регуляции экспрессии генов и возрастанием комбинаций, которые позволяют одному и тому же гену экспрессироваться на разных этапах развития организма и в разных дифференцированных клетках. Эволюция эукариот сопровождается увеличением генных комбинаций. Одна функция может выполняться множеством генов, каждый из которых имеет также и другие функции. Многие признаки являющиеся полигенными, трудно поддающиеся традиционному генетическому анализу.

Значительный прогресс в познании структуры генома связан с исследованием кинетики ренатурации ДНК. В отделении земного магнетизма Института Карнеги в Вашингтоне физик по образованию Рой Бриттен установил особенности структуры высших организмов - наличие повторяющихся последовательностей ДНК. Р. Бриттен и Э. Дэвидсоном сформулирована гипотеза о генной регуляции на уровне транскрипции в геномах высших организмов. Нами с д-ром Дж.Боннером в PNAS опубликована статья, в которой описывается взаимодействие хромосомной РНК с повторяющейся фракцией генома, как возможный РНК-активатор в системе Бриттена – Дэвидсона. До этого существовала известная система Жакоба и Моно о генной регуляции у микроорганизмов. На несколько десятилетий анализ кинетики восстановления вторичной структуры ДНК после ее денатурации стал основным методом исследования структуры генома эукариот. В свете этих работ геном представлялся в виде трех взаимодействующих фракций, которые различались по количеству копий и выполняемым в клеточной системе функциям. Д.Коном и Р. Бриттенем была сформулирована гипотеза скачковых репликаций, как один из возможных вариантов видообразования. В этой гипотезе высокоповторяющаяся сателлитная ДНК показана, как эволюционно наиболее молодая и высокоспецифичная фракция генома. В настоящее время микросателлитная ДНК используется в качестве гипервариабельного молекулярного маркера в идентификационных исследованиях судебной медицины, генетике растений, диагностике патогенов и др. .

Нами параллельно с Р.Флэйвелом из Института селекции растений (Кэмбридж, Англия) установлено преобладание в геноме большинства растений повторяющейся фракции ДНК. Высокое процентное содержание повторов в геномах высших растений существенно отличает их от высших животных, где большую часть генома составляет малокопийная ДНК. Такая разница в организации ДНК, скорее всего, связана с фракцией последовательностей нуклеотидов, который отвечает за регуляторные реакции,

обеспечивая функционирование и репродукцию растений в меняющихся условиях окружающей среды. Растения могут переходить к репродукции, используя различные метаболические пути, в то время как геном большинства животных имеет защитные приспособления в виде механизмов поддержки постоянной температуры и способность к передвижению. Наличие большого количества повторяющихся последовательностей ДНК может быть своеобразным защитным фоном, который предохраняет геном от проявления мутационных изменений. Избыточное количество повторов в геноме растений может обеспечивать лабильность функционирования генома в меняющихся условиях окружающей среды (1).

С помощью анализа данных молекулярной гибридизации установлен внутривидовой диапазон полиморфизма фракции малокопийной ДНК. Соотношение фиксированной фенотипической изменчивости и изменчивости (дивергенции) генома ставило 3×10^{-3} . Фенотипически проявляется не более 0,3% изменений, прошедших в малокопийной ДНК. Изменчивость на уровне ДНК проходит более быстрыми темпами, чем фенотипическая. Количество ДНК в гаплоидном геноме называется размером генома или C (константа, характеристика, постоянна в пределах вида, но варьирует между видами). Размер генома у бактерий варьирует 20-тикратно от 6×10^5 bp у некоторых облигатных внутриклеточных паразитов до более, чем 10^7 b.p. у цианобактерий. Микоплазма, наименьший свободно живущий прокариот содержит 350 протеин кодирующих генов. Значение C обычно значительно больше у эукариот за исключением дрожжей. Однако большое варьирование значения C у эукариотов не связано со сложностью организма или количеством кодирующих генов. Значительные межвидовые различия связаны с некодирующей ДНК. Наши исследования содержания ДНК в ядрах клеток злаков показали меж- и внутривидовую изменчивость. В пределах вида *T. aestivum* сорта Одесская 16 и Безостая 1 различаются по содержанию ДНК на 5.7%, а в виде *T. durum* сорта Новомичуринка и Дружба по этому показателю различаются на 11.8%. Анализ молекулярной организации генома растений показал, что последовательности нуклеотидов малокопийной фракции злаков не являются уникальными, а повторяются в некоторой степени, что оправдывает название этой фракции. Бурное развитие генно-инженерной методологии создало возможности для более детального анализа структуры генома. Определяющую роль сыграли методы анализа полиморфизма ДНК, такие как различные варианты ПЦР и сиквенирование.

На рубеже 20-го и 21-го веков от изучения вторичной структуры ДНК анализом кинетики реассоциации и молекулярной гибридизацией был совершен переход к: раскрытию первичной структуры ДНК от бактерий до человека. Это породило геномику - учение о строении и функциях геномов живых организмов, об особенностях преобразования информации, записанной в ДНК, в строение и свойства живых существ. Появление смежной между молекулярной биологией, генетикой и биоинформатикой дисципли-

ны, явилось значительным событием конца прошлого века. В отличие от классической молекулярной биологии, геномика может оказывать воздействие на другие биологические науки и производство, выступая составной частью современной биотехнологии. В современной биотехнологии важное место занимают ДНК-технологии, в частности использование молекулярных маркеров. Молекулярные маркеры способны покрывать весь геном, включая структурную и неструктурную зону. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма при помощи ПЦР-анализа открыло перспективу создания маркеров простых и количественных, к которым относится большинство агрономически важных, признаков. Для создания маркеров необходим подбор соответствующего генетически детерминированного исходного материала. Им может служить: расщепляющаяся популяция, ди-гаплоидные линии, рекомбинантные инбредные линии, (почти) изогенные линии. Для ПЦР-анализа можно использовать как полилокусную, так и монолокусную систему. Развитие молекулярной генетики показало важность исследований классической генетики, поставляющей генетически детерминированный материал для молекулярно-генетического анализа.

Преимуществом полилокусных ПЦР систем (RAPD, ISSR, IRAP, REMAP, AFLP) можно считать высокий уровень полиморфизма, одновременный анализ большого количества локусов, универсальность и дисперсированность по всему геному. В то же время доминантность маркеров часто делает необходимым анализ последующего поколения для выявления гетерозигот. В случае произвольных праймеров затруднена локализация.

Монолокусная система с использованием микросателлитов SSR-анализ также выявляет высокий уровень полиморфизма, маркеры дисперсированы по всему геному. Важным достоинством является ко-доминантность и известная локализация в геноме. Для получения объективных данных и охвата большей части генома необходимо проведение большого количества реакций.

В Украине с 1994 года разработаны основы и технология использования ПЦР-анализа в генетике, селекции и семеноводстве (2). Предложена оригинальная система дифференциации, идентификации и регистрации сортов сельскохозяйственных растений с помощью ко-доминантных микросателлитных маркеров. Сорт (генотип или смесь генотипов) представляется в виде генетической формулы, состоящей из идентификационной и информационной частей. Данные об аллельном состоянии агрономически важных локусов составляют информационную часть. Однородность и новизна сорта может быть установлена за несколько недель двух-трех лет по общепринятой в UPOV методике DUS теста. Пополняется база данных ДНК-типирования сортов, линий и гибридов пшеницы, ячменя, кукурузы, подсолнечника и др. культур зарегистрированных в Государственном реестре сортов Украины. ДНК-типирование открыло новые перспективы в за-

щите прав селекционеров, а также в систематизации пулов зародышевой плазмы сельскохозяйственных культур.

Маркерная селекция обеспечивает потенциальные возможности для улучшения целевых признаков в том же генотипе точнее, с меньшими общими затратами и в меньшем количестве циклов отбора. Маркерная селекция необходима для поддержания рецессивных аллелей при беккросинге и ускорения беккросной селекции в целом, а также для пирамидирования нескольких моногенных признаков (таких, как низкорослость, устойчивость к вредителям и болезням или качественные признаки) или нескольких QTL для одного целевого признака с комплексной наследственностью (таких, как засухоустойчивость, морозостойкость) (3). Отбор по молекулярным маркерам только с одним геном сокращает объем анализируемой F_2 популяции на 95%. Отбор на ранних этапах до цветения позволяет провести гибридизацию отобранных генотипов, что исключает необходимость последующего гибридологического анализа. Для молекулярной селекции необходимо анализировать по одной комбинации порядка 2000 растений F_2 -популяции, изогенных линий или рекомбинантных инбредных линий. По оценкам СУММИТ стоимость анализа образца по одному молекулярному маркеру составляет 1,24-2,26 долларов США (при массовых анализах - меньше, например, в международном институте риса (Филиппины) стоимость анализа одного образца снижена до 0,3 долларов США), в Украине - 3 доллара США. Стоимость отбора по одному маркеру в пределах 2000 образцов составляет 50,0 тыс. грн. В то же время экономится 5-6 лет работы селекционного отдела с годовым бюджетом 2-3 млн. грн.

В ЮБЦ разработаны ДНК-технологии определения качественных показателей зерна мягкой пшеницы: твердозерность/мягкозерность, низкое содержание амилозы. Установлено, что эффекты влияния активных аллелей *Wx-генов* на синтез амилозы в зерне составляют: *Wx-A1a* - 0,0499; *Wx-B1a* - 0,0537; *Wx-D1a* - 0,0821 относительно альтернативных нуль-аллелей. Изучено аллельное состояние *Pina-D1* и *Pinb-D1* локусов в сорте Оксана, созданном в СГИ с помощью отдаленной гибридизации.

Разработана ДНК-технология отбора генотипов озимой мягкой пшеницы с определенной скоростью развития и использования ее в создании генотипов, адаптированных к условиям выращивания. Отбор растений с определенными *Ppd*, *Vrd*, *Eps* генотипами позволит создавать сорта и линии озимой пшеницы с разной скоростью развития, что влияет на урожайность. Маркированы гены CBF-регулона, которые отвечают за низкотемпературную толерантность ячменя и пшеницы.

Маркирующую способность локуса ORS1036, для которого установлено сцепление с геном устойчивости к заразице расы *C Or 3* на расстоянии 8 см, проверено ПЛР-анализом 43 инбредных линий и гибридов. Маркер признака "устойчивость подсолнечника к заразице расы *C*" может быть

рекомендован для использования в селекционном процессе. Установлено аллельное состояние *Gli*- и *Glu*-локусов 14 сортов мягкой пшеницы: по *Glu A3* локусу аллели *f* характерные Зустріч одесская, *a* - Застава одесская, *d* - Струмок, Лада одесская, *c* - Лузанивка одесская, Знахідка одесская, Любава одесская, Фантазія одесская, Альбатрос одесский, Одесская 267, Виктория, Прима одесская. Познание структуры генома, развитие молекулярных маркеров способствуют уменьшению глубины пропасти между генетикой и практической селекцией (4).

Литература

1. Антонов А.С., Беридзе Т.Г., Ванюшин Б.Ф. и др. Геном растений. Наукова думка 1988.- 288с.
2. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Вербницкая Т.Г. и др. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях (научно-методическое руководство) Аграрна наука”, 1998. – 156 с.
3. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Календарь Р.Н. Варибельность и специфичность геномов сельскохозяйственных растений. Астропринт, 2011. – 336 с.
4. Дьяков А.В. Тенденции в развитии научных основ селекции растений. Электронный научный журнал «ИССЛЕДОВАНО В РОССИИ» 1 <http://zhurnal.apc.relam.ru/articles/2012/001.pdf>

¹BETEKHTIN A., ²INDA L., ²CATALAN P.

¹Department of Plant Anatomy and Cytology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Silesia, Jagiellonska 28, 40–032 Katowice, Poland, e-mail: abetekht@us.edu.pl

²Departamento de Agricultura Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Carretera de cuarte s/n, 22-071 – Huesca, España

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE PGIC GENES IN THE FAMILY POACEAE

Horizontal gene transfer (HGT) plays an important role in the evolution of bacteria and is quite common in unicellular eukaryotes [1]. However, the occurrence and importance of HGT in the evolution of multicellular eukaryotes remains unclear. Recent studies indicate that plant mitochondrial genomes are unusually active in the HGT comparing to the plastid and nuclear genomes of multicellular eukaryotes. In the case of plants HGT was shown for parasitic plants, where a presence of the mitochondrial gene, *nad1B-C* from host plant *Tetragymna* was found in the genome of family Rafflesiaceae [2]. Furthermore, massive HGT was found in another parasitic plant *Amborella trichopoda*. These results indicate that *Amborella trichopoda* has acquired from other plant species more than 24 mitochondrial genes [3]. It should be noted, that recently an increasing number of study on HGT in the family Poaceae has appeared. It has been demonstrated that the process of HGT occurred from poliploid *Poa* species into a very common diploid grass *Festuca ovina* [4-6].

In this presentation analysis of nuclear genes *pgiC1* and *pgiC2* in the family Poaceae is presented. In addition, the presence of HTG in these genes, the date and time of transmission and identification of donor and recipient of genomic sequences is analysed.

AB acknowledges financial support from Polish Ministry of Science and Higher Education (grant N N303 569538).

Literature

1. Richardson A. O., Palmer D.J. Horizontal gene transfer in plants // Journal of Experimental Botany. – 2006. – vol. 58, - P.1-9.

2. Davis C.C., Wurdack K. J. Host – to – parasite gene transfer in flowering plants: phylogenetic evidence from Malpighiales // Science. – 2004. – vo. 305, - P.676-677.

3. Bergthorsson U., Richardson A. O., Young G., Goertzen L. G., Palmer J. D. Massive horizontal transfer of mitochondrial genes from diverse land plant donors to the basal angiosperm *Amborella* // PNAS. – 2004. – vol. 100, - P. 17747 – 17752.

4. Ghatnekar L., Jaarola M., Bengtsson B.O. The introgression of a functional nuclear gene from *Poa* to *Festuca oviva* // Proc. R. Soc. Ser.B. – 2006. – vol. 273, - P. 395-399.

5. Vallenback P., Jaarola M., Ghatnekar L., Bengtsson B. O. Origin and timing of the horizontal transfer of a *PgiC* gene from *Poa* to *Festuca ovina* // Mol Phylogenet Evol. – 2008. – vol. 46, - P. 890 – 896.

6. Vallenback P., Bengtsson B.O., Ghatnekar L. Geograhic and molecular variation in a natural plant transgene // Genetica. – 2010. – vol. 138. – P. 355 – 362.

HASTEROK R.

*Department of Plant Anatomy and Cytology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Silesia, Jagiellonska 28, 40–032 Katowice, Poland,
e-mail: robert.hasterok@us.edu.pl*

FISH-ING NUCLEAR GENOMES: GLITTERS AND SHADOWS OF MODERN PLANT CYTOGENETICS

Cytogenetics is the part of biology focusing on the study of nuclear genomes at the microscopic level. In its modern incarnation, known as molecular cytogenetics, it goes far beyond mere chromosome counting and measurement and represents a multidiscipline that amalgamates various methodological approaches of cytology, molecular genetics as well as advanced microscopy and digital image processing. One of the most spectacular molecular cytogenetic techniques is *in situ* hybridisation (ISH), which is kinetically controlled renaturation of labelled nucleic acid (DNA or RNA) molecules, called probes, with their complementary DNA or RNA targets in a cytological substrate. Its most common variant, DNA:DNA fluorescence *in situ* hybridisation enables complex study of molecular organisation not only of mitotic and meiotic chromosomes but also interphase nuclei, presenting

the results in a convincing and self-explanatory way on the one hand, and in a colourful and visually attractive one on the other.

Various DNA sequences, both repetitive and low/single copy, can serve as probes in FISH experiments. Those based on ribosomal DNA, telomeric, centromeric and various genetic mobile element sequences are most commonly used in the analysis of plant genomes. During the last decade, the most spectacular FISH approaches use large inserts of genomic DNA cloned into high capacity vectors, usually Bacterial Artificial Chromosomes (so called BAC clones) [1-2]. In many plant species, especially those with small nuclear genomes, BAC-based FISH probes are the best source of precise, chromosome specific landmarks [3-4]. In very rare cases, like in a model dicot plant *Arabidopsis thaliana* [5], modern grass *Brachypodium distachyon* [6] and their close relatives a special combination of sequence data, ordered BAC libraries and bioinformatic tools as well as modern cytomolecular infrastructure opens up a unique opportunity to paint particular chromosomes. This most advanced molecular cytogenetics approach offers unprecedented insight into the plant genome structure, dynamics and evolution. A complementary variant of ISH that targets RNA in a cytological substrate can be used to study a plant transcriptome in various tissues and at various stages of a plant development [7].

The leitmotiv of this lecture is to outline and discuss the most intriguing aspects and research applications of modern molecular plant cytogenetics.

RH acknowledges financial support from Polish Ministry of Science and Higher Education and National Science Centre (grants N N303 570738 and 2011/01/B/NZ3/00177).

Literature

1. *Figuroa DM, Bass HW*. A historical and modern perspective on plant cytogenetics // Briefings in Functional Genomics and Proteomics – 2010 – vol. 9, № 2. - P.95-102.
2. *Gill N, Hans C.S., Jackson S*. An overview of plant chromosome structure // Cytogenetic and Genome Research – 2008 – vol. 120, № 3-4. - P.194-201.
3. *Hasterok R., Marasek A., Donnison I.S., Armstead I., Thomas A., King I.P., Wolny E., Idziak D., Draper J., Jenkins G*. Alignment of the genomes of *Brachypodium distachyon* and temperate cereals and grasses using bacterial artificial chromosome landing with fluorescence *in situ* hybridization // Genetics – 2006 – vol. 173, № 1. - P.349-362.
4. *Wolny E., Lesniewska K., Hasterok R., Langdon T*. Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium* // Chromosoma – 2011 - vol. 120, № 2. - P.199-212.
5. *Lysak M.A., Berr A., Pecinka A., Schmidt R., McBreen K., Schubert I*. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA – 2006 - vol. 103, № 13. - P.5224-5229.
6. *Idziak D., Betekhtin A., Wolny E., Lesniewska K., Wright J., Febrer M., Bevan M.W., Jenkins G., Hasterok R*. Painting the chromosomes of *Brachypodium* – current status and future prospects // Chromosoma – 2011 - vol. 120, № 5. - P.469-479.

7. Drea S., Corsar J., Crawford B., Shaw P., Dolan L., Doonan J.H. A streamlined method for systematic, high resolution *in situ* analysis of mRNA distribution in plants // Plant Methods – 2005 - vol. 1, № 8. - P.1-11.

¹LESNIEWSKA K., ¹SZALEGA A., ¹LUSINSKA J., ¹BETEKHTIN A.,
¹BOROWSKA N., ¹BREDA E., ²WOLKO B., ¹HASTEROK R.

¹ Department of Plant Anatomy and Cytology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Silesia, Jagiellonska 28, 40–032 Katowice, Poland, e-mail: karolina.lesniewska@us.edu.pl

² Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszynska 34, 60-479 Poznan, Poland

PHYLOGENETIC RELATIONS IN THE *LUPINUS* GENUS – A CYTOMOLECULAR APPROACH

Traditionally, the legume family has been divided into three subfamilies: Caesalpinieae, Mimosoideae, and Papilionoideae [1]. The genus *Lupinus* belongs to the Papilionoideae subfamily of the Fabaceae and comprises more than 300 “Old World” and “New World” lupin species. Their unique capacity for symbiotic nitrogen fixation underlines importance of this group of plants in rotation system of sustainable agriculture. Legumes, with *Lupinus* crops among them, are also the excellent source of protein for animal feeds and in the human diet.

The cytotoxic studies of *Lupinus* species have confirmed some facts of duplication events in their genomes. The complex organisation and evolution of the *Lupinus* genomes, which is most striking in the Old World Lupin (OWL) group, is exemplified by a high diversity in total chromosome number ($2n=32-52$), wide range of basic chromosome number ($x=6-9$ and 13) and nuclear genome size (0.97 pg/2C – 2.68 pg/2C). Basing on cytogenetic studies Naganowska and Zielińska [2] postulated that numerous, successive chromosomal rearrangements in OWL could occur in the long history of lupins and reinforce formation of cytogenetically stable and functional diploids.

To date, the cytogenetic analyses of chromosome number and genome size determination allowed to reveal only some general aspects of *Lupinus* taxonomy and phylogeny. The development of BAC libraries for *L. angustifolius* [3-4] and chromosome specific markers [5] provide the opportunity to investigate intergenomic relationships in *Lupinus* in more detail using BAC-FISH technique. Comparative BAC-FISH mapping has been extensively applied in plant genome analyses. To track chromosome rearrangements in *Lupinus*, *L. angustifolius*, which is relatively well-studied species, was used as a reference organism for the first effective cytomic study within *Lupinus*. The *L. angustifolius* BAC clones used as FISH probes were mapped in somatic chromosomes of other members of this genus. Such a ‘heterologous’ comparative BAC-FISH approach was conducted for the first time in the *Lupinus* species. Our results

present a current status on genome evolution in the *Lupinus* genus and indicate the presence of various rearrangements that can shape the evolution of the lupin genomes at the chromosome level. Moreover, the cytogenetic study should allow to establish one of the *Lupinus* species as a model organism that could be useful in better understanding of legume genome evolution [5-6].

Literature

1. Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M, Introduction. In: Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M (eds) Legumes of the world // Kew Publishing, Richmond .-2005, P.1-577.

2. Naganowska B, Zielińska A, Physical mapping of 18S-25S rDNA and 5S rDNA in *Lupinus* via fluorescent *in situ* hybridization // Cell. Mol. Biol. Lett .- 2002 .- vol. 7, P.665-670.

3. Gao LL, Hane JK, Kamphuis LG, Foley R, Shi BJ, Atkins CA, Singh KB, Development of genomic resources for the narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*): construction of a bacterial artificial chromosome (BAC) library and BAC-end sequencing // BMC Genomics .- 2011 .- vol. 12, P.521-536.

4. Kasprzak A, Safar J, Janda J, Dolezel J, Wolko B, Naganowska B, The bacterial artificial chromosome (BAC) library of the narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) // Cell. Mol. Biol. Lett .- 2006 .- vol. 11, P.396-407.

5. Lesniewska K, Ksiazkiewicz M, Nelson MN, Mahe F, Ainouche A, Wolko B, Naganowska B, Assignment of 3 genetic linkage groups to 3 chromosomes of narrow-leaved lupin // J. Hered .- 2011 .- vol. 102, P.228-236.

6. Nelson MN, Moolhuijzen PM, Boersma JG, Chudy M, Lesniewska K, Bellgard M, Oliver RP, Swiecicki W, Wolko B, Cowling WA, Ellwood SR, Aligning a new reference genetic map of *Lupinus angustifolius* with the genome sequence of the model legume, *Lotus japonicus* // DNA Res .- 2010 .- vol 17, P.73-83.

¹WOLNY E., ^{1*}LESNIEWSKA K., ¹PIERCHALA K., ¹CHMURAA., ¹SIWINSKA D., ¹IDZIAK D., ²LANGDON T., ¹HASTEROK R.

¹Department of Plant Anatomy and Cytology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Silesia, Jagiellonska 28, 40-032 Katowice, Poland,

²Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Edward Llwyd Building, Aberystwyth University, Penglais, Aberystwyth, Ceredigion SY23 3DA, Wales, UK

CYTOGENETIC STUDIES ON *KOELERIA* AND *SESLERIA* SPECIES

The tribe Aveneae (Poaceae) is one of the major lineages of grasses in the Northern Hemisphere. Cytogenetic studies to date have concentrated on the genus *Avena* and its close relatives [1-3]. In this study we focus on *Koeleria* and *Sesleria* species. These are important components of plant communities worldwide, but little is known about their genome organization. Existing cytogenetic data on these species is limited to chromosome counting and genome size estimations [4-5]. To investigate their karyotypes methods of molecular cytogenetics were used. Modern cytogenetic tools, such as fluorescence *in situ* hybridisation (FISH), provide a plethora of information on chromosome structural and

evolution. One of the most common applications of FISH is to study the number and distribution of ribosomal DNA (rDNA) loci along the chromosomes. In amenable species, rDNA sequences can act as efficient cytogenetic landmarks to identify morphometrically similar chromosomes and to track their numerical and structural rearrangements during evolution, thus providing valuable information on plant genome organization and cytotaxonomy.

The authors acknowledge financial support from Polish Ministry of Science and Higher Education (grant N N303 569538).

References

1. Irigoyen M. L., Linares C., Ferrer E., Fominaya A. Fluorescence *in situ* hybridization mapping of *Avena sativa* L. cv. SunII and its monosomic lines using cloned repetitive DNA sequences // *Genome*. – 2002. – vol. 45, - P.1230-1237.
2. Winterfeld G., Roser M. Chromosomal localization and evolution of satellite DNAs and heterochromatin in grasses (Poaceae), especially tribe Aveneae // *Plant Systematic and Evolution*. – 2007. – vol. 264, - P.75-100.
3. Winterfeld G., Doring E., Roser M. Chromosome evolution in wild oat grasses (Aveneae) revealed by molecular phylogeny // *Genome*. – 2009. – vol. 52, - P.361-380.
4. Pecinka A., Suchankova P., Lysak M.A., Travnicek B., Dolezel J. Nuclear DNA content variation among central European *Koeleria* taxa // *Annals of Botany*. – 2006. – vol. 98, - P.117-122
5. Lysak M.A., Dolezel J. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae) // *Caryologia*. – 1998. – vol. 51. – P.123-132.

**АХТЕМОВА Г.А., ЧЕБОТАРЬ В.К., ШТАРК О.Ю., ЩЕРБАКОВ А.В.,
БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
Россия, 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д.3, e-mail: ahgulya@yandex.ru*

ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ РАСТЕНИЙ: БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ

Практически все растения, включая сельскохозяйственные культуры, взаимодействуют с различными группами полезных микроорганизмов. К ним относится широкий спектр бактерий и микроскопических грибов. Наиболее изучены взаимодействия растений с ризосферной микрофлорой, в том числе с грибами арбускулярной микоризы, клубеньковыми бактериями, бактериями ризосферы, ризопланы. Взаимодействия растений с полезными микроорганизмами привлекают внимание ученых с точки зрения не только изучения фундаментальных основ взаимодействия различных организмов, но и возможного использования данных взаимодействий в практике экологически ориентированного адаптивного растениеводства. Многочисленные исследования показали, что микроорганизмы могут положительно влиять на рост и развитие растений и повышать устойчивость к патогенной микрофлоре. Жизнедеятельность разнообразных микроорганизмов, кроме того, дает синергетический эффект в развитии растений, обеспечивая продуктивный урожай. Стоит отметить, что наиболее плодородные почвы обычно содержат высокую долю органических веществ, и, следовательно, высокий уровень разнообразия микробных популяций. Вместе с тем, интенсивное сельское хозяйство значительно влияет на состояние микробного сообщества на возделываемых почвах, изменяя структуру микробоценоза, в котором происходит, как правило, смена доминирующих видов, элиминация полезной почвенной микрофлоры. Поэтому, учитывая растущий интерес потребителей и защитников окружающей среды к натуральному хозяйству и органическому земледелию, как альтернативе традиционного земледелия, основанного на применении химических продуктов, необходимо использовать устоявшиеся природные симбиотические связи для наилучшего роста и развития растений [1-3].

Одним из наиболее интересных развивающихся направлений является изучение эндофитных бактерий. Это – бактерии, которые способны колонизировать внутренние ткани растений, не вызывая при этом патологического процесса и не оказывая отрицательного влияния на его развитие [4, 5]. Практически все растения содержат эндофитные бактерии, каждый от-

дельный вид растения является хозяином для одного и более видов эндофитов. Эти бактерии, как правило, колонизируют межклеточные пространства и могут быть выделены из всех частей растения, включая семена [6].

Эндофитные бактерии выделялись как из однодольных, так и двудольных растений, от древесных, таких как дуб (*Quercus* L.), груша (*Pyrus* L.), тополь (*Populus* L.) и ель (*Picea* A. Dietr.), до травянистых, таких как сахарная свекла (*Beta vulgaris* L.), кукуруза (*Zea mays* L.), сорго (*Sorghum* Moench), соя (*Glycine max* (L.) Merr.), пшеница (*Triticum* L.) и рис (*Oryza sativa* L.) [7-11]. Классические исследования биоразнообразия эндофитных бактерий основывались на характеристике изолятов, полученных из внутренних тканей растений после их поверхностной стерилизации [12, 13]. Подробно список бактериальных эндофитов, включающий в себя как грамположительные, так и грамотрицательные виды, выделяемые из широкого спектра растений-хозяев, был приведен в нескольких обзорах [14, 15]. При исследовании микробных сообществ, населяющих ткани различных сельскохозяйственных растений, в частности, кукурузы, сорго, сои и пшеницы, различными методами почвенной микробиологии, включая традиционное культивирование, анализ последовательностей гена 16S РНК, профиля жирных кислот и утилизации различных источников углерода, наиболее часто определялись *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Microbacterium* и *Pseudomonas* [8, 9]. Изучение микробных сообществ, населяющих ткани растений риса с использованием анализа последовательностей гена 16S РНК показало, что их представители относятся ко всем субклассам филы *Proteobacteria*, филам *Deinococcus-Thermus*, *Acidobacteria*, родам *Cytophaga*, *Flexibacter* (филы *Bacteroidetes*), а также археям. Доминировала группа *Betaproteobacteria*; многие относились к некультивируемым видам бактерий [10]. В проростках тополя, ели и лиственницы были обнаружены эндофитные бактерии из родов *Paenibacillus*, *Methylobacterium*, *Stenotrophomonas* и *Bacillus* [11].

При исследовании функциональной активности выделенных штаммов эндофитных бактерий выяснили, что практически все они стимулируют рост растений за счет улучшения минерального питания. Кроме того, эндофиты продуцируют фитогормоны, витамины, сидерофоры, тем самым, повышая иммунный статус растения и способность его противодействовать патогенным организмам [16-19]. Растения, инокулированные эндофитными бактериями, меньше поражаются патогенными грибами, бактериями, вирусами, насекомыми и нематодами [20-24]. Предполагается, что определенные виды эндофитных бактерий запускают защитные механизмы растений известные как индуцированная системная устойчивость (ISR), которая схожа с приобретенной системной устойчивостью (SAR) [25]. Вместе с тем, было обнаружено, что эндофитные бактерии проявляют целый ряд дополнительных свойств, необходимых для улучшения развития растений, таких как регуляция осмотического давления, регуляция работы ус-

тъиц, модификация развития корневой системы растений, регуляция азотного питания растения [26].

Таким образом, в настоящее время установлено, что большинство растений содержат эндофитные бактерии, положительно влияющие на растения, которые выделены и идентифицированы современными молекулярно-генетическими и биохимическими методами, но достаточно подробно изучен только небольшой ряд растений, содержащих эндофиты. В связи с этим открываются большие перспективы по поиску, выделению и изучению новых видов эндофитных бактерий, положительно влияющих на развитие растений, с целью создания новых микробиологических препаратов для адаптивного растениеводства.

Цель данной работы заключалась в изучении биоразнообразия эндофитных бактерий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и выделении из его тканей штаммов эндофитных бактерий, оказывающих положительное влияние на рост растений.

Материалы и методы

Для осуществления поставленных задач был поставлен вегетационный опыт в 2-х кг сосудах, с использованием легкосуглинистой дерново-подзолистой почвы с pH 6,8, содержанием гумуса 2,3% и полной влагоемкостью (ПВ) 34%. Объект исследования горох посевной (*P. sativum*), линия SGE. Полив растений производили до 60% от ПВ. Растения снимали в стадии созревания семян. Для анализа отбирали неповрежденные стебли гороха у прикорневой зоны. Стебли тщательно промывали под проточной водой, разрезали поперек на мелкие фрагменты, торцы которых заливали парафином. Подготовленные фрагменты подвергали трехступенчатой стерилизации 70% этиловым спиртом и 30% гипохлоритом натрия. Одновременно были поставлены контрольные эксперименты для проверки эффективности наружной стерилизации фрагментов [27]. Стерилизованные фрагменты стеблей помещали в фарфоровые ступки и растирали в стерильных условиях с добавлением небольшого количества дистиллированной воды. Полученную суспензию высевали на ряд питательных микробиологических сред: триптон-соевый агар, малопитательный агар R2A (для высева гетеротрофных бактерий), среду Кинга (для высева псевдомонад), глюкозо-пептонный агар (для высева ризосферных бактерий).

Выделенные бактерии изучали с помощью морфолого-культуральных признаков и биохимическими методами [28]. Фитостимулирующие свойства бактерий, их фитотоксическую активность и способность синтезировать витамины оценивали традиционными методами [29-31].

Результаты и обсуждение

В результате эксперимента из стеблей гороха (*P. sativum*) было выделено 47 морфотипов бактерий, среди которых гетеротрофные и олиготрофные бактерии распределились в соотношении 26:21, соответственно. Из выделенных бактерий, 15 штаммов отнесены к грамположительным спо-

рообразующим бактериям из рода *Bacillus*. Все остальные относятся к грамотрицательным бактериям.

Практически все выделенные бактерии стимулировали рост тест-растений и синтезировали витамины. Ни один из штаммов не оказывал токсического действия на рост тест-растений.

Таким образом, горох посевной (*P. sativum*) содержит эндофитные бактерии, которые положительно влияют на рост и развитие растений. В дальнейшем предполагается идентифицировать выделенные штаммы, а также изучить микробиом гороха в целом с использованием молекулярно-генетических методов.

Работа выполнена при поддержке Государственными контрактами Минобрнауки (П760, 16.552.11.7047, 16.M04.11.0013).

Литература

1. Lindow S.E., Brandl M.T. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 1875–1883.
2. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. // Mol. Plant Microbe Interact. 2004. V. 17. P. 6–15.
3. Berg G., Eberl L., Hartmann A. // Environ. Microbiol. 2005. V.7. P. 1673–1685.
4. Holliday P. A. // Dictionary of Plant Pathology. 1989. Cambridge University Press, Cambridge.
5. Schulz B., Boyle C. What are endophytes? Microbial Root Endophytes. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., / Ed. Sieber T.N. Springer-Verlag, Berlin. 2006. P.1–13.
6. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. // J. Nat. Prod. 2004. V. 67. P. 257–268.
7. Posada F., Vega F.E. // Mycologia. 2005. V. 97. P. 1195–1200.
8. Franks A., Ryan P.R., Abbas A., Mark G.L., O’Gara F. // Molecular Tools for Studying Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Molecular Techniques for Soil and Rhizosphere Microorganisms. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK. 2006.
9. Zinniel D.K., Lambrecht P., Harris N.B., Feng Z, Kuczmariski D., Higley P., Ishimaru C.A., Arunakumari A., Raul B.G., Vidaver A.K. // Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 5. 2002, p. 2198–2208
10. Sun L., Qiu F., Zhang X., Dai X., Dong X., Song W. // Analysis. Microb. Ecol. 2008. V. 55. P. 415–424.
11. Ulrich K., Stauber T., Ewald D. *Paenibacillus*—a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2008. V. 93. P. 347–351.
12. Miche L., Balandreau J. // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67 P. 3046–3052.
13. Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M., van der Lelie D. // Crit. Rev. Plant Sci. 2002. V. 21. P. 583–606.
14. Rosenblueth M., Martinez-Romero E. // Mol. Plant Microbe Interact. 2006. V. 19 P. 827–837.
15. Berg G., Hallmann J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. Microbial Root Endophytes. / Eds. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. Springer-Verlag, Berlin. 2006. P. 53–69.
16. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N. // FEMS Microbiol. Lett. 2008. V. 278. P. 1–9.
17. Verma S.C., Ladha J.K., Tripathi A.K. // J. Biotechnol. 2001. V. 91. P. 127–141.

18. Costa J.M., Loper J.E. // Mol. Plant Microbe Interact. 1994. V. 7. P. 440–448.
19. Pirttila A., Joensuu P., Pospiech H., Jalonen J., Hohtola A. // Physiol. Plant. 2004. V. 121 P. 305–312.
20. Berg G., Hallmann J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. Microbial Root Endophytes. / Eds. Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. Springer-Verlag, Berlin. 2006. P. 53–69.
21. Malfanova N, Kamilova F, Validov S, Shcherbakov A, Chebotar V, Tikhonovich I, Lugtenberg B. // Microbial Biotechnology. 2011.4: 523-532.
22. Kerry B.R. // Ann. Rev. Phytopath. 2000. V. 38. P. 423–441.
23. Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. // Crit. Rev. Plant Sci. 2000. V. 19. P. 1–30.
24. Ping L., Boland W. // Trends Plant Sci. 2004. V. 9. P. 263–266.
25. Ryan R.P., Ryan D.J., Sun Y.C., Li F-M., Wang Y., Dowling D.N. // FEMS Microbiol. Lett. 2007. V. 268 P. 40–46.
26. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. // Appl. Environ. Microbiol. 2005a. V. 71. P. 4951–4959.
27. Hallmann J., Berg G., Schulz B. Microbial Root Endophytes. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.). Soil Biology, Volume 9. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006. P. 209-314
28. Практикум по мікробіології. / Теппер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. М.: Дрофа. 2004. - 256 с.
29. Громов Б.В., Тумова Н.Н. 1999. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института ЛГУ-Л., с. 3 - 27.
30. Берестецкий О.А. 1978. // Фитотоксические свойства микроорганизмов. Л. с. 7-30.
31. Возняковская Ю.М. 1969. Микрофлора растений и урожай. Л.: Изд-во «Колос».

БІЛЯВСЬКА Л.О.¹, ПІДЛІПСЬКА В.А.², МУКВИЧ М.С.¹

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Україна, Д03680, Київ МПС, вул. Академіка Заболотного 154, e-mail: biluyvskal@ukr.net

² ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна, 03022, Київ, вул. Академіка Глушкова 4

СТВОРЕННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВІДБОРУ АКТИВНИХ ВАРІАНТІВ STREPTOMYCES AVERMITILIS УКМ АС-2160 ПІСЛЯ НГ-МУТАГЕНЕЗУ

Серед мікроорганізмів, що використовуються в промисловості, особливе місце займають ґрунтові бактерії роду *Streptomyces*, які є важливим джерелом багатьох вторинних метаболітів з широким діапазоном біологічної дії (вітаміни групи В, гетероауксини, гібереліни, імуномодулятори, антибіотики тощо) на основі яких розроблено велику кількість біопрепаратів [3, 4].

Важливим завданням виробництва мікробних препаратів є підвищення біосинтетичної активності продуцентів, оскільки, їх промислове виробни-

цтво можливе лише за умови існування високопродуктивних конкурентоспроможних штамів. Для його вирішення можна застосовувати індукований мутагенез з використанням хімічних мутагенів, зокрема N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (нітрогуанідин, НГ). Це мутагенний агент, що індукує мутації переважно в точці реплікації ДНК. За умови обробки нітрозогуанідином несинхронізованої суспензії спор стрептоміцета можна надіятися на появу мутацій в різних локусах хромосоми [2].

Так, *Streptomyces avermitilis* синтезує комплекс авермектинів – макролідний антибіотик, що характеризується вираженою інсектицидною, акарицидною, нематодичною та фунгіцидною активностями, малими нормами витрат, порівняно швидко розкладається і є перспективним для широкого використання [6]. На основі авермектину створено ряд препаратів для регулювання чисельності екто- та ендопаразитів рослин, тварин і людини. Відсутність негативного впливу на організми теплокровних тварин, бджіл і гідробіонтів надає авермектину значну перевагу перед хімічними засобами захисту рослин та тварин, оскільки вони є екологічно безпечними [5].

Співробітниками відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України було виділено з ґрунту два штами *S. avermitilis* [8]. Один з них депонований в Колекції мікроорганізмів ІМВ НАНУ під номером УКМ Ас-2160. Він є малоактивним природним продуцентом авермектинів. Для подальшого проведення селекційних робіт з метою підвищення авермектинсинтезуючої активності *S. avermitilis* УКМ Ас-2160 необхідне створення надійної тест-системи для полегшення в якісному відборі варіантів з підвищеною здатністю до накопичення авермектинів.

Враховуючи наведені вище міркування, метою даної роботи було: простежити появу активних варіантів та виділення ауксотрофних мутантів під дією N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину; створити тест-систему для відбору плюс-варіантів.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був природний штам *Streptomyces avermitilis*, депонований в Українській Колекції мікроорганізмів під номером УКМ Ас-2160. При поверхневому вирощуванні на КГА він утворював 36 мкг авермектинів в 1 мл етанольного екстракту.

Для зберігання культури, накопичення спорового матеріалу та отримання НГ-варіантів використовували картопляно-глюкозне середовище (КГА) та агаризоване синтетичне середовище Цімбуркової для виявлення ауксотрофних мутантів [1, 7]. Стрептоміцет вирощували при температурі 28 °С протягом 14 діб.

Вміст авермектину визначали колориметричним методом із використанням орцину. Здатність до продукування антибіотику оцінювали за кількістю авермектинів (мкг) в 1 мл етанольного екстракту з міцелію стрептоміцета [7].

Мутагенез під дією нітрозогуанідину проводили в цитратному буфері рН 5,5 при кінцевій концентрації мутагену 2,5 мг/мл та експозиції 15, 30,

45 та 60 хвилин. Ідентифікацію ауксотрофних мутантів проводили ауксонографічним методом [1, 2]. В досліджах по створенню тест-системи використовували барвник 0,04% розчин фенолрот з розрахунку 50 мкл на 100 мл середовища.

Результати та обговорення

В даній роботі варіанти, одержані після НГ-мутагенезу, а саме, при експозиції 15 хв, були піддані всебічному аналізу. При цій експозиції виживання *S. avermitilis* УКМ Ас-2160 становило 32,5%. Методом реплік та шляхом тотального відсіву було перевірено понад 6000 колоній, серед яких попередньо було виділено 260 ауксотрофних варіантів, частота появи останніх складала 0,043. Ті варіанти, що відповідали критерію ауксотрофності, були ідентифіковані. Спектр морфологічних колоній був значним, як це було показано і раніше для іншого селекціонованого штаму стрептоміцета продуцента авермектинів [7]. Можна відмітити, що серед інших типів колоній переважали дрібні, типу «minute».

Згідно з класичними уявленнями щодо синтезу біологічно активних речовин стрептоміцетами, варіанти, відібрані з колоній які добре росли та спорулювали, як правило, є біосинтетично активними [7, 9, 10]. Нами було вказано припущення, що наявність у НГ-варіантів темно-коричневого субстратного міцелію та зміна забарвлення агаризованого середовища навколо окремих колоній, можливо також корелює із їх здатністю до синтезу авермектинів.

Тому, відбір колоній для перевірки авермектинсинтезуючої здатності біосинтетичної активності після НГ-мутагенезу проводили за цим критерієм. З цією метою розсів мутагенізованої суміші *S. avermitilis* УКМ Ас-2160 проводили на КГА та після отримання окремих колоній на чашці робили репліки на середовище з барвником фенолрот та без нього. Інтенсивність забарвлення субстратного міцелію була різною: від світло-сірого до темно-коричневого, при цьому змінювався колір середовища навколо колоній (рис 1).

Таким чином, було перевірено авермектинсинтезуючу здатність отриманих варіантів. Серед останніх відмічено появу як плюс- (30%), так і мінус (70%) варіантів. Плюс-варіанти були в основному ті, що змінювали забарвлення середовища. Біосинтетична активність окремих варіантів зростала, зокрема у варіанта № 75 вона була майже у 2,5 рази вищою (на 247%) від такої вихідного штаму УКМ Ас-2160. В роботі відмічено кореляцію між забарвленням субстратного міцелію та зміною кольору агаризованого середовища з барвником і біосинтетичною активністю відповідних варіантів, що може бути основою для створення тест-системи з метою полегшення відбору варіантів з підвищеним рівнем накопичення авермектинів при застосуванні НГ-мутагенезу.

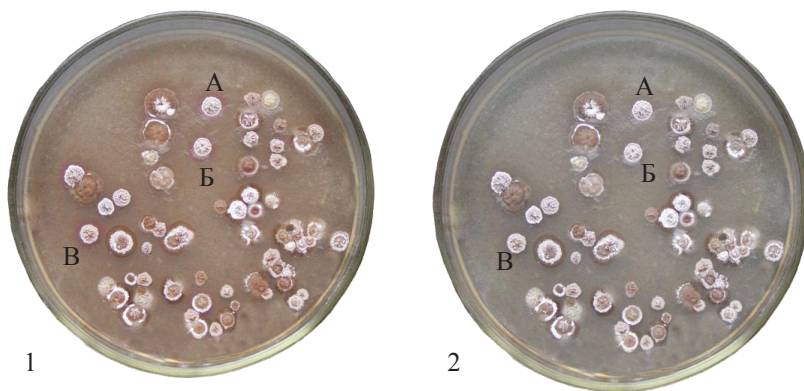


Рис. 1. Репліки мутагенізованої суспензії *S. avermitilis* УКМ Ас-2160 на КГА з фенолротом (1) та без нього (2): а-в – зміна забарвлення агаризованого середовища за наявності чи відсутності барвника

Висновки

1. Показано доцільність застосування НГ-мутагенезу для відбору варіантів *S. avermitilis* УКМ Ас-2160 з підвищеною біосинтетичною активністю, яка зросла майже у 2,5 рази порівняно з вихідним природним штамом.
2. Відмічено кореляцію між забарвленням субстратного міцелію та зміною кольору агаризованого середовища з барвником фенолрот та біосинтетичною активністю, що може слугувати для створення надійної тест-системи для відбору активних варіантів у *S. avermitilis* УКМ Ас-2160.

Література

1. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов.- М.: Высшая шк., 1988.- 208 с.
2. Дубицька Л., Федоренко В. Характеристика мутантів штаму *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952-2, стійких до хлорамфеніколу // Вісник Львів. Ун-ту, 2002. - Вип.28. С.105-113.
3. Дятлова К.Д. Микробные препараты в растениеводстве // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 5. – С. 17-22.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. –М.: Изд-во МГУ, 2004. – 512 с.
5. Иутинская Г.А. Разработка комплексных препаратов на основе микроорганизмов и фиторегуляторов // Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве. Сборник материалов конференции (12-16 июня, Киев). – Modern concepts in agriculture Radostim. – 2007. – Р. 52-55.
6. Мосин В.А., Круляк Е.Б., Стерлина Т.С. и др. Действие авермектинов на клетки Р – 388 in vitro // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. - № 6. – С. 12-15.
7. Петрук Т.В., Білявська Л.О., Козирицька В.Е., Мукович М.С. Підвищення біосинтезу авермектинів *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2161 під впливом нітрозогуанідину // Мікроб. журн., 2004. - 66, № 6. – С. 24-29.

8. Петрук Т.В., Козирицька В.Є., Валагурова О.В., Іутинська Г.О. Стрептоміцети – продуценти екологічно чистих речовин антипаразитарної дії // Еколого-біологічні дослідження на природних та антропогенно-змінених територіях. – Збірник тез. – Кривий Ріг. – 2002. – С. 302-303.

9. Kumaresan K.R., Springhorn S.S., Lacks S.A. Lethal and mutagenic actions of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine potentiated by oxidized glutathione, a seemingly harmless substance in the cellular environment // J. Bacteriol. – 1995. – 177. – P. 3641-3646.

10. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J. et. al. Practical Streptomyces genetics. – Norwich. John Innes Foundation., – 2000. – 634 p.

Резюме

Нітрозогуанідин індуківав у *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2160 варіанти з підвищеною авермектінсинтезуючою здатністю. Активність вихідного штаму збільшувалася на 247 %. Значена кореляція між ступенем фарбування субстратного міцелія, середовищем вирощування та біосинтетичною активністю варіантів.

Нітрозогуанідин індуківав у *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2160 варіанти з підвищеною авермектінсинтезуючою здатністю. Активність вихідного штаму збільшилася на 247 %. Існує кореляція між забарвленням субстратного міцелію, середовища культивування та біосинтетичною активністю варіантів.

Nitrosoguanidine is induced in *Streptomyces avermitilis* UCM Ас-2160 variants with increasing avermectinbiosynthesing activity. The activity of initial strain is increased on 247%. Correlation is marked between colour of substrate mycelium, environment of growing and biosynthesing activity of strains.

ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., ЛАВРЕНЧУК В.Я., МАЦЕЛЮХ Б.П.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, ДО3680, Україна

E-mail: Golembiowska@ukr.net

БАГАТОСТУПЕНЕВА СЕЛЕКЦІЯ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ ПО ЛІКОПІНУ МУТАНТІВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 4LCP

У природного безпігментного штаму *Streptomyces globisporus* 1912 – продуцента ландоміцину Е (антибіотика, що проявляє протипухлинну активність) виділено спонтанні та індуквані Crt⁺-мутанти здатні конститутивно продукувати каротиноїди лікопін і бета-каротин [5]. Найпродуктивніші з них представляють інтерес як потенційні промислові продуценти даних сполук, особливо спонтанний мутант 4Lcp, який в 2007 році виділений з розсівів карогінсинтезуючого штаму *S. globisporus* 4 Crt. Методами ТШХ, ВЕРХ та спектрофотометрії визначено, що він утворює 80% лікопіну по відношенню до інших каротиноїдів і не утворює бета-каротину, тоді як штам 4 Crt синтезує 47% лікопіну та 22% бета-каротину [4]. В залежності від складу середовища штам 4Lcp накопичує від 1,8 до 2,2 мг лікопіну на 1 г сухої біомаси [2]. Початково штам 4Lcp втрачав ознаку лікопіноутворення

з високою частотою (1×10^{-2}), подібно до інших Crt^+ -мутантів [3]. Методами селекції у нього відібрано стабільний спонтанний варіант, який утворює безпігментні мутанти з низькою частотою (1×10^{-6}). Але актуальним залишається питання періодичної процедури відбору стабільних варіантів штаму 4Lcr, тому як після тривалого зберігання (більше одного місяця) кількість Crt^+ - колоній у нього зростає. Крім цього, у штаму 4Lcr спостерігається залишкова слабка експресія кластера генів біосинтезу ландоміцину E, що є негативним для продуцентів каротиноїдів і потребує вирішення.

В зв'язку з сказаним вище, метою нашої роботи був відбір високопродуктивних Lcr^+ -мутантів з відсутнім біосинтезом антибіотика у штаму 4Lcr після індукованого мутагенезу ультрафіолетом, нітрозогуанідном, метилметансульфонатом, азотистою кислотою і пероксидом водню та вивчення у нього при цьому мінливості ознаки лікопіноутворення.

Матеріали і методи

В експериментах по індукованому мутагенезу використовували 7-добовий міцелій аспорогенного 4Lcr, вирощений на агаризованому соєво-кукурудзяному середовищі [7]. Після мутагенезу відбиралися колонії, які мали яскравіше, ніж у штаму 4Lcr рожеве забарвлення без ознаки біосинтезу ландоміцину E.

Дози мутагенів: ультрафіолет – 200 Дж/м^2 , нітрозогуанідин – 1 мг в 1 мл реакційної суміші протягом 60 хв, метилметансульфонат – 0,2% протягом 60 хв, азотиста кислота – 1 мМ протягом 45 хв, пероксид водню 2% протягом 60 хв [1, 6].

Первинну ідентифікацію лікопіну у одержаних мутантів здійснювали методом тонкошарової хроматографії на пластинках Chromatofolgas AL HPTLC Silicagel 60 F254 фірми "Merck" [2]. Спектрофотометричний аналіз каротиноїдів визначали за допомогою спектрофотометра Beckman DU-8B при довженні хвилі 472 нм [8].

Результати та обговорення

Із даних, приведених в таблиці 1 видно, що виживання міцелію у штаму 4Lcr після дії вищевказаних концентрацій метилметансульфонату, азотистої кислоти і пероксиду водню знизилося більш ніж на три порядки, а ультрафіолету і нітрозогуанідину на два. Мутагенну дію вказаних агентів оцінювали за двома параметрами: за втратою ознаки лікопіноутворення і за появою Lcr^+ - колоній, що мали яскравіше забарвлення, ніж мутант 4Lcr. Самою ефективною за першим параметром була азотиста кислота. Одержано 251 непігментованих колоній, що складає більше 10% від усіх перевірених, що вижили після дії цього агента. З іншої сторони ультрафіолет як мутаген був малоефективним. Частота появи Lcr^+ - мутантів склала лише один відсоток, хоча вибірка в цьому випадку була значно більшою (8977 колоній). Нітрозогуанідин, метилметансульфонат і пероксид водню значно поступалися азотистій кислоті, але були ефективніші від ультрафіолету.

Аналіз результатів мутагенезу за другим параметром, а саме появи колоній із яскраво рожевим забарвленням, виявив іншу картину. А саме, піс-

Таблиця 1

Індукована мінливість ознаки лікопіноутворення у мутанта 4Lcp під впливом мутагенних факторів

Мутаген	Доза	Виживання, %	Перевірено колоній	Стг ⁻ мутанти		Lcp ⁺ -мутанти	
				Кількість	Частота	Кількість	Частота
УФ	200, Дж/м ²	0,18	8977	11	1,2x10 ⁻³	0	0
НГ	1,0 мг/мл, 60хв	0,12	2700	54	2,0x10 ⁻²	3	1,1x10 ⁻³
ММС	0,2%, 60хв	0,025	1454	23	1,6x10 ⁻²	5	3,4x10 ⁻³
Азотиста кислота	1мМ, 45хв	0,05	1843	251	1,3x10 ⁻⁵	2	1,0x10 ⁻³
Пероксид водню	2%, 60хв	0,03	2050	26	1,3x10 ⁻²	28	1,4x10 ⁻²

ля дії ультрафіолету не виявлено жодної такої колонії, після дії алкілюючих агентів одержано три і п'ять яскравіших колоній, а після дезамінуючого – дві. Найефективнішим у цьому випадку був пероксид водню, після дії якого одержано 28 колоній з інтенсивнішим, ніж у 4Lcp забарвленням поверхневого міцелію. Всі одержані мутанти (38 штук) багаторазово пересівалися суцільним газоном на скошену агаризовану поверхню на предмет залишкової здатності до біосинтезу ландоміцину Е. В кінцевому результаті з цієї групи відібрані два найпродуктивніші мутанти Нр6 і Нр7, які не синтезували антибіотик ландоміцин Е (рис.1).



Рис.1 А – колонії штаму 4Lcp, гени біосинтезу антибіотика експресуються і ландоміцину Е окислюючись, забарвлює середовище; Б – мутант Нр6 не продукує ландоміцину Е і середовище не змінює колір.

Методами ТШХ було підтверджено, що мутанти Нр6 і Нр7 продукують каротиноїд, хроматографічна рухливість якого становить 0,5 і співпадає з Rf вихідного штаму 4 Lcp (рис. 2). Спектрофотометрія очищених пігментів мутантів Нр6 і Нр7 в ацетоні давала три максимуми поглинання (425, 472, 504 нм), що ідентично стандартним даним наведеним в літературі лікопіну томатів [9].

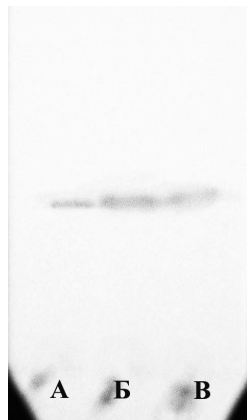


Рис. 2. Тонкошарова хроматографія екстрактів біомаси мутантів: А – штаму 4Lcp, Б – мутант Нр6, В – мутант Нр7.

Мутації, які викликали блокування експресії генів ландоміцину E у мутантів Нр6 і Нр7 скоріш всього різної природи, оскільки опромінення міцелію ультрафіолетом спричинило появу LndE⁺-ревертантів лише у мутанта Нр7, тоді як у Нр6 не виникали зовсім (табл. 2).

Таблиця 2

УФ-індукція LndE⁻ мутацій у мутантів Нр6 і Нр7

Мутант	Мутаген, доза	Вживання, %	Перевірено колоній	LndE ⁺ -мутантів	
				Кількість	Частина
Нр6	УФ 200Дж/м ²	0,32	2530	0	0
Нр7	УФ 200Дж/м ²	0,67	3120	372	1,2x10 ⁻¹

Оскільки у мутанта Нр6 не одержано жодного LndE⁺- ревертанта, то можливо він є делеційним мутантом або частота появи ландоміцинсинтезуючих варіантів нижча за 1x10⁻³. Щодо мутанта Нр7, то у нього ця величина досить висока і становить 1,9x10⁻¹. Необхідно зазначити, що мутанти Нр6 і Нр7 стабільно зберігають LndE⁻ - ознаку, але продовжують дисоціювати за Lcp-ознакою, утворюючи безпігментні варіанти і вимагають періодичної підтримуючої селекції. Обидва мутанти є кращими продуцентами лікопіну, ніж штам 4Lcp. Активність даних мутантів є досить високою в порівнянні з штамом 4Lcp. Біосинтез у них лікопіну при вирощуванні на природних середовищах протягом 72год при 28°C складає від 2,5 до 4,2 мг на 1 грам су-

кої біомаси, тоді як у штаму 4Lcp граничний рівень продуктивності становить 2,2 мг на 1 грам сухої біомаси.

Висновки

1. Нітрозогуанідин, метилметансульфонат і пероксид водню здатні індукувати у штаму 4 Lcp активні лікопінсинтезуючі колонії, тоді як ультрафіолет – ні. Найефективнішим індуктором Lcp⁺- мутацій виявився пероксид водню.

2. Одержані внаслідок багатоступінчастої селекції мутанти Нр6 і Нр7 при вирощуванні на природних середовищах синтезують до 4,2 мг/г СБМ лікопіну, але вимагають періодичної підтримуючої селекції за ознакою лікопіноутворення.

Література

1. Голембіовська С.Л., Лаврінчук В.Я., Мацелюх Б.П. Резистентність до летальної дії УФ – променів кольорових та білих мутантів *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 5. – С. 23 – 27

2. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Продуктування каротину і лікопіну мутантами *Streptomyces globisporus* 1912. Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 4. – С. 45-50.

3. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Спонтанна та індукована мінливість ознаки біосинтезу каротиноїдів *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2008. – 70, № 6. – С. 18 – 23

4. Голембіовська С.Л., Остапчук А.М., Мацелюх Б.П. Біосинтез каротиноїдів представниками роду *Streptomyces*. Фактори еволюції живих систем, Алушта, 2009. – С. 283 – 287

5. Мацелюх Б.П., Лутченко В.А., Поліщук Л.В. Синтез каротиноїдів мутантними штамми *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2003. – Т. 65, № 6. – С. 24-30.

6. Мацелюх Б. П., Лаврінчук В. Я. Одержання і характеристика мутантів *Streptomyces globisporus* 1912, дефектних по біосинтезу ландоміцину Е // Мікробіол. журн. – 1999. – 61, № 4. – С. 22-27.

7. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. Справочник. / С.М. Семенов - Москва: Из-во Мир. - 1978. - С. 134-140

8. Феофилова Е.П. Каротиноиды грибов: биологические функции и практическое использование. Прикладная биохимия и микробиология. - 1994. - 30. - ст. 181 – 196.

9. Takano H., Obitsu S., Beppu T., Ueda K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster // J. Bacteriol. - 2005. - 187, N 5. - P. 1825-1832.

Резюме

У штаму 4Lcp з фенотипом Lcp⁺LndE⁺ під впливом хімічних факторів було виділено серію Lcp⁺LndE⁻-мутантів, з яких відібрано два Нр6 і Нр7 варіанти, що представляють інтерес для подальших досліджень.

The series of Lcp⁺LndE⁻ -mutants have been obtained from the initial strain 4Lcp after action of chemical mutagens. Among of this series mutants Нр6 and Нр7 have been efficient in the synthesis of lycopene and it will be perspective industrial produce.

**ГОРБАЛЬ Л.О., МИРОНОВСЬКИЙ М.Л., РАБИК М.В.,
МАКІТРИНСЬКИЙ Р.П., ОСТАШ І.С., ГРУБСЬКИЙ Я.П.,
КЛИМИШИН Д.О., ГРЕНЬ Т.П., ЦИПК О. В., ЛОПАТНЮК М.М.,
МУТЕНКО Г.В., ГРОМИКО О.М., ОСТАШ Б.О., ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М*.,
БЕХТОЛЬД А**., ФЕДОРЕНКО В.О.**

*Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна, 79005, Львів,
вул. Грушевського 4, e-mail: y.fedorenko@franko.lviv.ua*

**Helmholtz Institute for Pharmaceutical Research, Saarland Campus, Building C2.3,
66123 Saarbrücken, Germany*

***Albert Ludwigs University of Freiburg, Stefan-Meier-Str. 19, 79104 Freiburg,
Germany*

РЕГУЛЯТОРНІ ГЕНИ АКТИНОМІЦЕТІВ: НОВІ ІНСТРУМЕНТИ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ БІОСИНТЕЗУ АНТИБІОТИКІВ І КОНСТРУЮВАННЯ ЇХНІХ ПРОДУЦЕНТІВ

Актиноміцети продукують більше, ніж 70 % відомих сьогодні біологічно активних сполук мікробного походження. Проте їхній потенціал цим не обмежується, адже у геномах цих бактерій містяться десятки “мовчазних” кластерів генів біосинтезу антибіотиків та інших вторинних метаболітів. Очевидно, що реалізація цього потенціалу, як і раціональне конструювання промислових продуцентів антибіотиків, не можливі без розуміння механізмів регуляції вторинного метаболізму і морфогенезу актиноміцетів. Аналіз секвенованих геномів та експериментальне дослідження регуляції біосинтезу антибіотиків свідчить про існування десятків генів, продукти яких задіяні в регуляцію вторинного метаболізму, яка відбувається на різних рівнях [1]. Однак мало відомо про функції більшості потенційних регуляторних генів, взаємозв'язки між регуляторами різних рівнів, сигнальні механізми, які впливають на регуляторні процеси тощо. Тому виявлення нових генів-регуляторів, розробка методів, які дають змогу швидко та результативно вивчити їхні функції, а також використовувати їх для конструювання високопродуктивних продуцентів, є актуальною і важливою проблемою. Водночас стрімкий розвиток структурної і функціональної геноміки актиноміцетів створив принципово нові можливості для її вирішення із застосуванням підходів синтетичної біології. У цій роботі коротко узагальнено результати досліджень регуляції біосинтезу антибіотиків, проведених в останні роки на кафедрі генетики та біотехнології ЛНУ імені Івана Франка у співпраці з вченими з Фрайбурзького університету та Інституту фармацевтичних досліджень (м. Саарбрюкен, ФРН)

Нові системи для нокаутування та аналізу експресії генів актиноміцетів. Використання репортерних генів – ефективний інструмент вивчення експресії генів. Нами сконструйовано нову, високочутливу репортерну систему, в якій використано синтетичний ген β-глюкуронідази *uidA* *E. coli* з замінами кодонів на синонімічні, що частіше трапляються в гено-

мах стрептоміцетів [2]. В інтегративному векторі pSETGUS і реплікативному векторі pKC1139GUS цей ген експресовано в *Streptomyces lividans* 1326, *S. coelicolor* M600, *Streptomyces* sp. Tu6071, *S. albus* J1074, *S. ghananaensis* ATCC 14672 і *Actinoplanes teichomyceticus* NRLL-B16726. Штами, що містили ці плазміди, мали β-глюкуронідазну активність, яку виявляли за зонами утворення 5,5'-дибром-4,4'-дихлор-індиго навколо колоній після обробки X-glc. Отримано вектори з геном *uidA* для швидкого візуального скринінгу клонів стрептоміцетів із нокаутами генів за кольором їхніх колоній. Ця методика дає змогу значно пришвидшити пошук клонів актиноміцетів з нокаутами досліджуваних генів. Створено кон'югативні інтегративні вектори pGUS та pGUSHL4aadA (містять *oriT*, ген інтегрази *int* бактеріофага φC31 та сайт *attP*) для транскрипційного і трансляційного злиття з *uidA*. pGUS містить безпромоторний ген *uidA* та термінатори *T4 term* з 5'-кінця від нього, що унеможливають його транскрипцію з промоторів інших генів, і полілінкер для клонування досліджуваних промоторів. Вектор pGUSHL4aadA несе безпромоторний ген *uidA*, що не містить старт-кодону, а також *T4 term*. Перед геном *uidA* розташований полілінкер для клонування досліджуваних генів без стоп-кодону, у такий спосіб здійснюючи їх злиття з *uidA*. Цей вектор містить сайти впізнавання *loxP* для рекомбінази Cre, які дають змогу видалити частину цього вектора з геном *aac(3)IV*, після інтеграції вектора у хромосому стрептоміцета. За допомогою ПЛР-мутагенезу отримано варіанти гена *uidA*, в яких старт-кодон АТГ замінений на кодони ТТГ, ГТГ, та ЦТГ. Ці варіанти клоновано в інтегративний вектор pSET152 і перенесено у *S. albus* J1074 і *Streptomyces* sp. Tu6071. З'ясовано, що старт-кодон ТТГ зумовлював найвищий, АТГ і ГТГ – середній, а ЦТГ – найнижчий рівень трансляції мРНК гена *uidA*. Варіанти гена *uidA* зі зміненими старт-кодонами можуть бути використані як репортери з різною ефективністю трансляції мРНК.

Існуючі регульовані системи експресії генів стрептоміцетів недосить надійні, оскільки вони «протікають» – за відсутності індукції на низькому рівні відбувається експресія генів, які знаходяться під контролем індукцибельних промоторів. Нами створено нову індукцибельну систему регульованої експресії генів для стрептоміцетів на основі генної касети з архебактерії *Methanosarcina acetivorans*, що дає змогу транслювати стоп-кодон УАГ мРНК з включенням у білок залишку піролізину та його аналогів, зокрема N-ε-циклопентилоксикарбоніл-L-лізину (Сус). Ця касета містить п'ять генів: *pylT*, що кодує піролізинову тРНК, антикодон якої комплементарний УАГ-кодону мРНК, *pylS* – піролізил-тРНК синтетаза, а також *pylB*, *pylC* і *pylD*, які контролюють біосинтез піролізину. Створено вектор pSOKTpyr-tsrg, що містить гени *pylT* та *pylS*, оптимізовані за складом синонімічних кодонів для експресії в клітинах стрептоміцетів. Його використано для супресії стоп-кодону УАГ мРНК. Як контрольований ген використано варіант гена *uidA* із стоп-кодомом ТАГ у першому положенні після старт-кодону.

За присутності Суs у середовищі стоп-кодон мРНК зчитується з утворенням функціонального білку, що свідчить про включення Суs у білок. За відсутності індуктора (Суs) не відбувається трансляція ТАГ-вмісних мРНК. Це вказує на те, що створена індукцибельна система „не протікає”. Замість гена ТАГ-*uidA* можна використати будь-який ген, експресію якого необхідно контролювати.

Використання генів регуляції біосинтезу антибіотиків для пошуку нових сполук. На основі генів, що кодують ліганд-залежні транскрипційні фактори, можна створювати репортерні системи для скринінгу певних класів молекул. Цей підхід успішно застосовано нами для розробки систем експрес-скринінгу вторинних метаболітів ландоміцинового і тіострептонового рядів. Для репортерної системи виявлення ландоміцинів використано ген *lanK*, що кодує TetR-подібний репресор гена протонзалежного транспортера ландоміцинів *lanJ* і промотор цього гена *lanK_{Jp}* [3]. Як репортерний використано ген аміноглікозидфосфотрансферази *neo*, продукт якого спричиняє стійкість до неоміцину і канаміцину. Білок LanK репресує експресію гена *neo* з промотора *lanK_{Jp}* у клітинах стрептоміцетів за відсутності ландоміцинів з довгими глікозидними ланцюгами (не менше, ніж з трьома залишками вуглеводів). Репотерний штам не росте на середовищах з канаміцином. Якщо ж у середовищі присутні ландоміцини – ліганди LanK, то він росте на цих середовищах. Це наслідок звільнення промотора *lanK_{Jp}* від комплексу ландоміцин-LanK, що запускає експресію *neo*. Ключовою знахідкою стало те, що описана репотерна система реагує не тільки на природні ландоміцини, а й на низку ландоміцинів зі зміненим агліконом, які отримані у ході генно-інженерних експериментів [4]. Тому ця система дає змогу швидко і специфічно виявляти у неочищених екстрактах, чи навіть в агарових блоках з газонів культур як відомі, так і нові ландоміцини. Це значно спрощує скринінг природних сполук ландоміцинового ряду, оскільки для аналізу потрібно субмікрограмові кількості матеріалу. Концептуально подібно систему нами розроблено для виявлення тіопептидів, що також доволі неспецифічна щодо лігандів [5].

Використання транспозонного мутагенезу для пошуку нових генів, що контролюють біосинтез антибіотиків. Мутагенез, зумовлений транспозонами, яким властива низька специфічність інсерцій в хромосоми актиноміцетів, можна використати для пошуку і вивчення генів, що контролюють біосинтез антибіотиків, зокрема тих, що містяться за межами кластерів генів. Нами використано вектор pALHIM, що містить похідний транспозону надродини *mariner* – Himar – з геном апраміцин-стійкості *aac(3)IV* і термочутливим репліконом плазміди pSG5. Ген транспозази *tnp-him* має змінений кодонний склад, оптимізований для використання в актиноміцетах, і контролюється тіострептон-індукцибельним промотором *tipAp*. Після перенесення вектора у клітини актиноміцетів переміщення транспозону відбувається не одразу. Це дає змогу розмножити клітини з вектором, а

потім індукувати транспозицію транспозону. Доведено, що інсерції Himar у хромосоми актиноміцетів мають випадковий характер. Вектор pALHIM з Himar використано для пошуку генів, що впливають на продукцію сіоміцину штамом *S. sioyaensis* Lv81. Загалом отримано та проаналізовано більше 30000 індивідуальних транспозонних мутантів. У мутантів з порушеною продукцією сіоміцину більшість інсерцій відбулись у гени біосинтезу антибіотика *sioB*, *sioG*, *sioH*, *sioJ*, *sioN*, *sioO*, *sioQ* і *sioS*. Цей підхід не тільки дав змогу вперше отримати мутації в структурних генах синтезу сіоміцину, але й виявити чотири позакластерні гени, руйнування яких спричиняло припинення утворення антибіотика: ймовірної β -субодиниці рибофлавінсинтази, орнітин-ацетилтрансферази, секреторної протеази та ймовірної фосфосерин-амінотрансферази. Ефективність мутагенезу, зумовленого транспозоном Himar, доведена під час пошуку кластеру генів антибіотика стрептотрицинового ряду у штамі *Streptomyces* sp. 4-39, виділеного зі зразків ґрунту Кримського півострова. Проаналізувавши антибіотичну активність 8000 окремих транспозонних мутантів, виявили 90, які не пригнічували ріст тест-культур *E. coli* та *B. subtilis*. Проаналізувавши сайти інтеграції транспозона в 34 таких мутантів, виявлено кластер з 16 генів, в тому числі регуляторних, які відповідають за біосинтез цієї сполуки.

Використання генів плейотропних регуляторів для конструювання штамів продуцентів антибіотиків. Зміни у регуляторній мережі синтезу антибіотиків є одним з найбільш перспективних підходів до отримання штамів-надпродуцентів. Кластери генів біосинтезу моеноміцину А (ММА) і сіоміцину не містять шлях-специфічних регуляторів їхнього біосинтезу. Наявність секвенованого геному штаму *S. ghanaensis* ATCC14672 дало можливість порівняти його з геномом модельного об'єкту *S. coelicolor* і виявити низку ортологів плейотропних регуляторних генів. Зокрема, в *S. ghanaensis* ідентифіковано такі ортологи як *wblA_{gh}*, *ppk_{gh}*, *absA2_{gh}*, *absB_{gh}*, *adpA_{gh}* та *bldA_{gh}*. Функції цих генів досліджено шляхом спрямованої інактивації, надекспресії та гетерологічної експресії. Ген *wblA_{gh}*, білковий продукт якого характеризується високим рівнем подібності до регуляторів родини Wbl, негативно регулює синтез ММА. Він також задіяний у регуляції морфогенезу *S. ghanaensis* [6]. Продукт гена *ppk_{gh}* гомологічний до бактерійних поліфосфаткіназ. Внесення додаткових його копій зумовлює зниження рівня продукції ММА. Імовірно, що продукт цього гена задіяний у негативній регуляції біосинтезу. Надекспресія *absA2_{gh}* – гена білка-ефектора двокомпонентної системи AbsAgh1/2 і його гетерологічна експресія призводить до зниження синтезу ММА у *S. ghanaensis* та актинородину у *S. coelicolor*. Проте, нокаут цього гена не виявляє жодного ефекту, як на синтез моеноміцинів, так і на морфологічний розвиток штаму, що вказує на те, що ця система не відіграє провідної ролі у регуляції біосинтезу фосфогліколідів. Нокаут гена *absB_{gh}*, продуктом якого є РНКазу типу III, спричиняв суттєве збільшення продукції ММА. Позитивний ефект на біосинтез

цього антибіотика також мала надекспресія плейотропного активатора транскрипції *adpA_{gh}*. Здійснено гетерологічну експресію трьох плейотропних регуляторних генів, а саме *absB*, *relA* (кодує (p)ppGpp-синтетазу) та *afsS* (кодує білок-шаперон, задіяний у контролі експресії генів *actII-ORF4* та *redD* у *S. coelicolor*). у штамі продуценті сіоміцину *S. sioyaensis*. Ген *absB* було ампліфіковано із геному *S. ghanaensis*, а гени *relA* та *afsS* – з геному *S. coelicolor*. Надекспресія гена *relA* не приводить до змін у продукції сіоміцину. У випадку генів *absB* та *afsS* помічено значне зростання продукції сіоміцину відповідними трансконюгантними штамми. Можна припустити, що геном *S. sioyaensis* містить гени-гомологи *absB* та *afsS* генів, які беруть участь у позитивній регуляції біосинтезу сіоміцину. Наші результати вказують на те, що надекспресія плейотропних регуляторних генів позитивного типу і, навпаки, руйнування генів негативних регуляторів є перспективним напрямом у конструюванні штамів з підвищеним синтезом антибіотиків.

Подяки. Дослідження у лабораторії проф. Федоренка В. О. підтримано грантами МОНмолодьспорту Бз-01Ф, Бз-98Ф, Бз-48П, Бз-97П.

Література

1. Wezel G., McDowall K. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances // Nat. Prod. Rep. – 2011. – Vol. 7. – P. 1311–1333.

2. Myronovskiy M., Welle E., Fedorenko V., Luzhetskyy A. Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – Vol. 77, N15. – P. 5370–5383.

3. Ostash I., Ostash B., Luzhetskyy A., Bechthold A., Walker S., Fedorenko V. Coordination of export and glycosylation of landomycins in *Streptomyces cyanogenus* S136 // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – Vol. 285. – P. 195–202.

4. Ostash B., Ostash I., Zhu L., Kharel M., Luzhetskyy A., Bechthold A., Walker S., Rohr J., Fedorenko V. Properties of *lanK*-based regulatory circuit involved in landomycin biosynthesis in *Streptomyces cyanogenus* S136 // Генетика – 2010. – Т. 46, №5. – С. 604–609.

5. Myronovskiy M., Ostash B., Ostash I., Fedorenko V. A gene cloning system for the siomycin producer *Streptomyces sioyaensis* // Folia Microbiol. – 2009. – Vol. 54. – P. 91–96.

6. Rabyk M., Ostash B., Rebets Y., Walker S., Fedorenko V. *Streptomyces ghanaensis* pleiotropic regulatory gene *wblA_{gh}* influences morphogenesis and moenomycin production // Biotechnol. Lett. – 2011. – Vol. 33, N12. – P. 2481–2486.

Резюме

Використовуючи підходи синтетичної біології, нами створено нову репортерну і транспозонну системи для вивчення експресії актиноміцетних генів і їхнього транспозонного мутагенезу, відповідно. Останній підхід успішно застосовано для виявлення нових генів, що задіяно у біосинтезі антибіотиків. На основі шлях-специфічних і плейотропних генів-регуляторів вторинного метаболізму опрацьовано нові підходи до скринінгу природних сполук і конструювання штамів-надпродуцентів промислово важливих антибіотиків.

Используя подходы синтетической биологии, нами созданы новые репортерные и транспозонные системы анализа экспрессии актиномицетных генов и их транспозонного мутагенеза, соответственно. Последний подход успешно использован для выявления новых генов биосинтеза антибиотиков. На основе специфичных и плеiotропных генов-регуляторов вторичного метаболизма отработаны новые подходы к скринингу естественных соединений и конструирования штаммов-сверхпродуцентов промышленно важных антибиотиков.

Applying synthetic biology methods, we developed novel reporter and transposon systems for studies on expression of actinomycete genes and their transposon mutagenesis, respectively. The latter approach has been successfully used for identification of a number of new genes for secondary metabolism. Capitalizing on pathway-specific and pleiotropic regulatory genes, novel approaches have been developed towards the screening of natural compounds and rational construction of strains-overproducers of industrially important antibiotics.

ГРИЦАЙ Р.В.^{1,2}, ГНАТЮК Т.Т.², ОЛІЙНИК Т.М.¹ ЗАХАРЧУК Н.А.¹, СЛОБОДЯН С.О.¹, ПАТИКА В.П.²

¹Інститут картоплярства НААН України, вул. Чкалова, 22, смт. Немішаєве, Київ. обл., Україна, e-mail: r.v.gritsay@gmail.com

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАНУ, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна, e-mail: morgauza@ukr.net

ІДЕНТИФІКАЦІЯ НОВИХ ШТАМІВ, ВИДЛЕНИХ ІЗ СОЇ З СИМПТОМАМИ ІРЖАВО-БУРОЇ ПЛЯМИСТОСТІ

Розповсюдження різних типів бактеріозів сої неоднакове і залежить від умов сучасної господарської діяльності людини. Кількість чинників впливу на довкілля невинно зростає, що має важливе значення для формування і функціонування мікробних угруповань на рослинах сільськогосподарського призначення, зокрема сої. В зв'язку з цим потрібен постійний моніторинг не тільки розповсюдження основних добре вивчених бактеріальних хвороб сої в Україні, а й за новими тенденціями в фітопатології цієї культури. Тому метою роботи було виявлення не характерних для сої збудників бактеріозів в Україні та їх ідентифікація за фенотиповими і генотиповими ознаками.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були бактеріальні ізоляти (5), що одержані нами з уражених тканин сої з ознаками іржаво-бурої плямистості, при обстеженні дослідних та промислових посівів. Як тест-культури для порівняльного вивчення біологічних властивостей використовували наступні колекційні штами відділу фітопатогенних бактерій ІМВ: *Curtobacterium flaccumfaciens* рв. *flaccumfaciens* (штами 6567, 6566а, 6565). Для порівняльних досліджень генотипових ознак на рівні роду - представники одного з основних захворюю-

вань сої (кутастої плямистості) штами *Pseudomonas savastanoi pv.glycinea* 9176 та *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511.

Обстеження посівів та ізолювання збудників проводили на районованих сортах та сортозразках сої, науково-дослідних сортовипробувальних посівах. Визначення культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей досліджуваних штамів проводили за традиційними методами [2, 3, 5].

Бактерії вирощували на твердому поживному середовищі (картопляному агарі). Виділення ДНК із 48-годинної культури бактерій проводили з використанням комерційного набору Diatom DNA Prep 200 (“Изоген”, Росія). 5 мкл розчину ДНК додавали в ПЛР-суміш, що містила: 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ, 1,25 U Taq-полімерази з кінцевою концентрацією BOX-A1R праймеру (5-СТАСGCGAAGGCCAGGCTGACG-3) – 0,8 мкМ [9]. Ампліфікацію проводили в наступному температурному режимі: температура денатурації – 95 °С, відпалу праймера – 53 °С, елонгації – 72 °С, 30 циклів.

Продукти ПЛР аналізували в 1,5 %-ному агарозному гелі, що містив бромистий етидій. Визначення довжин ампліконів в гелі здійснювали за допомогою програми Gel-Pro Analyzer 4.5, порівнюючи їх із маркером молекулярної маси O’GeneRuler 100 bp Plus (Fermentas). При обчисленні результатів гель-електрофорезу враховували лише ті смуги, інтенсивність яких сягала не менше 2,5% від максимальної. Спорідненість зразків ДНК визначали за часткою ампліконів однакової довжини, користуючись коефіцієнтом Джакарда. Кластерний аналіз, використовуючи незважений парногруповий метод із арифметичним усередненням (UPGMA), і побудову дендрограми проводили за допомогою програми DendroUPGMA (<http://genomes.uvg.cat/UPGMA/>) [8].

Результати та обговорення

При фітопатологічному обстеженні і відборі уражених зразків сої на науково-дослідних стаціонарах та промислових посівах Київської та Вінницької областей, були виявлені ураження листя сої з характерними симптомами іржаво-бурої плямистості, які за літературними джерелами викликає *Curtobacterium flaccumfaciens*[1]. Парактично на всіх обстежених сортах сої нами виявлене невелике (15-20 %) від загального бактеріального ураження, але стале розповсюдження іржаво-бурої плямистості. Прояв хвороби починається з появи хлоротичних плям, дуже малих розмірів –2-3 мм у діаметрі. У центрі плями з’являється некротична цятка ярко-коричневого або червоно-коричневого кольору. Згодом плями, які викликані *C. flaccumfaciens*, збільшуються, а ореол хлорозу стає менш виразним. За умов наших спостережень на посівах сої (різка зміна погодних умов) ми не спостерігали симптомів в’янення, а також повної загибелі рослин від *C. flaccumfaciens*. Хоча за літературними джерелами один із синонімів назви хвороби – «бактеріальне в’янення». З уражень листя сої та бур’янів, які зустрічались в посівах, на іржаво-бурю плямистість були отримані ізоляти, які за

культурально-морфологічними і вірулентними ознаками були схожі з колекційним штамом *C. flaccumfaciens*. Порівняльне вивчення фізіолого-біохімічних властивостей відібраних для подальшого визначення за вищевказаними ознаками 5-ти ізолятів і 3-х колекційних штамів також свідчить про їх можливу спорідненість. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* - другорядний збудник захворювань квасолі. На сої він зустрічається значно рідше [2, 7]. В Україні з сої нами збудник ізольований вперше [4].

Остаточне таксономічне визначення приналежності ізольованих штамів проведено на основі генотипових досліджень.

Оскільки посіви сої уражуються бактеріальними збудниками, що викликають схожу симптоматику, важливим є використання високоспецифічних методів діагностики. Поряд із традиційними і необхідними культуральними процедурами, залучення молекулярно-біологічних методів детекції дозволяє значно підвищити надійність та достовірність проведення аналізів. Для цієї мети використання ампліфікації повторюваних елементів геному, які характеризуються достатньо високими темпами еволюції, задовольняють вимогам точності, відтворюваності та інформативності.

В нашій роботі використовувався праймер до так званих BOX-елементів геному бактерій. В результаті ампліфікації із 8-ми штамми

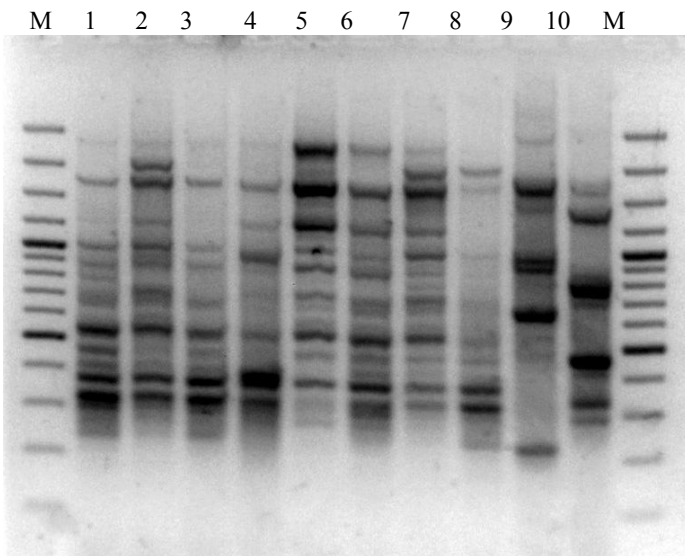


Рис. 1. Електрофорез аналізованих штамів після ПЛР із BOXA1 праймером. 1 - *C. flaccumfaciens* 2vB, 2 - *C. flaccumfaciens* 4B, 3 - *C. flaccumfaciens* 3B, 4 - *C. flaccumfaciens* 4vB, 5 - *C. flaccumfaciens* 17B, 6 - *C. flaccumfaciens* 6565, 7 - *C. flaccumfaciens* 6566a, 8 - *C. flaccumfaciens* 6567, 9 - *Ps. syringae* pv. *glycinea* 9176, 10 - *Ps. savastanoi* pv. *glycinea* 8511, М – маркер молекулярної маси.

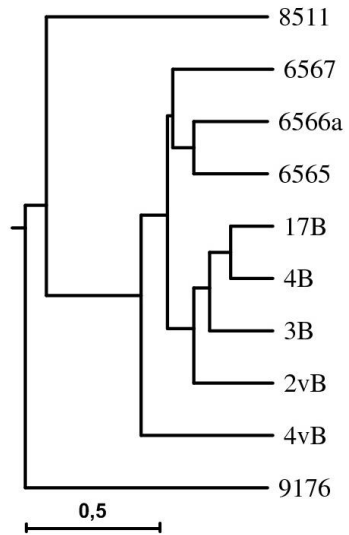


Рис. 2. Дендрограма побудована на основі аналізу генетичних дистанцій між аналізованими штамми з використанням методу UPGMA

C. flaccumfaciens та *P. savastanoi* pv. *glycinea* і *P. syringae* pv. *syringae* (виду принадлежність даних ізолятів попередньо ідентифіковано за їх фізіолого-біохімічними властивостями) отримано 20 фрагментів, довжина яких знаходилась в діапазоні 2500-200 п.н. (Рис. 1). Для представників *C. flaccumfaciens* ідентифіковано 6 мономорфних смуг, що є опосередкованим підтвердженням спорідненості аналізованих штамів.

За даними ПЛР-фінгерпринтингу візуально спостерігається генетична віддаленість ізолятів *C. flaccumfaciens* від *P. savastanoi* pv. *glycinea* і *P. syringae* pv. *syringae*, що є очікуваним і узгоджується із результатами вивчення біологічних властивостей збудників, не зважаючи на близьку симптоматику захворювання.

Це підтверджується результатами обрахунку отриманих даних ПЛР-фінгерпринтингу, які подані у вигляді дендрограми (Рис. 2).

На побудованій дендрограмі чітко помітна дистанція між штамми попередньо ідентифікованими як *C. flaccumfaciens* та *P. savastanoi* pv. *glycinea* 9176 і *P. syringae* pv. *syringae* 8511. В свою чергу, спостерігалось розділення штамів *C. flaccumfaciens* на два близькоспоріднених кластери. Перший із них містив в собі представників колекційних штамів, виділених з квасолі, а інший – ізольованих із уражених рослин сої.

Висновки

Таким чином, досліджувані штами на основі фенотипових та генотипових властивостей ідентифіковані як представники виду *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, який в перше виявлений в Україні на сої.

Показано прикладне значення використання BOX-ПЛР аналізу для диференціації збудників бактеріозів сої.

Література

1. Бельтюкова К.И., Королева И.Б., Мурає В.А. Бактериальные болезни зернобобовых культур. – Киев: Наук. думка, 1974. – 340 с.
2. Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. – Киев: Наукова думка, 1968. – 316 с.
3. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. – М: Мир, 1983. – т.1. – 563 с.
4. Житкевич Н.В., Новохацький М.Л., Данкевич Л.А., Гнатюк Т.Т. *Curtobacterium flaccumfaciens* – новий збудник захворювання сої в Україні // тези в Ужгороді в 2009.
5. Люта В.А., Кононов О.В. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень та основами імунології. – Київ: Здоров'я, 2006. – 510 с.
6. Bradbury J.F. Guide to Plant Pathogenic Bacteria Bacteriologist. - England: CAB International Mycological Institute, 1986. – 334 p.
7. Dunleavy J.M., Keck J.W., Gobelman K.S., Reddy S., Thomson M.M. Prevalence of *Corynebacterium flaccumfaciens* as incitant of bacterial tan spot of soybean in Iowa // Plant Disease. - 1983. – 67, N 11. – P. 1277 – 1279.
8. Garcia-Vallve S. Horizontal gene transfer in glycosyl hydrolases inferred from codon usage in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* // Mol. Biol. and Evolution. – 1999. – V. 9. – P. 1125-1134.
9. Smith N. C. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1R primer for rapid identification of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subs. *Sepeдонicus* // European J. of Plant Path. – 2001. – V. 107. – P. 739-748.

Резюме

Із польових рослин сої із симптомами іржаво-бурої бактеріальної плямистості було виділено та ідентифіковано на основі фенотивних та генотипових властивостей 5 бактеріальних ізолятів. Підтверджено приналежність виділених штамів до виду *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

С полевых растений сои с симптомами бурой бактериальной пятнистости были выделены и идентифицированы на основе фенотивных и генотипических свойств 5 бактериальных изолятов. Подтверждена принадлежность выделенных штаммов к виду *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

There were obtained and characterized on the basis of phenotypic and genotypic properties 5 bacterial isolates from the field soybean plants with brown spot symptoms. Identity of studied strains to the species *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* was established.

ДРАГОВОЗ І.В., ЛЕОНОВА Н.О.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, МСП, Д 03680, Україна, e-mail: igordragovoz@ukr.net

СИНТЕЗ АУКСИНІВ І ЦИТОКІНІНІВ РИЗОБІЯМИ СОЇ З РІЗНОЮ СИМБІОТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

Відомо, що біологічна активність штамів азотфіксувальних мікроорганізмів є характеристикою, що безпосередньо пов'язана з продуктивністю рослин [8]. У зв'язку з цим, оцінка ефективності діазотрофних мікроорганізмів достатньо важлива на етапі лабораторного скринінгу найбільш ефективних штамів, що покращують продуктивність бобових культур [1]. Традиційно для характеристики біологічної активності штамів бульбочкових бактерій, зокрема, роду *Bradyrhizobium*, використовують такі показники, як вірулентність штаму, його нодуляційну здатність, симбіотичну ефективність (кількість і маса бульбочок, наростання надземної маси і коренів рослини, нітрогеназна активність бульбочок, врожайність і якість зерна). Однак, ці показники знімають в умовах вегетаційного або польового дослідів і, до того ж, вони не досить об'єктивно відображають активність певних штамів. Так, зокрема, немає прямої кореляції між високою вірулентністю деяких штамів роду *Bradyrhizobium* та зерновою продуктивністю бобових культур [6].

Відомо, що ризобії синтезують фітогормони-стимулятори, що відіграють важливу роль при формуванні і функціонуванні симбіотичних систем [9, 10, 12]. Тому здатність азотфіксувальних бактерій продукувати фітогормони-стимулятори заслуговує ретельного вивчення. Однак, залишається не з'ясованим питання щодо існування взаємозв'язку між синтезом окремих класів фітогормонів і симбіотичною активністю штамів бульбочкових бактерій.

Метою нашої роботи був пошук зв'язку між синтезом ауксинів і цитокінінів ризобіями сої з різною симбіотичною ефективністю.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були високоефективні бульбочкові бактерії сої з колекції відділу загальної та ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Для порівняння досліджували малоефективний штам ризобій, отриманий з колекції ВНДІСГМ РАСГН (Санкт-Петербург, Пушкін), і неефективний штам, наданий співробітниками Південної дослідної станції Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААНУ.

Культивування бактерій проводили як описано в роботі [2]. Рідку культуру штамів *B. japonicum* в експоненційній фазі росту центрифугували 30 хв. при 15000 g і за температури +4°C. Супернатант використовували для якісного та кількісного аналізу фітогормонів. З супернатанту фітогормони виділяли шляхом перерозподілу в двох не змішуваних між собою фа-

зах [4]. Подальше концентрування та очищення екстрактів проводили методом препаративно-накопичувальної тонкошарової хроматографії. Якісне та кількісне визначення ауксинів та цитокінінів проводили методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [5]. Показник синтезу екзогенних фітогормонів перераховували у мкг на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

Результати досліджень

Досліджувані штами ризобій синтезували екзогенні фітогормони стимулюючої дії (ауксини і цитокініни). У складі екзогенних ауксинів були присутні, крім індол-3-оцтової кислоти (ІОК), інші індолні сполуки, синтез яких притаманний саме мікроорганізмам [10]: індол-3-карбоксилова кислота, індол-3-карбінол та індол-3-оцтової кислоти гідразин (табл. 1). Стосовно спектру синтезованих сполук слід відмітити наступне: високим рівнем синтезу похідних ІОК характеризувався неефективний штам *B. japonicum* 604к і один з ефективних штамів *B. japonicum* УКМ В-6036. Спектр синтезованих сполук і рівні їх синтезу у цих двох штамів практично не відрізнялись.

Таблиця 1

Питоме продукування екзогенних ауксинів ризобіями сої

Штами	Ауксини, мкг/г абсолютно сухої біомаси					
	ІОК	Індол-3-карбоксилова кислота	Індол-3-карбінол	Індол-3-оцтової кислоти гідразин	Індол-3-карбоксальдегід	Σ ауксинів
<i>B. japonicum</i> 604к	сліди	216,1	442,3	408,9	сліди	1067,4
<i>B. japonicum</i> 21110	3,8	сліди	сліди	сліди	сліди	3,8
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6018	8,9	4,60	сліди	сліди	0,4	13,9
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6023	5,2	сліди	39,1	9,8	сліди	54,1
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	772,8	сліди	сліди	сліди	сліди	772,8
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6036	сліди	254,0	369,7	598,5	сліди	1222,2

Решта досліджуваних штамів ризобій суттєво відрізнялись як спектром синтезованих сполук, так і рівнем їх синтезу. Так, раніше було показано, що високоактивні штами ризобій та Tn5-мутанти характеризувались високою здатністю щодо синтезу ІОК в чистій культурі [7].

Отримані нами результати не узгоджуються з даними попередньої роботи, адже ні синтез ІОК, ні сумарний синтез ауксинів прямо не корелюва-

ли з характеристикою ефективності штамів ризобій сої. З літератури відома «ауксинова» гіпотеза інфікування ризобіями коренів [11], однак отримані результати частково (для двох із шести штамів) свідчать на користь цієї гіпотези. Ймовірно, ефективність симбіозу пов'язана з синтезом інших класів гормонів-стимуляторів, зокрема цитокінінів, співвідношення яких з ауксинами може позитивно впливати на рослини в умовах симбіозу [6, 10].

Спектр цитокінінів, синтезованих штамми *B. japonicum*, відрізнявся як якісним, так і кількісним складом. Так, високоефективний симбіонт УКМ В-6018 синтезував найбільшу кількість цитокінінів (~ 1555 мкг/г АСБ), серед яких переважав зеатин-рибозид. Штам також був здатний синтезувати значну кількість інших цитокінінів, зокрема, зеатину та ізопентеніл-аденозину (табл. 2). Інший високоефективний штам УКМ В-6035 синтезував менше екзогенних цитокінінів, при цьому переважав синтез зеатин-рибозиду (більше 670 мкг/г АСБ), а співвідношення форм цитокінінів дещо відрізнялося від штаму УКМ В-6018: виявлено слідові кількості ізопентеніл-аденозину.

Таблиця 2

Питоме продукування екзогенних цитокінінів бульбочковими бактеріями роду *Bradyrhizobium*

Штами ризобій	Характеристика активності	Цитокініни, мкг/г абсолютно сухої біомаси				
		Зеатин	Зеатин-рибозид	Ізопентеніл-аденін	Ізопентеніл-аденозин	$\Sigma_{\text{циток.}}$
<i>B. japonicum</i> 604к	неактивний	15,39	108,83	сліди	17,38	141,60
<i>B. japonicum</i> 21110	малоактивний	22,02	135,91	сліди	8,03	165,96
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6018	високоактивний	345,00	855,01	1,71	352,44	1554,16
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6023	високоактивний	125,32	342,47	9,30	5,48	482,57
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	високоактивний	60,29	672,55	4,94	сліди	737,78
<i>B. japonicum</i> УКМ В-6036	високоактивний	311,05	233,74	1,72	8,04	554,55

Заслуговує на увагу й те, що загальна кількість цитокінінів, синтезованих високоефективними штамми, була в 4,4-9,4 рази вище в порівнянні з синтезом аналогічних фітогормонів малоефективним штамом *B. japonicum* 21110. У зв'язку з цим, ми висловили припущення про прямий взаємозв'язок між здатністю до синтезу цитокінінів штамми ризобій сої та їх симбіотичною ефективністю. Для підтвердження цього припущення нами була проаналізована здатність до синтезу екзогенних цитокінінів ризобіями сої різ-

ної ефективності: неактивним штамом *B. japonicum* 604к, малоефективним *B. japonicum* 21110 і чотирма високоефективними: *B. japonicum* УКМ В-6018, УКМ В-6023, УКМ В-6035, УКМ В-6036.

Отримані результати свідчать про те, що штамми бульбочкових бактерій, що відрізняються симбіотичною ефективністю, синтезували різні кількості екзогенних цитокинінів. В спектрі отриманих фітогормонів цитокинінового ряду переважав зеатин-рибозид, найбільша кількість якого виявлена в супернатанті *B. japonicum* УКМ В-6018.

Заслугує уваги і те, що кількість зеатин-рибозиду, синтезованого високоефективними штамми ризобій сої, була у 1,7-7,9 разів вище, ніж у малоефективного і неактивного штамів. Аналогічна закономірність більш активного синтезу цитокинінів ефективними штамми спостерігалася і щодо зеатину (перевищення у 2,7-22,4 рази) і ізопентеніл-аденіну (синтез цього гормону у *B. japonicum* 21110 і 604к практично був відсутній). Таким чином, загальний синтез екзогенних цитокинінів кожним високоефективним штамом значно перевищував аналогічні показники у малоефективного і у неефективного штамів.

В попередніх дослідженнях показано, що в якості характеристики симбіотичної активності штамів традиційно використовують показники формування і функціонування нодуляційного апарату сої, вмісту хлорофілів в листках сої за обробки досліджуваними штамми і продуктивність рослин [2]. Отримані дані не суперечать раніше опублікованим результатам про те, що високовірулентні штамми бульбочкових бактерій характеризуються підвищеною здатністю до синтезу цитокинінів [3]. Обговорюється, що саме цитокиніни відіграють важливу роль у формуванні бульбочок, оскільки стимулюють процеси проліферації тканин коренів.

Висновки

Стосовно зв'язку між синтезом ауксинів і цитокинінів ризобіями сої з різною симбіотичною ефективністю слід зауважити, що на ефективність симбіозу позитивно буде впливати синтез всіх класів гормонів-стимуляторів, притаманний ризобіям сої. Мікробні ростові сполуки стимулюючої дії змінюють гормональний статус рослини-господаря, завдяки впливу на функціонування морфогенетичних програм рослинного організму. Зміна співвідношення ауксинів і цитокинінів в рослинних тканинах, зокрема, передує новому етапу онтогенетичного розвитку рослини (диференціації бруньок, формуванню насіння, тощо).

Література

1. Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции / Под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. СПб.: Наука, 1998. – 208 с.
2. Драгозов И.В., Леонова Н.О. Иутинская Г.А. Синтез фитогормонов штамма *Bradyrhizobium japonicum* различной симбиотической эффективности // Микробиол. журнал. – 2011. – 73, № 4. – С. 29-35.

3. Драгозов І.В., Леонова Н.О., Білявська Л.О., Яворська В.К., Іутинська Г.О. Продукування фітогормонів деякими вільноіснуючими та симбіотичними ґрунтовими мікроорганізмами // Доповіді НАН України. – 2010, № 12. – С. 154-159.

4. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. – 78 с.

5. Савинский С.В., Кофман И.Ш., Кофанов В.И., Стасевская И.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиол. и биохим. культ. раст. – 1987. – 19, № 2. – С. 210-215.

6. Спайнк Г., Кондороши А., Хукас П. *Rhizobiaceae*. Молекулярная биология бактерий, взаимодействующих с растениями / Под ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. – Санкт-Петербург: ИПК «Бионт», 2002. – 568 с.

7. Сьтнников Д.М., Коць С.Я. Симбіотическіе свойства неактивного штамма клубеньковых бактерий сои 604к// Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку: у 2 т./ Голов. ред. В.В. Моргун. – Київ: Логос, 2009. – Т. 1. – С. 466–470.

8. Умаров М. М., Кураков А. В., Степанов А. А. Микробиологическая трансформация азота в почве. – М.: ГЕОС, 2007. – 138 с.

9. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – 42, № 2 – С.133 – 143.

10. Phytohormones in soils: microbial production and function / Ed. Frankenberger W. T., Arshad M. – New York: Dekker. – 1995. – 503 p.

11. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! / Ed. P.J. Davies. – Springer, 2004. – 750 p.

12. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. 2nd ed. // Ed. R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri. – Boca Raton, FL: CRC Press. – 2007. – 472 p.

Резюме

Досліджено синтез ауксинів і цитокінінів деякими штамми *B. japonicum*. Показано, що підвищений синтез екзогенних ауксинів ризобіями сої не пов'язаний з їх симбіотичною ефективністю. Натомість, синтез екзогенних цитокінінів високоефективними штамми суттєво (в 3-11 разів) перевищує аналогічний показник у штамів з низькою ефективністю. Робиться висновок, що співвідношення гормонів стимулюючої дії (ауксинів та цитокінінів) відіграє важливу роль в онтогенезі рослин сої.

Исследован синтез ауксинов и цитокининов некоторыми штаммами *B. japonicum*. Показано, что повышенный синтез экзогенных ауксинов ризобиями сои не связан с их симбиотической эффективностью. Синтез экзогенных цитокининов высокоэффективными штаммами существенно (в 3-11 раз) превышает аналогичный показатель у штаммов с низкой эффективностью. Делается вывод, что соотношение гормонов стимулирующего действия (ауксинов и цитокининов) играет важную роль в онтогенезе растений сои.

Synthesis of auxin and cytokinin by some strains of *B. japonicum* have been researched. Have been shown that increased synthesis of exogenous auxins compounds by soybean rhizobia is not associated with their symbiotic efficiency. Instead, the synthesis of exogenous cytokinin strains highly significant (at 3.11 times) higher than in the strains with low efficiency. It is concluded that the ratio of hormones stimulating action (auxin and cytokinin) plays an important role in the ontogeny of plant soybeans.

**ЖУКОВ В.А., ЖЕРНАКОВ А.И., СУЛИМА А.С., ТИТОВ В.С.,
ФЕДОРИНА Я.В., ШТАРК О.Ю., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,

Россия, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3,

e-mail: zhukoff01@yahoo.com

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ СИМБИОЗОВ ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.)

Растения семейства Бобовые (Fabaceae) в наибольшей степени отвечают требованиям концепции адаптивного земледелия, поскольку способны к образованию мутуалистических (взаимовыгодных) симбиозов с полезными почвенными микроорганизмами (ППМ): арбускулярной микоризы с гломусовыми грибами (Schübler et al., 2001), бобово-ризобияльного симбиоза с клубеньковыми бактериями (ризобиями) (Sprunt, 2001), а также ассоциаций с рост-стимулирующими ризосферными бактериями (Lugtenberg et al., 2001). За последнее десятилетие получено множество данных о молекулярно-генетических основах развития и функционирования симбиозов бобовых растений (Oldroyd, Downie, 2008). Однако, изучение генетического контроля развития симбиозов у культурных бобовых, и, в частности, гороха посевного, ограничено из-за значительного размера генома, продолжительного жизненного цикла и сложности генетических манипуляций с данными объектами.

Удобным способом преодоления ограничений, связанных со спецификой объекта исследований, является использование современных методов молекулярной биологии. За последние несколько лет был совершен прорыв в области секвенирования геномов растений, что оказалось возможным благодаря широкому распространению использованию технологий «second generation sequencing», или «секвенирование второго поколения» (Imelfort, Edwards, 2009; Edwards, Batley, 2010; Metzker, 2010). Значительный успех в изучении генетических основ формирования мутуалистических симбиозов был также достигнут за счет вовлечения в исследования модельных бобовых растений лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel.) Larsen) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.), которые обладают сравнительно небольшим геномом и легко подвергаются молекулярно-генетическим манипуляциям. Сходство структурной организации геномов различных бобовых растений позволяет «переносить» достижения генетики, геномики и транскриптомики модельных бобовых на сельскохозяйственно-ценные бобовые культуры, такие как горох посевной (*Pisum sativum* L.) (Young, Udvardi, 2009). В данном сообщении освещены методы, подходы, итоги и перспективы исследований генетического контроля развития симбиозов, образуемых горохом посевным.

Материалы и методы

Биологический материал:

В работе были использованы следующие мутантные линии гороха: RisNod24 (*sym36*), RisFixV (*sym42*), SGE_{crt} (*crt*) из коллекции лаборатории растительно-микробных взаимодействий ГНУ ВНИИСХМ.

Генетическое картирование проводили на выборках поколения F₂ от скрещивания мутантных линий с тестерной линией NGB1238, имеющей нормальный фенотип клубенькообразования. Картирование гена *Crt* проводили на выборке F₂ (SGE_{crt} x I-x) (линия I-x, нормальная в отношении развития корневой системы, любезно предоставлена проф. Н. Уиденом (Prof. N. Weeden, Montana State University, MT, USA)).

Для анализа транскриптома клубеньков по 5 растений линий SGE и SGE_{arm} (*cochleata*) были выращены индивидуально в керамических горшочках с прокаленным кварцевым песком при инокуляции клубеньковыми бактериями (штамм CIAM1026 из коллекции ГНУ ВНИИСХМ). Клубеньки были собраны и переданы в Инновационно-технологический центр “Биологически активные соединения и их применение” РАН для дальнейшей работы.

Молекулярно-биологические процедуры: Геномную ДНК из растений гороха выделяли с использованием буфера СТАВ по модифицированному протоколу Rogers, Bendich (1985); ПЦР проводили в термоциклерах iCycler™ (Bio-Rad, США) и Personal Cycler (Biometra, Германия). Секвенирование осуществляли на автоматическом приборе CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США) по протоколу производителя. Праймеры были синтезированы компанией «Евроген», Москва, Россия. Анализ рестрикционных фрагментов проводили в 3% агарозном геле.

Компьютерный анализ: В работе были использованы следующие программы и сайты:

– данные по секвенированию нуклеотидных последовательностей обрабатывали с помощью программного обеспечения автоматического секвениатора CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США). В программах Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) и ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей.

– подбор необходимых эндонуклеаз рестрикции для детекции полиморфизма фрагментов осуществляли в программе dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>).

– построение генетических карт проводили с помощью программ MapL98 (Prof. Yasuo Ukai, Graduate School of Agricultural Life Science, the University of Tokyo) и Joinmap 4.1 (Van Ooijen J.W., 2006).

– определение позиций генов, гомологичных использованным маркерам, в геноме люцерны слабоусеченной, проводили путем поиска по ал-

горитму BLAST на сайтах http://www.medicago.org/genome/cvit_blast.php и http://www.medicagohapmap.org/advanced_search_page.php?seq.

Результаты и обсуждение

Для определения нуклеотидных последовательностей симбиотических генов гороха, затронутых мутациями, используется методология сравнительного картирования, основанная на достижениях сравнительной геномики бобовых растений. Для картирования мутантных генов в геноме гороха создан набор ген-специфичных молекулярных маркеров, распределенных по всем хромосомам гороха посевного (Жуков и др., 2010). Данные маркеры относятся к типу CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) и основаны на амплификации фрагмента определенного гена и специфичном расщеплении только одной из его аллелей определенной эндонуклеазой рестрикции (Konieczny, Ausubel, 1993).

Набор маркеров был использован для картирования симбиотических генов гороха *Sym36* и *Sym42*, позиции которых в геноме гороха были неизвестны. Для точного картирования гена *Crt*, ранее локализованного в V группе сцепления, были также использованы маркеры, созданные на основе генов-кандидатов люцерны слабоусеченной.

В результате работы гены *Sym36* и *Sym42* были локализованы в VI и VII группах сцепления гороха, соответственно. Для последующей точной локализации данных генов были использованы маркеры, созданных на основе генов люцерны слабоусеченной, расположенных в гомологичных областях генома. На основании проведенной точной локализации гена *Crt* гены-кандидаты, демонстрировавшие полное сцепление с геном интереса, были секвенированы у мутантной линии SGE_{Crt} и исходной линии SGE для выявления тождественности одного из них гену *Crt*.

Совместно с Инновационно-технологическим центром “Биологически активные соединения и их применение” РАН начата работа по секвенированию транскриптома клубеньков мутантной линии гороха SGE_{Arm}, несущей мутацию в гене *Cochleata*. У мутантов по данному гену нарушения регуляции меристематической активности приводят к тому, что верхушка симбиотического клубенька превращается в морфологически нормальный корень. Сравнение транскрипционных профилей клубеньков мутанта и линии «дикого типа», а также кончиков корней линии «дикого типа» позволит получить знания о тонкой регуляции генных сетей, контролирующих развитие и функционирование клубеньков. Масштабность производимых исследований позволяет анализировать огромное количество генов (сравнимое с анализом экспрессии генов на микрочипах), а также выявлять регуляторные РНК, например, микроРНК. Эти результаты представляются весьма важными и актуальными как для фундаментальной науки, так и для селекционной работы.

Выводы

Использование современных методов и подходов, таких как сравнительная генетика и геномика, а также широкомасштабное секвенирование «следующего поколения», позволяет выявлять последовательности ключевых генов гороха, ответственных за функционирование симбиотических систем, изучать их полиморфизм и выяснять особенности развития симбиозов, отличающих горох посевной от других бобовых растений. Полученные знания могут быть использованы для создания новых сортов гороха, эффективно взаимодействующих с ППМ. Понимание генетических основ функционирования симбиотических систем, образуемых бобовыми растениями, является необходимой основой «адаптивного» земледелия.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Государственные контракты № 02.740.11.0276, 16.512.11.2155, П1304), грантов президента РФ (НШ-3440.2010.4) и РФФИ (09-04-91054, 10-04-00961, 10-04-01146).

Литература

1. Жуков В.А., Неманкин Т.А., Овчинникова Е.С., Кузнецова Е.В., Жернаков А.И., Титов В.С., Гришина О.А., Сулима А.С., Борисов Я.Г., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Создание серии ген-специфичных молекулярных маркеров для сравнительного картирования геномов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и диплоидной люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.) // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / НАН України, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов ред.) [та ін.]. – К.: Логос, 2003-2010. Т. 9: Присвяч. 110-річчю від дня народж. Теодосія Григоровича Добржанського. – 2010. – 500 с. – С. 30-34.
2. Edwards D., Batley J. Plant genome sequencing: applications for crop improvement // Plant Biotechnol J. - 2010. - vol. 8, № 1. - P. 2-9.
3. Imelfort M., Edwards D. De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies // Brief Bioinform. - 2009. - vol. 10, № 6. - P. 609-618.
4. Konieczny A., Ausubel F.M. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers // Plant J. - 1993. - vol. 4, № 2. - P. 403-410.
5. Lugtenberg B.J.J., Dekkers L., Bloemberg G. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* // Ann. Rev. Phytopathol. - 2001. - vol. 39. - P. 461-490.
6. Metzker M.L. Sequencing technologies – the next generation // Nat Rev Genet. - 2010. – vol. 11. № 1. - P. 31-46.
7. Oldroyd G.E., Downie J.A. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes // Annu. Rev. Plant Biol. - 2008. - vol. 59. - P. 519-546.
8. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. - 1985. - vol. 5. - P. 69-76.
9. Schüßler A., Schwarzott D., Walker C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution // Mycol. Res. - 2001. - vol. 105, № 12. - P. 1413-1421.

10. *Sprent J.I.* Nodulation in Legumes. – Kew, Royal Botanical Gardens: Cromwell Press Ltd. - 2001. - 146 p.

11. *Van Ooijen J.W.* JoinMap® 4, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands. 2006.

12. *Young N.D., Udvardi M.* Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2009. - vol. 12, № 2. - P. 193-201.

Резюме

Описано применение методов и подходов сравнительной генетики, геномики и транскриптомики бобовых растений для выявления последовательностей ключевых генов гороха, ответственных за функционирование симбиотических систем.

The application of methods and approaches of comparative genetics, genomics and transcriptomics of leguminous plants is described, which are used for identification sequences of key genes of pea responsible for the functioning of the symbiotic systems.

КЛОЧКО В.В., ЗЕЛЕНА Л.Б., ЧУГУНОВА К.О., АВДЄЄВА Л.В.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Україна, Київ, 03680, вул. Заболотного, 154, e-mail: kvvit78@hotmail.com

АНАЛІЗ ФЕНАЗИНОВОГО КОМПЛЕКСУ У ШТАМІВ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AUREOFACIENS* УКМ B-111 І УКМ B-306

Одним з актуальних напрямків біотехнології є створення високопродуктивних форм мікроорганізмів, здатних синтезувати біологічно активні сполуки, що можуть використовуватися в різних галузях господарства.

Бактерії роду *Pseudomonas* являють собою велику групу мікроорганізмів, яка відіграє значну роль в медицині, біотехнології та екології. Потужний метаболічний потенціал, здатність до синтезу як біополімерів, так і багатьох низькомолекулярних продуктів, в тому числі антибіотиків, адаптація до найрізноманітніших умов середовища роблять рід *Pseudomonas* привабливим об'єктом комплексних генетичних і метаболічних досліджень [1].

На цей час повністю сиквеновано геноми більше 10 штамів кількох видів псевдомонад (*Paeruginosa*, *P.putida*, *P.fluorescens*, *P.entomophila* та ін.), досліджено «core»- і «pan»-геноми та встановлено гени, відповідальні за біосинтез певних метаболітів або їх попередників. Одержана інформація відкриває нові можливості для пошуку серед бактерій продуцентів біологічно активних речовин. Початковим етапом такого пошуку є встановлення наявності генів, що приймають участь в біосинтезі тих класів метаболітів, які цікавлять дослідника. Поєднання молекулярно-генетичних методів і методів хромато-мас-спектрометричного аналізу дозволяє отримати дані щодо наявності в генетичному апараті клітини генів, які контролюють певні фізіологічні процеси та синтез відповідних біологічно активних сполук.

Для проведення таких досліджень нами були відібрані два штами бактерій *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ B-111 і B-306, що

входять до складу комплексного біопрепарату гаупсину, який використовується для захисту рослин від фітопатогенів і в той же час характеризується ентомопатогенною і противірусною активністю [2, 3]. Відомо, що бактерії роду *Pseudomonas* характеризуються здатністю синтезувати антибіотики феназинового ряду, активні проти фітопатогенних грибів і бактерій [4]. На сьогодні вже відомі етапи біосинтезу феназинів та встановлені гени, що входять до складу феназинового оперону [1, 5].

Метою даної роботи було виявлення у штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-111 і В-306 гену *phzD*, відповідального за синтез 3-оксиантринилату (попередника феназин-1-карбонової кислоти) та аналіз культуральних рідин цих штамів на наявність антибіотиків феназинового ряду.

Матеріали і методи

Об'єкти досліджень – штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-111 і В-306, що підтримуються в Українській колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології і вірусології НАН України). Вирощування штамів проводили в глибинних умовах, в колбах Ерленмейера, що містили 100 мл поживного середовища Кінг А, при температурі 27°C протягом 72 годин.

Виділення ДНК із суспензії клітин і ПЛР-аналіз проводили відповідно до методик, наведених у роботі [6]. ПЛР виконували на ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-Технологія», Росія). Продукти ПЛР розділяли в агарозному гелі, розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркера молекулярної ваги DNA ladder mix («Fermentas», Литва). Використовували праймери *phzD* forward: 5' – ATG ACC GGC ATT CCA TCG ATC – 3' та *phzD* reverse: 5' – TCA TAG CAC CAC CTC ATC GG – 3'. Негативним контролем в реакціях ампліфікації слугував штам *P. putida* УКМ В-115, який не здатний до синтезу феназинів.

Визначення антибіотиків феназинового ряду проводили в фугатах культуральних рідин методом хромато-мас-спектрометрії на рідинному хроматографі «Agilent 1200» з використанням мас-спектрометричного детектора «Agilent G1956В». Хроматографічна колонка Ascensis RP-amide C18 (150 мм × 4,6 мм × 5 мкм), система метанол-вода з додаванням 0,1% оцтової кислоти, градієнтний режим. Мас-спектрометричний аналіз проводили з реєстрацією позитивних і негативних іонів з співвідношенням маса/заряд (*m/z*) в діапазоні 50 – 300.

Результати і обговорення

За результатами ПЛР-аналізу (рис. 1) штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-111 і В-306 було виявлено продукт ампліфікації розміром 620 п.н. Виходячи з літературних даних [7], можна зробити висновок про наявність *phzD*-гену у досліджуваних штамів.

Оскільки молекулярно-генетичними методами була показана наявність у штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-111 і В-306 *phzD*-гену, що приймає участь в синтезі феназинів, ми вважали за необхідне перевірити біосинтетичну активність даних штамів шляхом аналізу їх культуральних рідин (рис. 2).

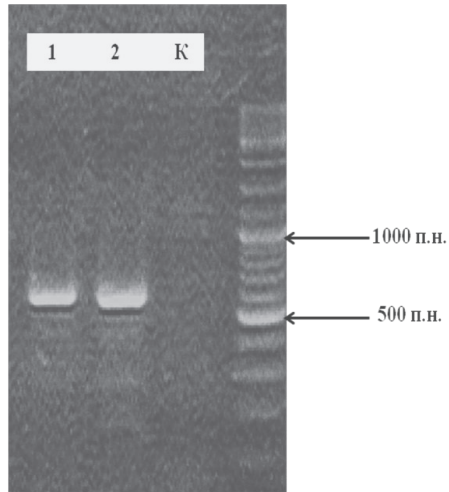


Рис.1. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами rhzD: 1 – *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-111; 2 – *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-306; К – контроль (*P. putida* В-115).

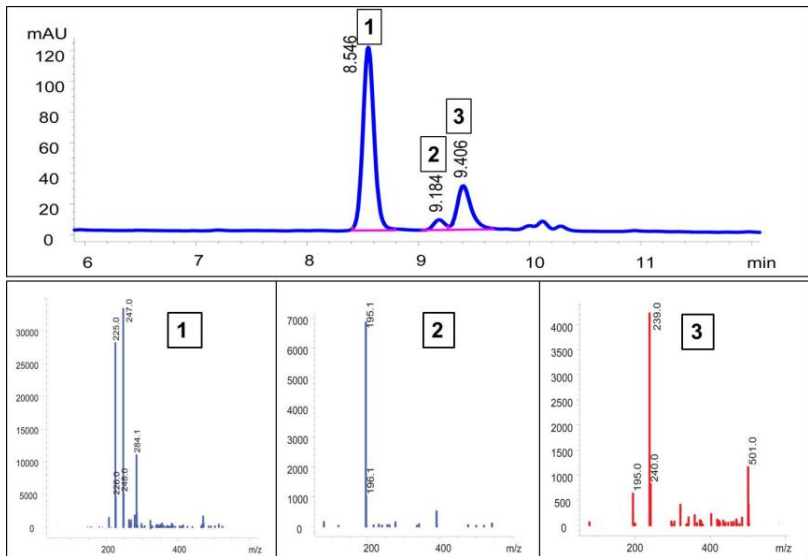


Рис. 2. Хромато-мас-спектрометричний аналіз культуральної рідини штаму *P.chlororaphis subsp.aureofaciens* В-111: 1 – феназин-1-карбонова кислота; 2 – 2-оксифеназин; 3 – 2-оксифеназин-1-карбонова кислота.

Штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-111 і В-306 характеризувалися біосинтезом трьох сполук феназинового ряду з молекулярними масами 224, 196 і 240 а.о.м., що відповідало молекулярним масам таких сполук, як феназин-1-карбонова кислота, 2-оксифеназин та 2-оксифеназин-1-карбонова кислота відповідно. Серед трьох похідних феназину основним продуктом біосинтезу у досліджуваних штамів виявилася феназин-1-карбонова кислота.

Таким чином, у штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-111 і В-306 було виявлено *phzD*-ген, відповідальний за синтез антибіотиків феназинового ряду, а також підтверджено наявність продуктів феназинового комплексу.

Поєднання молекулярно-генетичних методів з методами аналізу культуральних рідин, зокрема хромато-мас-спектрометрії, може виявитися перспективним напрямком пошуку продуцентів біологічно активних речовин. Це дозволить проводити скринінг штамів за наявністю генів, відповідальних за біосинтез необхідних сполук, оптимізувати умови культивування штамів для забезпечення експресії цих генів, а також аналізувати продукти, отримані у процесах ферментації.

Висновки

У штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* В-111 і В-306 виявлено *phzD*-ген, відповідальний за біосинтез попередника феназин-1-карбонової кислоти – 3-оксиантранилату. В культуральних рідинах штамів виявлена наявність трьох сполук, що входять до складу феназинового комплексу (феназин-1-карбонової кислоти, 2-оксифеназину та 2-оксифеназин-1-карбонової кислоти), що може слугувати підтвердженням експресії *phzD*-гену в обраних умовах культивування.

Література

1. *Pseudomonas*: Model Organism, Pathogen, Cell Factory. Edited by Bernd H. A. Rehm. – Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. – 403 p.
2. Кіпріанова О.А., Гораль С.В. Інсектофунгіцидний препарат гаупсин для боротьби із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур. // Патент України № 73682 АО ІN 63/00 С 12 N 1/20 від 10.03.2004 р. Опубл. 15.08.2005, Бюл.№ 8.
3. Балко О.І., Кіпріанова О.А., Коваленко О.Г., Шепелевич В.В., Авдєєва Л.В. Антифетовірусна активність біопрепарату гаупсин // Мікробіологія і біотехнологія, 2010. – № 2. – С. 51 – 57.
4. Смирнов В.В., Кіпріанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – К.: Наукова думка, 1990. – 264 с.
5. Mavrodi D.V., Ksenzenko V.N., Bonsall R.F., Cook R.J., Boronin A.M., Thomas L.S. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 // Journal of bacteriology, 1998. – v.180, №9. – P.2541 – 2548.
6. Lane D.G. Nucleic acids techniques in bacterial systematics. – Chichester, United Kingdom: John Wiley. – 1991. – pp.115-175.
7. Феклистова И.Н., Максимова Н.П. Синтез феназиновых соединений бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 // Вестник БГУ, 2005. – сер.2, № 2. – С. 66 – 69.

Резюме

Аналіз феназинового комплексу штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і В-306 – компонентів біопрепарату гаупсин – показав наявність у них *phzD*-гену, відповідального за синтез 3-оксиантранилату (попередника феназин-1-карбонової кислоти). В культуральних рідинах обох штамів виявлені сполуки феназинового ряду: феназин-1-карбонова кислота, 2-оксифеназин-1-карбонова кислота та 2-оксифеназин.

Анализ феназинового комплекса штаммов *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 и В-306 – компонентов биопрепарата гаупсин – показал наличие у них *phzD*-гена, ответственного за синтез 3-оксиантранилату (предшественника феназин-1-карбоновой кислоты). В культуральных жидкостях обеих штаммов были обнаружены вещества феназинового ряда: феназин-1-карбоновая кислота, 2-оксифеназин-1-карбоновая кислота и 2-оксифеназин.

Phenazine complex analysis of strains *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* UCM B-111 and UCM B-306 – components of biopreparation gaupsin – has shown presence of *phzD*-gene responsible for synthesis of 3-hydroxyanthranilate – phenazine-1-carboxylic acid precursor. Phenazine derivatives phenazine-1-carboxylic acid, 2-hydroxyphenazine-1-carboxylic acid and 2-hydroxyphenazine have been found in fermentation broth of both strains.

КОЦЬ С.Я.

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: azot@ifrg.kiev.ua*

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСПОЗОНОВЫХ МУТАНТОВ МЕДЛЕННОРАСТУЩИХ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ СОИ

На сегодня большая часть работ по Tn5-мутагенезу клубеньковых бактерий выполнена с использованием быстрорастущих ризобий, в частности *Sinorhizobium meliloti*. По транспозоновому мутагенезу медленнорастущих клубеньковых бактерий, а именно ризобий сои, таких работ немного и почти все они выполнены за рубежом [3, 6, 7, 9]. Так, с помощью Tn5-мутагенеза получены экзополисахаридные мутанты *Bradyrhizobium japonicum*, характеризующиеся замедленным образованием клубеньков и уменьшенной конкурентоспособностью [7], а также быстрорастущие клубеньковые бактерии сои *Rhizobium fredii* со сниженным синтезом общего количества экзополисахаридов, ухудшенными симбиотическими свойствами [6]. Выдвинуто предположение, что изменение структуры клеточной поверхности у Tn5-мутантов ограничивает образование клубеньков у растений сои типа *Rj₂* [9].

Кроме того, транспозоновые инсерции в генетический аппарат ризобий дают возможность расширить спектр растений-хозяев. Так, при использовании этого метода получены Tn5-мутанты штамма USDA257 *R. fredii*, способные вступать в эффективные симбиотические отношения с тремя сортами сои, тогда как исходный штамм не формировал корневые клубеньки у этих сортов [3].

Показано, что Tn5-мутанты *B. japonicum* Is-1, полученные с использованием в качестве донора штамма *Escherichia coli* S17-1 с вектором pUTKm, формировали эффективные клубеньки на корнях сои сорта CNS(Rj_2Rj_3), не совместимого с родительским штаммом [5, 10]. Авторы разработали стратегию идентификации вектора Tn5-мутантов *B. japonicum* Is-1. Для этого они предложили рестрикционную карту штамма Is-1, построенную с учетом целостности геномной последовательности штамма USDA110 [5, 10].

Методом транспозонового мутагенеза получены два мутанта *B. japonicum*, которые проявили свойства как устойчивости к фагам, так и способности к клубенькообразованию. В природных условиях инокуляция такими мутантами может уменьшать инфицирование растений фагоустойчивыми неэффективными или малоэффективными штаммами гомологичных ризобий [2].

Целью наших исследований было установление возможности использования векторов pSUP2021::Tn5 и pSUP5011::Tn5 для проведения транспозонового мутагенеза у медленнорастущих клубеньковых бактерий *B. japonicum* и получения их мутантов с измененными симбиотическими свойствами.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы *B. japonicum* 646, M6346, 6346 и *E. coli* S17-1.

Устойчивость ризобий сои к стрептомицину (Str) и канамицину (Km) изучали высевом бактериальных культур на чашки Петри с агаризованной маннитно-дрожжевой (МДА) средой такого состава, г/л: KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; NaCl – 0,1; дрожжевой экстракт – 1,0; манит – 10,0; CaCO_3 – следы; агар – 15,0. К среде добавляли определенное количество антибиотиков. Контролем служила среда без антибиотиков. Высев на чашки проводили штрихом массой клеток и суспензией бактерий.

Транспозоновый мутагенез проводили по методу Новиковой с соавт. [1], приспособленному для медленнорастущих клубеньковых бактерий сои. Культуры штамма-донора и штаммов-реципиентов выращивали до поздней логарифмической фазы роста. Конъюгативную смесь готовили смешиванием культуры донора и реципиента в соотношении 1 : 5 и высевали на агаризованную среду ТУ [4]. Штамм *E. coli* S17-1 выращивали на среде LB такого состава, г/л: триптон – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 5,0. Была выбрана экспозиция длительности контакта между ризобиями и *E. coli* при конъюгации 25 ч. После инкубации суспензию бактерий, смытую с чашек Петри, сеяли на среду с 200 мкг/мл Km и 800 мкг/мл Str для отбора полученных транспозоновых мутантов и отделения их от *E. coli* S17-1, которая чувствительна к меньшей концентрации Str. Посев осуществляли также на МДА с 800 мкг/мл Str для учета общего количества как Km^R, так и немутированных клеток, что необходимо для определения частоты образования Tn5-мутантов. Частоту транспозиции определяли по соотношению количества клеток в “0”-разведении, которые выросли на МДА + Km + Str, и количества клеток в “0”-разведении, т. е. 10^6 , которые выросли на МДА + Str.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что в работе по транспозоновому мутагенезу *B. japonicum* предполагалось использование штамма *E. coli* S17-1 с векторами pSUP2021 и pSUP5011 [8], прежде всего нужно было подобрать для этих доноров соответствующие реципиенты. Известно, что упомянутые векторы отвечают за устойчивость к стрептомицину, ампицилину и хлорамфениколу. Кроме того, в эти векторы встроены транспозоны Tn5, который кодирует устойчивость к 200 мкг/мл Km/Nm. Для проведения конъюгации донорные клетки *E. coli* S17-1 можно контрсеleccionировать стрептомицином концентрацией 600–800 мкг/мл, к которой у реципиента должна быть хромосомно кодируемая резистентность. Чтобы селекционировать образованные при конъюгации Tn5-мутанты, которые приобрели устойчивость к 200 мкг/мл Km, реципиент должен быть чувствительным к Km.

B. japonicum 646 имеет природный фенотип Km^S Str^R, то есть он чувствителен к Km и устойчив к Str. Этот штамм является подходящим реципиентом вектора pSUP2021::Tn5 и может быть также реципиентом вектора pSUP5011::Tn5-mob. Вместе с тем штамм 6346 имеет природный фенотип Km^S Str^S, и потому он не может быть реципиентом данных векторов. Для того чтобы использовать штамм 6346 в Tn5-мутагенезе, мы получили мутант M6346, устойчивый к 1000 мкг/мл Str.

Таким образом, для осуществления Tn5-мутагенеза с векторами pSUP2021::Tn5 и pSUP5011::Tn5 использовали штаммы 646 и M6346.

Клетки обоих штаммов-реципиентов в конце логарифмической фазы роста оказались компетентными (табл. 1), т. е. способными воспринять транспозон донора. Однако потенциальные возможности векторов pSUP2021 и pSUP5011::Tn5-mob по-разному реализовались у штаммов, используемых во время конъюгации. Так, у штамма 646 (см. табл. 1) с помощью вектора pSUP5011::Tn5-mob получено наибольшее количество Tn5-мутантов (рис. 1), тогда как у штамма M6346 больше Km^R-клонов выявлено при использовании pSUP2021::Tn5 (рис. 2).

Таблица 1.

Образование Tn5-мутантов при межродовой конъюгации *B. japonicum* и *E. coli* S17-1 в зависимости от штамма и вектора

Штамм-реципиент	Вектор	Количество Km ^R -мутантов на МДА + Km + Str	Общее количество ризобий на МДА + Str
		I	II
646	pSUP5011::Tn5-mob	13,4 ± 0,9	2,33 ± 0,33
	pSUP2021::Tn5	1,6 ± 0,3	5,01 ± 0,57
M6346	pSUP5011::Tn5-mob	2,25 ± 0,5	62,0 ± 4,35
	pSUP2021::Tn5	4,6 ± 0,6	128,6 ± 2,33

Примечание: I – без разведения; II – разведение 10⁶.

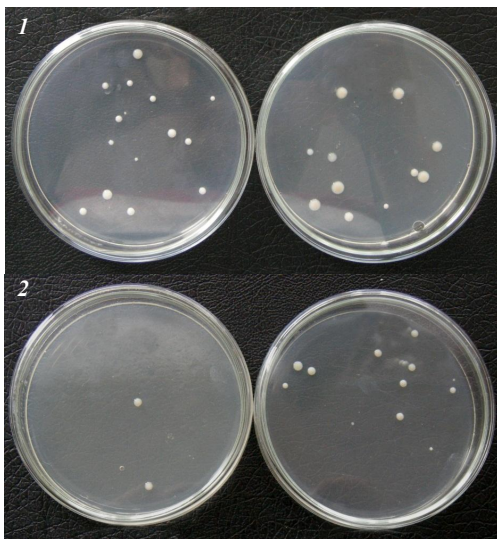


Рис. 1. Колонии Tn5-мутантов штамма 646 *B. japonicum* (среда МДА + 200 мкг/мл Km + 800 мкг/мл Str): 1 – 646 5011::Tn5; 2 – 646 2011::Tn5

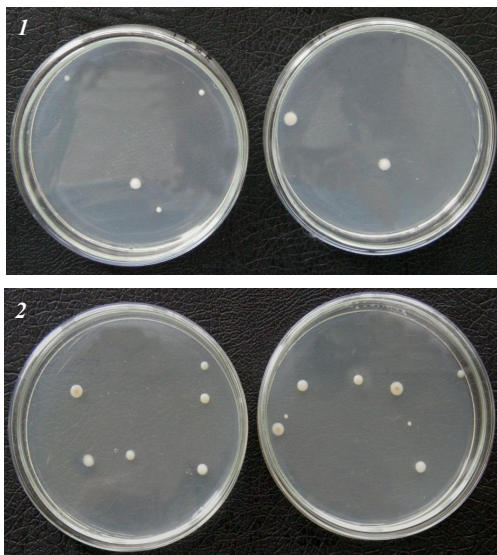


Рис. 2. Колонии Tn5-мутантов штамма M6346 *B. japonicum* (среда МДА + 200 мкг/мл Km + 800 мкг/мл Str): 1 – 6346 Str^R 5011::Tn5; 2 – 6346 Str^R 2021::Tn5

Что касается общей численности ризобий, которые выросли на среде МДА, обогащенной 800 мкг/мл стрептомицина, нужно отметить, что после конъюгации у штамма М6346 их было в 25–30 раз больше по сравнению с конъюгацией штамма 646, однако количество канамицинрезистентных мутантов штамма 646 при использовании вектора pSUP5011::Tn5-mob было в 6 раз больше, а при использовании вектора pSUP2021::Tn5 – практически в 3 раза меньше, чем при использовании штамма М6346. Необходимо обратить внимание на неодинаковые размеры образованных колоний (рис. 3). В частности, когда реципиентом вектора был штамм М6346, то в случае с вектором pSUP5011::Tn5 образованные колонии мутантов были значительно больших размеров, чем в случае использования вектора pSUP2021::Tn5. Абсолютно противоположная картина наблюдалась после конъюгации штамма 646. Колонии значительно больших размеров образовались при использовании вектора pSUP2021::Tn5 по сравнению с использованием вектора pSUP5011::Tn5.

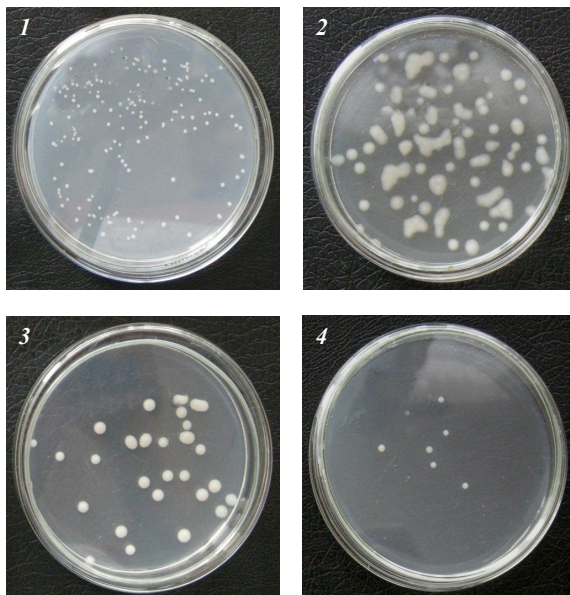


Рис. 3. Общее количество ризобий в смыве после конъюгации (среда МДА + 800 мкг/мл Str^R): 1 – 6346 Str^R 2021::Tn5; 2 – 6346 Str^R 5011::Tn5; 3 – 646 2021::Tn5; 4 – 646 5011::Tn5

Частота образования Km^R-рекомбинантов в случае межродовой конъюгации *B. japonicum* с *E. coli* S17-1 (pSUP5011 и pSUP2021) для штамма 646 составляет 10^{-5} – 10^{-6} , а для М6346 – 10^{-7} (табл. 2) является довольно высокой и не может быть результатом спонтанных мутаций.

Частота образования канамицинрезистентных рекомбинантов при межродовой конъюгации *E. coli* S17-1 с ризобиями

Штамм	Вектор	Частота транспозиции
646	pSUP5011::Tn5-mob	$0,57 \cdot 10^{-5}$
	pSUP2021::Tn5	$0,32 \cdot 10^{-6}$
M6346	pSUP5011::Tn5-mob	$0,36 \cdot 10^{-7}$
	pSUP2021::Tn5	$0,30 \cdot 10^{-7}$

Таким образом, из полученных результатов следует, что у штаммов медленнорастущих клубеньковых бактерий *B. japonicum* 646 и M6346 с помощью межродовой конъюгации с *E. coli* S17-1, которая несет векторы pSUP2021::Tn5 или pSUP5011::Tn5-mob, можно получить Km^R-мутанты. Использование вектора pSUP5011::Tn5-mob более эффективно для трансформирования генома медленнорастущих клубеньковых бактерий *B. japonicum* штаммов 646 и M6346 и позволяет получить более широкий спектр Tn5-мутантов.

Литература

1. Новикова Н.И., Шарыпова Л.А., Ситаров Б.В. Транспозоновый мутагенез у штамма СХМ1-105 *Rhizobium meliloti* // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.- 1986.- № 8.- С.32-36.
2. Appunu C., Dhar B. Isolation and symbiotic characteristics of two Tn5-derived phage-resistant *Bradyrhizobium japonicum* strains that nodulate soybean // Curr. Microbiol.- 2008.- vol. 57.- P.212-217.
3. Bellato C., Krishnan H.B., Cubo T. et al. The soybean cultivar specificity gene *nodX* is present, expressed in *nodD*-dependent manner, and of a symbiotic significance in cultivar-nonspecific strains of *Rhizobium (Sinorhizobium) fredii* // Microbiology.- 1997.- vol. 4, № 143.- P.1381-1388.
4. Beringer J.E., Hoggan S.A., Johnston A.W.B. Sincage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R plasmid-mediated recombination // J. Gen. Microbiol.- 1978.- vol. 104, № 1.- P.201-207.
5. Kaneko T., Nakamura Y., Sato S. et al. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 // DNA Res.- 2002.- vol. 9.- P.189-197.
6. Ko Y.H., Randall G. Nodule formation in soybeans by exopolysaccharide mutants of *Rhizobium fredii* USDA191 // J. Gen. Microbiol.- 1990.- vol. 136, № 1.- P.105-113.
7. Parniske M., Kosch K., Werner D., Muller P. ExoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with reduced competitiveness for nodulation of *Glycine max* // Mol. Plant-Microbe Interact.- 1993.- vol. 6, № 1.- P.99-106.
8. Simon R., O'Connell M., Labes M., Puhler A. Plasmid vector for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria // Meth. Enzymol.- 1986.- vol. 118.- P.640-659.
9. Tsurumaru H., Yamakawa T., Tanaka M., Sakai M. The efficient strategy of plasmid rescue from Tn5 mutants derived from *Bradyrhizobium japonicum* Is-1, based on

whole genome sequence information of strain USDA110 // J. Bac. Agr., Kyushu Univ.-2008.- vol. 53, N 1.- P.27-31.

10. Tsurumaru H., Yamakawa T., Tanaka M., Sakai M. Tn5 mutants of *Bradyrhizobium japonicum* Is-1 with altered compatibility with R_{j2}-soybean cultivars // Soil Sci. and Plant Nutr.- 2008.- vol. 54.- P.197-203.

Резюме

В результаті проведення транспозонового мутагенезу штамів *Bradyrhizobium japonicum* 646 і M6346 встановлена можливість використання векторів pSUP2021 :: Tn5 і pSUP5011 :: Tn5-mob для отримання KmR –мутантів медленнорослих ризобій сої. Показано, що застосування вектора pSUP5011::Tn5-mob більш ефективно для трансформування геному вказаних штамів і дозволяє отримати більш широкий спектр Tn5-мутантів.

У результаті проведення транспозонового мутагенезу штамів *Bradyrhizobium japonicum* 646 і M6346 встановлена можливість використання векторів pSUP2021 :: Tn5 і pSUP5011 :: Tn5-mob для отримання KmR –мутантів повільно рослих ризобій сої. Показано, що застосування вектора pSUP5011::Tn5-mob ефективніше для трансформування геному вказаних штамів і дозволяє одержати ширший спектр Tn5-мутантів.

As a result of the transposone mutagenesis of *Bradyrhizobium japonicum* strains 646 and M6346 the possibility to use of pSUP2021 :: Tn5 and pSUP5011 :: Tn5-mob vectors for the obtaining of KmR –mutants of slow growing soybean rhizobias is adjusted. It is shown that the applying of pSUP5011 :: Tn5-mob vector is more effective for the transformation of genome of the strains and allows to receive more large-scale spectrum of Tn5- mutants.

КРЮЧКОВА Л.О., ДРАГОВОЗ І.В., ЛАПА С.В., АВДЄЄВА Л.В.

*Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного НАН України
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 154, e-mail: k_larysa@ukr.net*

АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* ЩОДО ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРОМІЦЕТІВ

Створення сучасних біотехнологій для рослинництва передбачає дослідження асоціативних та симбіотичних процесів, що відбуваються в природних умовах. З'ясування закономірностей та механізмів формування певних взаємовідношень між рослинами та мікроорганізмами лежить в основі біологічного методу захисту рослин від хвороб.

Останні роки посилюється інтерес до використання у сільському господарстві біопрепаратів, створених на основі бактерій-антагоністів. Особливо слід відзначити спорутоутворюючі бактерії роду *Bacillus*. Перевагою таких препаратів порівняно із хімічними фунгіцидами є екологічна безпека, а порівняно з біофунгіцидами, створеними на основі бактерій роду *Pseudomonas*, є висока життєздатність та гормонсинтезувальна активність [7]. В Україні на даний час кількість біопрепаратів на основі штамів бацил обме-

жена (Лепідоцид, Фітоцид, Бактерофіт, Поліміксобактерин тощо), що вимагає створення нових препаратів з високою біологічною ефективністю.

Відомо, що основною причиною більшості захворювань рослин є мікроскопічні гриби і ооміцети. Тому підбір штамів мікроорганізмів, з антагоністичною активністю щодо фітопатогенних мікроміцетів, є надзвичайно актуальним завданням. Мікроміцети складають велику і різноманітну групу мікроорганізмів, за деякими даними чисельність видів досягає 1,5 млн [6]. І хоча фітопатогенних видів серед мікроміцетів не так багато, належність їх до різних таксономічних груп обумовлює вибірковість дії антибіотиків, літичних ензимів та інших токсичних екзометаболітів, що продукуються антагоністично активними мікроорганізмами.

Бацили синтезують антибіотики, що пригнічують ріст бактерій, ооміцетів, грибів [4]. Зазвичай один штам продукує один антибіотик, тому створюють генетично-модифіковані штами, здатні продукувати два і більше антибіотики [5].

Попередніми дослідженнями проведено оцінку антагоністичної активності бактерій роду *Bacillus* щодо фітопатогенних бактерій [2,3], виявлено штами з високою антагоністичною активністю, на основі яких створено препарат Фітодоктор та інші. Метою даної роботи було дослідити антагоністичні властивості бактерій роду *Bacillus* щодо фітопатогенних мікроміцетів

Матеріали і методи

В роботі використовували штами бацил, які зберігаються в Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Досліджували штами, які уже знайшли своє застосування на практиці (УКМ 5137, УКМ 5009, УКМ 5017, ІМВ В-7243), та штами, які не проявили антагонізму щодо фітопатогенних бактерій або з невідомим антагоністичними властивостями. Всього було проаналізовано 23 штами.

Як тест-культури використовували штами мікроміцетів, виділені із коренів, насіння пшениці та рису, бульб картоплі, відомі як збудники небезпечних хвороб сільськогосподарських культур: 1) *Gibberella zeae* (анаморфа *Fusarium graminearum*) G08; 2) *Cochliobolus sativus* (анаморфа *Bipolaris sorokiniana*) 10Z; 3) *Gaeumannomyces graminis var. tritici* 10Z; 4) *Magnaporthe oryzae* (анаморфа *Pyricularia oryzae*) Kг11; 5) *Pythium sylvaticum* 11G; 6) *Tanatephorus cucumeris* (анаморфа *Rhizoctonia solani*) F11.

Як патогени, ці види відрізняються між собою за трофністю (типом живлення), спеціалізацією (видом рослини-хазяїна) та патогенністю. Крім того, вони належать до різних систематичних груп: аскоміцетів (1-4), ооміцетів (5), базидіоміцетів (6). Всі ці ознаки певною мірою визначають специфіку їх чутливості до різних класів антибіотиків.

Антагоністичну активність штамів бацил визначали методом відстроеного антагонізму в чашках Петрі на твердому поживному середовищі – картопляному агарі (АГ) [1]. Штами-антагоністи висівали у центр чашки і інкубували протягом 24 годин при 28°C. Потім з краю чашки підсівали тест-культуру, поміщали в термостат при температурі, оптимальній для

росту мікроміцетів (24⁰C). Чутливість визначали за зоною пригнічення росту (ЗПР), яку вимірювали через 7 діб після початку інкубування.

Результати і обговорення

Оскільки мікроміцети, які складали набір тест-культур, відрізнялися між собою за швидкістю росту на штучному поживному середовищі, рейтинг антигрибної активності за ЗПР для кожного із видів визначали індивідуально. За основу було взято шкалу, запропоновану щодо *M. oryzae*, згідно з якою слабе пригнічення відповідало ЗПР 5-9 мм; середнє – 10-19 мм і сильне пригнічення – понад 20 мм [8]. У чашках Петрі діаметром 90 мм при сильному пригніченні (ЗПР 20 мм) радіус колонії *M. oryzae* у напрямку антагоністичного штаму бацил становитиме всього 10 мм, або 66% від контролю (15 мм). Щодо інших тест-культур, в залежності від швидкості їх росту, при такому пригніченні їх лінійного росту радіус становитиме: у *G. graminis var. tritici* 14,1 мм (ЗПР, відповідно, 15,9 мм); *T. cucumeris* - 20 мм (ЗПР 10 мм); *C. sativus* – 24 мм (ЗПР 6 мм).

Серед 23 проаналізованих штамів бацил жоден не проявив антагоністичної активності щодо ооміцета *P. sylvaticum*. При цьому майже всі штами пригнічували ріст аскоміцета *C. sativus*. Вийнятком були штами УКМ 5137 і ІМВ В-7243, попри виявлену у них раніше антагоністичну активність проти фітопатогенних бактерій [2,3]. Обидва штами характеризувалися відсутністю антагоністичних властивостей і щодо інших фітопатогенних мікроміцетів, лише штам ІМВ В-7243 дещо пригнічував ріст базидіоміцета *T. cucumeris*.

Із всіх штамів бацил, які були взяті для аналізу, виявлено чотири з антагоністичною активністю щодо гриба *G. zeaе (F. graminearum)*. При наявності анатагонізму по краю колоній гриба відмічали добре виражені маркувальні лінії з посиленою пігментацією, відсутню у колоній нечутливих до інших штамів бацил. Серед цих штамів було виявлено два з антагоністичною активністю проти п'яти патогенів (*G. zeaе, C. sativus, M. oryzae, G. graminis var. tritici, T. cucumeris*) і три штами, активних проти чотирьох грибів. Три штами проявили активність проти трьох патогенів, незалежно від комбінації останніх. Виявлено також три штами зі специфічною щодо базидіоміцета активністю *T. cucumeris*. Більше половини із проаналізованих штамів бацил, дещо пригнічуючи ріст колоній *C. sativus*, не проявили антагоністичної активності щодо інших мікроміцетів.

Висновки

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що у досліджених штамів бацил висока антагоністична активність щодо фітопатогенних бактерій може поєднуватися з відсутністю антагоністичної активності проти фітопатогенних мікроміцетів. Окремі штами бацил характеризуються високою антагоністичною активністю проти різних груп мікроміцетів, тому можливе створення на їх основі препаратів з широким спектром антигрибної дії.

Література

1. *Егорев Н.С.* Основы учения об антибиотиках. М.: Высшая школа, 1986. – 448 с.
2. *Лана С.В., Житкевич Н.В., Жмурко Л.Г.* Біологічний захист сої від бактеріальних хвороб / Посібний українського хлібороба. – 2011. – С.162-163.
3. Патент України на винахід № 90181, опубл. 12. 04. 2010, Бюл. №7, 2010.
4. *Chen X.H., Koumoutsi A., Scholz R et al.* Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens // J. Biotech. – 2009. – 140. – P.27-37.
5. *Glandorf D.C., Verheggen P., Jansen T. et al.* Effect of genetically modified *Pseudomonas putida* WCS358r on the fungal rhizosphere microflora of field-grown wheat // Appl Environ Microbiol. – 2001. – 67. – P.3371-3378.
6. *Hawksworth D.L.* The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation // Mycol. Res. – 1991. – 95. – P.641-655. *Ongena M., Jacques P.* Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant diseases biocontrol // Tr. Microbiol. – 2008. – 16. – P.115-125.
7. *Klopper J.W., Ryu C.-M., Zhang S.* Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. // Phytopathology. – 2004. – 94. – P. 1259-1266
8. *Zarandi M.E., Bonjar G.H.S., Dehkaei F.P. et al.* Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindensis* isolate 263 in greenhouse // Am. J. Appl. Sci. – 2009. – 6. - P.194-199

Резюме

В умовах лабораторного дослідження досліджували антагоністичну активність штамів бацил по відношенню до фітопатогенних мікроміцетів – збудників небезпечних хвороб сільськогосподарських культур. Виявлено штам, перспективний для створення біопрепаратів з широким спектром антигрибної дії.

В условиях лабораторного опыта исследовали антагонистическую активность штаммов бацилл в отношении фитопатогенных микромицетов – возбудителей опасных болезней сельскохозяйственных культур. Выявлены штаммы, перспективные для создания биопрепаратов с широким спектром антигрибного действия.

To evaluate the antagonistic activity of *Bacillus* strains against the pathogenic microfungi – causal agents of the crops diseases the bioassay was performed in lab. Strains perspective as biological control agents were revealed with wide range of antifungal action.

ЛЕОНОВА Н.О., ДАНКЕВИЧ Л.А.

Институт микробиологии і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Україна, Д 03680, Київ, вул. Заболотного,154, e-mail: ldankevich@ukr.net

ЕКЗОГЕННІ АУКСИНИ ФІТОПАТОГЕННИХ ТА БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ

Відомо, що синтез основних метаболітів, регуляція їх транспорту та, відповідно, спрямування морфогенетичних процесів у рослин відбувається за участі фітогормонів. Одним з основних класів рослинних гормонів-стимуляторів є ауксини. Ауксини відповідальні за процеси ділення клітин та

ріст розтягненням, впливають на диференціацію рослинних тканин (стимулюють процеси формування ксилеми та коріння), регулюють процеси вегетативного росту, тропізми, цвітіння та утворення зав'язі, тощо [10]. Відомо, що здатність до синтезу ауксинів властива не тільки рослинам, а і мікроорганізмам, асоційованим з рослинами, що є невід'ємною складовою взаємодії між рослиною-господарем та мікрофлорою [5]. Серед асоційованих з рослиною мікроорганізмів здатність утворювати фітогормони-стимулятори властива як симбіотичним так і патогенним бактеріям. Причому, фізіологічна доцільність синтезу певного класу гормонів у досліджуваних груп мікроорганізмів різниться. Зокрема, синтез ауксинів бульбочковими бактеріями покращує колонізацію кореневої системи, підсилює нодуляцію, що у подальшому позитивно впливає на розвиток ефективної симбіотичної системи та підвищує урожайність [6, 8]. Натомість гіперсинтез фітопатогенами ауксинів призводить до порушення гормонального статусу рослини і виникненню ряду захворювань, й, таким чином, є одним з ключових факторів їх патогенності [5]. Тому, метою досліджень була порівняльна характеристика кількісного та якісного складу ауксинів, що синтезуються різними за ефективністю штамми симбіотичних бактерій роду *Bradyrhizobium* та відмінними за агресивністю штамми фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* в умовах *in vitro*.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були бульбочкові та фітопатогенні бактерії сої родів *Bradyrhizobium* та *Pseudomonas*. У роботі використали різні за ефективністю азотфіксації в умовах симбіозу штамми азотфіксувальних бактерій: неактивний *B. japonicum* 604к та високоактивні *B. japonicum* УКМ В-6035 і *B. japonicum* УКМ В-6036. Ефективність азотфіксації досліджуваних штамів *B. japonicum* оцінювали попередньо у лабораторних та польових умовах загальноприйнятими методами [7]. Також досліджували продукцію ауксинів різними за рівнем агресивності штамми фітопатогенних бактерій: високоагресивним "*P. lupini*" 17 та середньоагресивним "*P. lupini*" 8532, а також низькоагресивним для широкого кола бобових культур "*P. lupini*" 22. У якості контрольного було обрано високоагресивний типовий штам *P. syringae* pv. *syringae* В-1027, який є класичним поліфагом та здатен уражувати понад 50 видів рослин, в тому числі і бобові культури. Агресивність досліджуваних штамів для ряду бобових культур попередньо оцінювали в умовах вегетативного будиночку та поля загальноприйнятими фітопатологічними методами. Ризобії вирощували у колбах на качалках за температури 26-28°C при 220 об/хв. протягом 72-96 годин на рідкому манітнодріжджовому середовищі. Культуру штамів *B. japonicum* в експоненціальній фазі росту центрифугували протягом 30 хв. за 15000 g за температури +4°C. Фітопатогенні бактерії культивували у колбах на качалках за температури 26-28°C при 220 об/хв. протягом 24 годин на рідкому мінеральному середовищі з додаванням 1% триптофану. Відділення клітин від надосадової

рідини здійснювали як описано вище. Надосадову рідину використовували для визначення синтезованих фітогормонів. Ауксини одержували за рахунок їх перерозподілу у двох не змішуваних між собою фазах [3]. Наступне концентрування та очищення екстрактів проводили методом препаративно-накопичувальної тонкошарової хроматографії. Визначення якісного та кількісного складу фітогормонів здійснювали методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [4]. Кількість синтезованих екзогенних фітогормонів відображали у мкг на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

Результати та обговорення

Встановлено, що синтез ауксинів виявився для ризобій штамом овою ознакою, що не пов'язана з їх симбіотичною активністю (табл. 1). Зокрема, неактивний штам *B. japonicum* 604к, який у симбіозі утворює велику кількість бульбочок з практично відсутньою нітрогеназною активністю, здатен синтезувати ауксини у великих кількостях. Штам синтезує індолні сполуки (індол-3-карбоксилу кислоту, індол-3-карбінол та індол-3-оцтової кислоти гідразин), але не синтезує фізіологічно активного для рослин ауксину – індол-3-оцтової кислоти (ІОК). Сумарний рівень синтезу ауксинів є практично рівноцінним до відповідного показника у високоефективних штамів.

Таблиця 1

Питомий синтез екзогенних ауксинів *B. japonicum*

Фітогормони		Кількість фітогормонів у мкг на 1г АСБ		
		<i>B. japonicum</i> 604к	<i>B. japonicum</i> УКМ В-6035	<i>B. japonicum</i> УКМ В-6036
Ауксини	ІОК	сліди	772,8	сліди
	Індол-3-карбоксилу кислота	216,1	сліди	772,8
	Індол-3-карбінол	442,3	сліди	369,7
	Індол-3-оцтової кислоти гідразин	408,9	сліди	598,5
	Загальна кількість ауксинів	1067,4	772,8	1222,2

Аналогічним високим рівнем синтезу характеризувався високоефективний штам *B. japonicum* УКМ В-6036: синтезу ІОК теж не спостерігали, але загальний рівень ауксинів у штаму був найвищим. Натомість, інший активний штам ризобій сої УКМ В-6035 синтезував із представлених індолних сполук лише ІОК у досить великій кількості.

Відомо, що синтез ауксинів ризобактеріями на етапі інфікування рослини пов'язують з патогенезом. Бульбочкові бактерії описують в літературі як «слабкі» патогени, адже первинні етапи формування симбіотичних стосунків є інфекційним процесом [9]. В роботі використано штами *B. japonicum*, що мають високу вірулентність та нодуляційну активність [2], тому значний синтез ауксинів є цілком закономірним. При формуванні но-

дуляційного апарату ризобіальні ауксини беруть участь в низці метаболічних процесів, включаючи клітинний поділ, диференціювання і формування судинного пучка [8]. Ці фази є необхідними для початкових етапів розвитку кореневої системи і формування бульбочок. В подальшому вмикаються інші регуляторні механізми утворення ефективного симбіозу, серед яких важливу роль відіграють і інші гормони-стимулятори, зокрема, цитоїніни та гібереліни.

Досить цікавими виявились результати синтезу ауксинів фітопатогенними бактеріями (табл. 2). Спостерігається чітка залежність між агресивністю штаму чи збудника та загальним рівнем синтезу ауксинів. Так, найвищий загальний рівень синтезу ауксинів властивий штаму *P. syringae* pv. *syringae* B-1027, що є класичним поліфагом та здатний викликати широкий спектр захворювань у понад 50 видів рослин. Натомість, решті штамів, що здатні уражувати дещо менше коло рослин, а також менш агресивні, властивий значно нижчий рівень загального синтезу ауксинів. Причому, на прикладі високоагресивного та середньоагресивного штамів "*P. lupini*" 17 та "*P. lupini*" 8532, а також низькоагресивного для широкого кола бобових культур штаму "*P. lupini*" 22 спостерігається чітка різниця у кількості синтезованих ауксинів (табл. 2). Так, серед досліджених штамів збудника мокрого водянистого гниття люпину, високоагресивний штам "*P. lupini*" 17 синтезує усі досліджувані індолні сполуки, натомість як середньо- *P. lupini*" 8532 та неагресивний штам "*P. lupini*" 22 не здатні синтезувати індол-3-карбоксальдегід (табл.2).

Таблиця 2

Питомий синтез екзогенних ауксинів фітопатогенними бактеріями роду *Pseudomonas*

Фітогормони		Кількість фітогормонів у мкг на 1г абсолютної сухої біомаси			
		" <i>P. lupini</i> " 22	" <i>P. lupini</i> " 8532	" <i>P. lupini</i> " 17	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B-1027
Ауксини	ІОК+ Індол-3-карбоксілова кислота	24,63	301,72	801,88	826,13
	Індол-3-карбінол	44,30	16,44	689,98	106,18
	Індол-3-оцтової кислоти гідразин	29,53	268,20	380,40	1055,6
	Індол-3-карбоксальдегід	сліди	сліди	203,28	сліди
	Загальна кількість ауксинів	98,46	586,36	1621,48	1987,91

Крім того, високоагресивний штам синтезує більшу кількість всіх ауксинових сполук порівняно з рештою штамів даного збудника. Тобто, загальний рівень фітогормонів ауксинової природи, що синтезуються фітопатогенними бактеріями, пов'язаний з їх агресивністю, що узгоджується

з даними літератури та підтверджує гіпотезу про те, що ауксини є одним із ключових факторів патогенності, навіть і у не пухлиніндукуючих збудників [5, 8]. Зокрема, рядом дослідників показано, що синтез ІОК тісно пов'язаний з іншими факторами патогенності, такими як утворення ліподепсинопептидів та харпінів, що, певною мірою, і пояснює зв'язок агресивності та синтезу ауксинів у збудників, що не здатні викликати гіперплазію рослинних тканин [8]. Слід також відзначити, що загальна кількість синтезованих високоагресивними штамми фітопатогенних бактерій ауксинів, дещо вища порівняно з аналогічним показником у високоактивних штамів бульбочкових бактерій (рис.1).

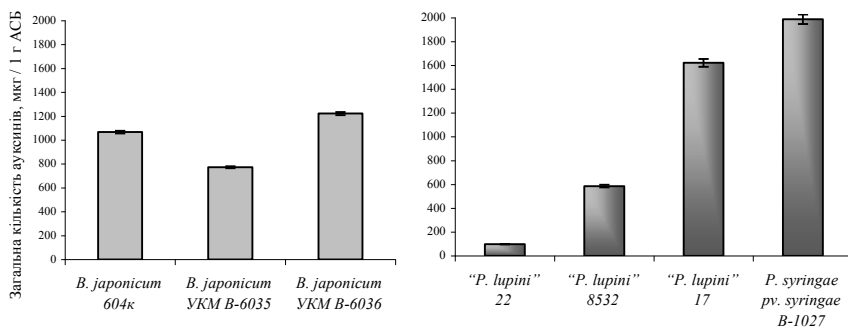


Рис.1. Синтез ауксинів бульбочковими та фітопатогенними мікроорганізмами

Висновки

Ауксини як бульбочкових, так і фітопатогенних бактерій беруть активну участь на початкових етапах інфікування рослин, після чого тактика взаємовідношень з рослиною цих груп мікроорганізмів суттєво відрізняється: симбіотичні азотфіксатори утворюють ефективний нодуляційний апарат, натомість, фітопатогенні бактерії викликають подальший розвиток інфекційного процесу, що призводить до захворювання рослини.

Література

1. Дефлинг К. Гормоны растений. Системный подход / Пер. с нем. Н. С. Гельман по ред. В.И. Кефели. — Москва: Мир, 1985. — 304 с.
2. Драгозов И.В., Леонова Н.О. Иутинская Г.А. Синтез фитогормонов штаммами *Bradyrhizobium japonicum* различной симбиотической эффективности // Микробиол. журнал. — 2011. — 73, № 4. — С. 29-35.
3. Методические рекомендации по определению фитогормонов. — Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. — 78 с.
4. Савинский С.В., Кофман И.Ш., Кофанов В.И., Стасевская И.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1987. — 19, № 2. — С. 210-215.

5. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы — продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. Биохимия и микробиология. — 2006, 42, №2. — С. 133—143.

6. Boiero L., Perrig D., Masciarelli O. et al. Phytohormone production by the strains of *B. japonicum* and possible physiological and technological implications // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2007, Vol. 74. — P. 874—880.

7. Hardy R., Holsten R., Jackson E. et al. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiology. — 1968. — Vol. 43, № 8. — P. 1185—1207.

8. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // FEMS Microbiol Rev. — 2007, Vol. 31. — P. 425—448.

9. Suslow T.V. Schroth M.N. Role of Deleterious Rhizobacteria as Minor Pathogens in Reducing Crop Growth. // Phytopathology. — 1982, Vol. 72, №1, — P. 111—115.

10. Teale W.D., Paponov I.A., Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. // Nat Rev Mol Cell Biol. — 2006, Vol.7 — P.847—859.

Резюме

Проведена кількісна і якісна оцінка синтезу ауксинів, що утворюються бульбочковими бактеріями роду *Bradyrhizobium* та фітопатогенними бактеріями роду *Pseudomonas* в умовах *in vitro*. Відмічена пряма кореляція між синтезом ауксинів та нодуляційною здатністю ризобій, а також між рівнем синтезу ауксинів фітопатогенними бактеріями та їх агресивністю.

Проведена количественная и качественная оценка синтеза ауксинов, которые образуются клубеньковыми бактериями рода *Bradyrhizobium* и фитопатогенными бактериями рода *Pseudomonas* в условиях *in vitro*. Отмечена прямая корреляция между синтезом ауксинов и нодулирующей активностью ризобий и между уровнем синтеза ауксинов фитопатогенными бактериями и их агрессивностью.

The quantitative and qualitative estimation of the auxins that synthesized by nodule forming bacteria genus *Bradyrhizobium* and the phytopathogenic bacteria genus *Pseudomonas* in condition *in vitro* have been carried out. It has been shown a direct correlation between auxin's synthesis and nodulation activity of rhizobia and between the level of auxin's production by phytopathogenic bacteria and their aggressiveness.

ЛУТЧЕНКО В.А., ПОЛИЩУК Л.В., МАЦЕЛЮХ Б.П.

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины

Украина, Д03680, Киев, вул. акад. Заболотного, 154, e-mail: vlutchenko@ukr.net

МУТАЦИИ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗНОГО ОПЕРОНА У STREPTOMYCES GLOBISPORUS 1912

β-галактозидаза – это фермент, осуществляющий разрыв β-связи в галактозидах. Данный фермент гидролизует β-связи как в простых соединениях (например, лактозы), так и сложных (например, гликозилированные изофлавоноиды). Практическое применение препараты β-галактозидазы нашли в медицине и пищевой промышленности [1].

β -галактозидазы выявлены у микроорганизмов, животных и растений. Во многих лабораториях мира изучаются микроорганизмы, которые могут использоваться при промышленном ее получении [1-3]. Большое внимание уделяют изучению генетического детерминирования синтеза β -галактозидазы у них.

Наиболее хорошо изучено строение β -галактозидазного оперона у дрожжей, кишечной палочки и ряда других микроорганизмов (например, актиномицетов) [1-3].

Установлено, что β -галактозидазные опероны *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisia*, *Streptomyces lividans* и ряда других микроорганизмов имеют подобное строение – они состоят из 3 структурных генов и двух промоторов [1-3].

Материалы и методы

В таблице 1 представлены исследуемые мутанты [4].

В работе использованы следующие среды: соевая, среда Хопвуда, жидкий и агаризованный варианты S-среды Оканиши [5, 6]. Изофлавоны генистеин и дайдзеин экстрагировали из агаризованных сред смесью хлороформ - ацетон (2 : 1). Экстракты выпаривали на роторном вакуумном испарителе при температуре 45⁰С, сухой осадок растворяли в этаноле. ТСХ проводили в системе бензол-этилацетат-ацетон-этанол (4 : 2 : 1 : 0,5) на пластинках Chromatofolios AL HPTLC Silicagel 60 F254 фирмы “Merck”. Хроматограммы просматривали и фотографировали в ультрафиолетовых лучах.

Спектры абсорбции регистрировали с помощью спектрофотометра Beckman DU-45. Для этого использовали этаноловые экстракты из пятен с силикагелевых пластинок. В качестве стандартов использовали препараты изофлавонов фирмы “Sigma”. β -галактозидазную активность культур стрептомицетов определяли общепринятым методом [7].

Результаты и обсуждение

Ферментация лактозы и других соединений, имеющих β -связь выявлена у многих актиномицетов различных родов (например, *Actinomyces viscosus*, *S. lividans*, *S. coelicolor*).

Установлено, что β -галактозидазные опероны стрептомицетов (например, *S. lividans*) состоят из 3 структурных генов (*galE*, *galT*, *galK*) и двух оперонов (P1 и P2). Структурные гены детерминируют последовательности ферментов: *galE* – эпимеразу, *galT* – трансферазу, *galK* – галактокиназу. Установлено, что оперон P1 регулируется уровнем глюкозы и галактозы в среде, а P2 – конститутивный [1-3].

В литературе встречаются сообщения об образовании стрептомицетами из компонентов соевой муки изофлавонов (в том числе дайдзеина и генистеина), путем гидролиза соответствующих гликозилированных изофлавонов β -галактозидазой [8].

Штамм *S.globisporus* 1912 был выделен в 1990 году из пробы почвы, отобранной на сельскохозяйственных угодьях Армении. Установлено, что данный штамм является продуцентом нового противоопухолевого антибиотика ландомицина Е. У штамма *S.globisporus* 1912 выявлено 2 плазмиды (рSG1912-1 та рSG1912-2). Спонтанно и действием мутагенов (УФ-излучение и нитрозогуанидин) получена коллекция мутантов *S.globisporus* 1912.

При исследовании исходной культуры *Streptomyces globisporus* 1912 было установлено наличие бета-галактозидазной активности. Наличие генистеина и даидзеина в экстрактах агаризованной соевой среды после выращивания на ней культур стрептомицетов в течение 5 суток в наших экспериментах определялось методом тонкослойной хроматографии.

Данные по изучению ферментации гликозилированных изофлавоноидов 20 мутантами *S. globisporus* 1912 представлены в таблице 2.

В данное исследование отбирались мутанты из коллекции, полученные как спонтанно, так и под воздействием химического мутагена. Было

Таблица 1

Список штаммов стрептомицетов, использованных в работе

Культура	Фенотип	Происхождение
<i>S. globisporus</i> 1912	LndE ⁺ Spo ⁺ Crt ⁻	Исходный штамм
<i>S. globisporus</i> 3-1	LndE ⁺ Spo ⁻ Crt ⁻	1912 + НГ
<i>S. globisporus</i> А1	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	3-1 + НГ
<i>S. globisporus</i> Б1	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	1912 + НГ
<i>S. globisporus</i> Б2	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	1912 + НГ
<i>S. globisporus</i> RS1	LndE ⁻ Spo ⁺ Crt ⁻	1912 + индукция профага
<i>S. globisporus</i> RS2	LndE ⁺ Spo ⁺ Crt ⁻	Ревертант RS1
<i>S. globisporus</i> 3-1Б	LndE ⁻ Spo ⁺ Crt ⁻	3-1 + НГ
<i>S. globisporus</i> 3-1К	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	3-1 + НГ
<i>S. globisporus</i> LP45	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	1912, спонтанно
<i>S. globisporus</i> BL	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	3-1 + НГ
<i>S. globisporus</i> 27S	LndE ⁻ Spo ⁺ Crt ⁻	RS2 + НГ
<i>S. globisporus</i> 141	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	1912 + НГ
<i>S. globisporus</i> 142	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	1912 + НГ
<i>S. globisporus</i> 143	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	1912 + НГ
<i>S. globisporus</i> К3	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	1912 + НГ
<i>S. globisporus</i> R3	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁺	3-1 + НГ
<i>S. globisporus</i> Y4	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁺	3-1 + НГ
<i>S. globisporus</i> RV	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁺	RS2 + НГ
<i>S. globisporus</i> 7Ж	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁺	1912, спонтанно
<i>S. globisporus</i> 2LV	LndE ⁻ Spo ⁻ Crt ⁻	RS2 + НГ

Примечания: LndE – ландомицин Е, Spo – споруляция, Crt – синтез каротиноидов.

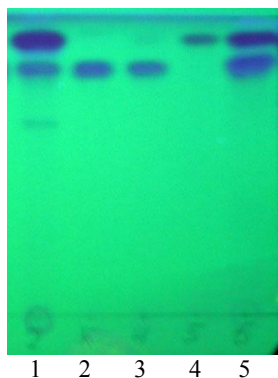
Бета-галактозидазная активность мутантов *Streptomyces globisporus*

Штамм	Наличие фермента	Штамм	Наличие фермента
1912	+	27S	+*
3-1	+	141	+
A1	-	142	-
Б1	+	143	+
Б2	-	КЗ	+
RS1	+	РЗ	+
RS2	+	У4	+
3-1Б	-	RV	+
3-1К	+*	7Ж	+
LP45	+*	2LV	+
BL	+*		

Примечание: * генистеин с измененным показателем Rf

установлено, что только 17 мутантов (85 %) ферментируют гликозилированные изофлавоноиды генистин и дайдзин с образованием генистеина и дайдзеина. 4 из них образуют генистеин со значением Rf, меньшим значения Rf стандартного генистеина фирмы “Sigma”, но имеющим тот же максимум поглощения (260 нм), что и стандартный генистеин (Рис.1А, 1Б)

А



Б

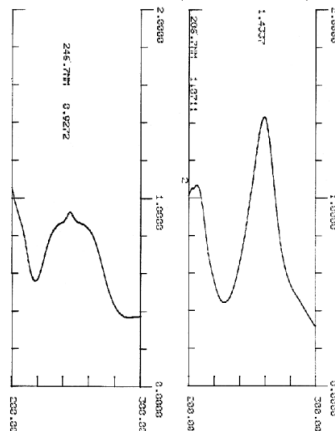


Рис.1. А - Тонкослойная хроматограмма в УФ. Дорожки: 1 – экстракт штамма Б1; 2 - дайдзеин (стандарт); 3 - экстракт нижнего пятна (дорожка 1); 4 - генистеин (стандарт); 5 - экстракт культуральной жидкости штамма Б1 (среда S с внесенными гликозидами изофлавонов сои). Б - Спектры поглощения дайдзеина (слева) и генистеина (справа) в этаноле, образованных под действием бета-галактозидазы мутанта Б1

Наличие β -галактозидазной активности у *S. globisporus* 1912 и 20 его мутантов было подтверждено с помощью классической реакции: гидролизом под действием β -галактозидазы специфического субстрата (5-бром-4-хлор-3-индол- β -D-галактозида).

Таким образом, было выявлено наличие мутаций бета-галактозидазного оперона у 4 шаммов (15%): А1, В2, 3-1В и 142. Данные мутанты были получены в результате действия нитрозогуанидина на исходный штамм (А1 и 142) или его мутант 3-1 (3-1В и В2). Мы предполагаем, что произошедшие мутации привели к инактивации β -галактозидазных оперонов. У этих 4 мутантов выявлены изменения и ряда других свойств: утрата спорообразования и синтеза антибиотика.

Образование генистеина мутантами LP45, BL, 27S и 3-1K со значением Rf, меньшим значения Rf стандартного генистеина может быть результатом модификаций продукта гидролиза генистина.

Ранее установлено, что как индуцированные, так и спонтанные мутации приводят к изменениям одних и тех же генов. По данным литературы, исследованиями геномов ряда видов стрептомицетов было установлено локализацию кластеров генов, которые детерминируют синтез вторичных метаболитов и некоторых других свойств, потеря которых не является летальными для клетки - вне коровой части хромосомы [9]. Для этой части хромосомы установлено большую лабильность генетического материала. Мы считаем, что гены, необходимые для синтеза антибиотика ландомицина Е, спорообразования, каротиногенеза и β -галактозидазной активности локализованы у штамма *S. globisporus* 1912 рядом в такой нестабильной и варибельной области хромосомы.

Выводы

У исходного штамма *Streptomyces globisporus* 1912 было установлено наличие β -галактозидазной активности. Исследовались 20 мутантов из коллекции отдела как спонтанные, так и индуцированные и выявлено мутации β -галактозидазного оперона у 15% из них (А1, В2, 3-1В и 142). Мутанты были получены под действием нитрозогуанидина на исходный штамм (А1 и 142) или его мутант 3-1 (3-1В и В2). У этих 4 мутантов и ряда других выявлены изменения и еще некоторых свойств: утрата спорообразования и синтеза антибиотика.

Было высказано предположение что гены, необходимые для синтеза антибиотика ландомицина Е, спорообразования, каротиногенеза и β -галактозидазной активности локализованы у штамма *S. globisporus* 1912 рядом в такой нестабильной и варибельной области хромосомы.

Литература

1. Westpheling J., Brawner M. Two transcribing activities are involved in expression of the *Streptomyces* galactose operon. // J Bacteriol. - 1989. - vol.171. - № 3. - P.1355-1361.

2. Adams C.W., Fornwald J.A., Schmidt F.J., Rosenberg M., Brawner M.E. Gene organization and structure of the *Streptomyces lividans* gal operon. // J Bacteriol.-1988.-vol.170.-№1.-P.203-212.

3. Kiel R.A., Tanzer J.M., Woodiel F.N. Identification, separation, and preliminary characterization of invertase and beta-galactosidase in *Actinomyces viscosus* // Infect Immun.-1977.-vol.16.-№1.-P.81-87.

4. Мацелюх Б.П., Лутченко В.А., Полищук Л.В. Синтез каротиноїдів мутантними штамми *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн.-2003.- т. 65, № 6.- С. 24-30.

5. Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J. et al. Practical *Streptomyces* genetics // Norwich, England: J. Innes Foundation. – 2000. – 613 p.

6. Okanishi M., Suzuki K., Umezawa H. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts cultural conditions and morphological study // J. Gen. Microbiol.-1974.-8.-P. 389 – 400.

7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 46 с.

8. Hu J.F., Wunderlich D., Sattler I. et al. New 2-o-methylrhamno-isoflavones from *Streptomyces* sp. // Nat Prod Res. – 2003. – 17, №6. – P.451-458.

9. Kieser H.M., Kieser T., Hopwood D.A. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome // J Bacteriol.-1992.-vol.174.-№17.-5496-5507.

Резюме

У *Streptomyces globisporus* 1912 (wild type) було встановлено наявність β-галактозидазної активності. Ислюдовались мутанти (20 шт) из коллекции отдела как спонтанные, так и индуцированные. Были выявлены мутации β-галактозидазного оперона у 4 из них (15%): А1, Б2, 3-1Б и 142. Мутанти были получены под действием нитрозогуанидина на исходный штамм (А1 и 142) или его мутант 3-1 (3-1Б и Б2).

У *Streptomyces globisporus* 1912 (wild type) було встановлено наявність β-галактозидазної активності. Досліджувалися мутанти (20 шт) з колекції відділу як спонтанні, так і індуковані. Було виявлено мутації β-галактозидазного оперону у 4 з них (15%): А1, Б2, 3-1Б и 142. Мутанти були отримані під дією нитрозогуанидину на вихідний штаб (А1 и 142) чи його мутант 3-1 (3-1Б и Б2).

The presence of β-galactosidase activity in *Streptomyces globisporus* 1912 (wild type) was detected. 20 mutants of both spontaneous and induced from the department collection were tested. It was found β-galactosidase department mutation in 4 of them (15%): А1, Б2, 3-1b and 142. The mutants were obtained under the action of nitrosoguanidine on the original strain (А1 and 142) or its mutant 3-1 (3-1B, and B2).

**ОСТАШ Б. О¹., ЖУ Л²., МАКТРИНСЬКИЙ Р. П¹., ОСТАШ І. С¹.,
ЗАБУРАННИЙ Н. В¹., ГРОМИКО О. М¹., РОР Ю²., УОКЕР С³.,
ФЕДОРЕНКО В. О.¹**

*¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна, 79005, Львів,
вул. Грушевського 4, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua*

²Університет Кентукі, США, КУ 40536-0082, Лексингтон, 725 Роуз-стріт

³Гарвардська медична школа, США, 02115, Бостон, 200/633 Лонгвуд-авеню

КОМБІНАТОРНИЙ БІОСИНТЕЗ ПРИРОДНИХ СПОЛУК У АКТИНОМІЦЕТІВ: НОВІ НАПРЯМИ

Незважаючи на гостру потребу в нових антибіотиках для лікування інфекційних та онкологічних захворювань, їхнє впровадження упродовж кількох останніх десятиліть значно сповільнилось [1, 2]. Це пояснюється поступовим вичерпанням традиційних підходів до виявлення природних сполук, які б належали до нових структурних класів, діяли на нові мішені і водночас не виявляли побічних ефектів при лікуванні того, чи іншого захворювання. Наявність і просторове розташування лише однієї функціональної групи у молекулі часто визначає характер і силу її біологічної дії [3]. Однак зміна чи введення такої групи методами хімічного синтезу вимагає значних зусиль і не завжди виправдані. У цих випадках перспективнішим є використання методів генетичної та метаболічної інженерії для “перестройки” шляху біосинтезу певної сполуки з метою отримання її похідних – ймовірно, із зміненями (покращеними) біологічними властивостями. Такий підхід отримав назву “комбінаторний біосинтез”.

Під цим терміном розуміють усю сукупність біологічних підходів до створення бібліотек споріднених природних сполук на основі певної вихідної молекули за рахунок раціональних маніпуляцій генами її біосинтезу. Іншими словами – це поєднання генетичної, метаболічної та біохімічної інженерій з метою дослідження “хімічного простору” навколо певного каркасу – полікетиду, пептиду, глікозиду тощо. Найпростіші – і найпопулярніші на сьогодні – підходи до комбінаторного біосинтезу засновані, фактично, на “змішуванні” генів споріднених біосинтетичних шляхів. Їхня спорідненість слугує запорукою, що створений рекомбінантний шлях теж буде функціональним. Такі “гібридні” генні кластери зумовлюють продукцію сполук із структурними особливостями двох вихідних біосинтезів. Водночас, набагато менше відомо про можливість конструювання бібліотек споріднених сполук при комбінаторних маніпуляціях набором генів, що походять з одного біосинтетичного шляху. Враховуючи іманентну здатність вторинного метаболізму до формування шунтів [4], можна припустити, що створення нових комбінацій генів на основі одного біосинтетичного кластера також може привести до продукції нових сполук, які не є інтермедіатами вже відомих речовин. Ми перевірили це припущення на двох кластерах генів, що контролюють біосинтез полікетиду ландоміцину E та фосфогліколіпідного

антибіотика моеноміцину А (рис. 1). Отримані дані свідчать про перспективність вищезгаданого підходу для отримання нових сполук.

Матеріали і методи

У роботі використано штами *Streptomyces globisporus* 1912 (продуцент ландоміцину Е дикого типу), *S. globisporus* M12 (*IndM2*-мутант, похідний 1912 [5]), *S. ghanaensis* ATCC4672 (продуцент моеноміцину А дикого типу).

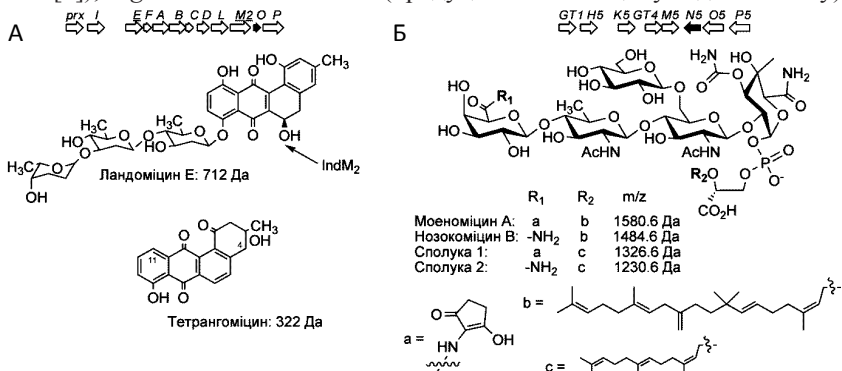


Рис. 1. Сполуки ландоміцинової (А) і моеноміцинової (Б) родин та гени, що задіяно у їхній біосинтез. Зображено тільки частину *lnd*- і *moe*-кластерів генів, де розташовано ген, що вивчали (виділено чорним кольором). Ген *lndM2* контролює С6-гідроксилювання попередника ландоміцину Е (вказано стрілкою біля структурної формули антибіотика). Білі назви сполук вказано молекулярну масу аніону (М-Н)

Для конструювання рекомбінантних плазмід і космід використано штами *Escherichia coli* DH5, *E. coli* BW25113 (pIJ790). Продукцію ландоміцинів і моеноміцинів вивчали за описаних умов глибинної ферментації і структурного аналізу [5, 6]. Для кон'югативного перенесення ДНК використано штам *E. coli* ET12567 (pUB307). Для надекспресії гена редуктази *lndO* використано плазмиду pKC1218E-NO9 [5].

Генний нокаут *moeN5* у штамі ATCC14672 виконано як описано далі. У косміді *moeN38* [6] ген *moeN5* замінено на ген стійкості до апраміцину за допомогою RedET-залежної інженерії [6]. Отриману космиду позначено *moeN38dN5*, її перенесено у клітини ATCC14672 і відібрано клон із заміщенням гена *moeN5* у геномі за фенотипом стійкості до апраміцину і чутливості до канаміцину. Факт генного нокауту доведено за допомогою комплементарного аналізу і ПЛР.

Результати та обговорення

Надекспресія гена редуктази lndO за певних умов веде до синтезу нових ангуциклінів. Згідно нашої вихідної гіпотези, маніпуляції генами, що контролюють пізні етапи біосинтезу, мають бути найперспективнішими для того типу комбінаторного біосинтезу, який ми вирішили дослідити. Це

гарантує накопичення у клітинах продуцента певного інтермедиату, достатньо модифікованого для того, щоб слугувати субстратом для шунтового шляху метаболізму. Виходячи з цих міркувань, ми зосередили свою роботу на гені *lndO*, що кодує імовірну редуктазу з шляху біосинтезу ландоміцину E. Білок LndO виявляє високий ступінь ідентичності до низки імовірних редуктаз, що кодуються генами у межах кластерів біосинтезу ангуциклінів – LanO *S. cyanogenus* (87 %), SaqO *Micromonospora* sp. 69 (66 %), UrdO *S. fradiae* (61 %) – а також до низки редуктаз з невідомою функцією у секвенованих геномах актиноміцетів. Значення редуктази LndO у продукції ландоміцинів залишається невідомим. LndO суттєво відрізняється за амінокислотною послідовністю від редуктаз SDR-типу, тому її роль у біосинтезі ландоміцинів неможливо визначити і за допомогою біоінформатичного аналізу. Як перший крок у вивченні *lndO*, ми надекспресували його у складі плазміді pKC1218Y-NO9 у штамах *S. globisporus* дикого типу (1912) і *lndM2*-мутанті (M12). У той час як у штамі дикого типу надекспресія цього гена у не змінювала спектр синтезованих ландоміцинів, штам M12 з плазмідною pKC1218Y-NO9 почав продукувати низку нових агліконів, що за масою і хроматографічною рухливістю відрізнялися від ангуцикліонів тетрангоміцинового ряду (рис. 1), характерних для штаму M12 [5]. Мажорним пікам з часом виходу 6.1, 6.6, 7.8 і 8.5 хв відповідають сполуки з масою 510, 494, 334 і 402 Да, відповідно. Усі перераховані вище сполуки мали оптимум поглинання тільки в УФ-частині спектру. Наявних даних достатньо, щоб пересвідчитись у важливості цього гена для біосинтезу ангуциклінів і зробити низку висновків про його функцію. Продукт цього гена діє на ранніх етапах біосинтезу ландоміцинів, оскільки в штамі дикого типу, де ефективно функціонують гени пізніх етапів модифікації ландоміцинону, експресія *lndO* не викликає змін біосинтезу. Отже, LndO розпізнає як субстрат один із ангуцикліонів, що накопичує штам M12, імовірніше всього – тетрангоміцин. Очевидно також, що конститутивна надекспресія *lndO* зумовлює й інші модифікації ангуцикліонів, що не відбуваються за природних умов експресії цього гена. Саме ці модифікації є причиною накопичення нових ангуциклінів.

Нокаут гена пренілсинтази moeN5 зумовлює синтез нових моеноміцинів. Біосинтез 25-карбонового пренільного ланцюга моеноміцинів (моеноцинолу) не має аналогів у вторинному метаболізмі, і, очевидно, має відбуватись у два етапи. Першим інтермедиатом у синтезі моеноміцинів має бути сполука з коротшим ланцюгом – C15- (фарнезильним) або C10- (геранільним) залишками. Однак, жоден з таких інтермедиатів не виявляли у екстрактах *S. ghanaensis* ATCC14672 – продуцента моеноміцинів дикого типу, незважаючи на інтенсивні дослідження у цьому напрямі [7]. Аналіз кластера генів біосинтезу моеноміцинів (*moe*) привів до виявлення гена пренілсинтази *moeN5*, що імовірно контролює формування моеноцинолу (рис. 1 і [6]). Щоб дослідити функцію цього гена в *S. ghanaensis* та перевірити можли-

вість синтезу нових моеноміцинів, нами виконано генний нокаут *moeN5*. Штам *S. ghanaensis* із заміною гена *moeN5* на генну касету стійкості до апраміцину (N12) дослідили за ознакою продукції моеноміцинів. У той час як штам дикого типу накопичує приблизно однакові кількості моеноміцину А та нозокоміцину В (рис. 1), то мутант N12 продукує низку нових сполук, що за хроматографічною рухливістю, молекулярною масою і характером дисоціації в експериментах з тандемної мас-спектрометрії відповідають сполукам 1 і 2, зображеним на рис. 1Б. Отже, пренілсинтаза *MoeN5* каталізує приєднання геранільного залишку до попередників моеноміцинів з С15-пренільним ланцюгом. Сполуки 1 і 2 (рис. 1Б) – нові речовини, що підтверджують гіпотезу про можливість створення продуцентів нових сполук лише за допомогою генних нокаутів у штамх дикого типу.

Наші дослідження свідчать що гетерологічна експресія генів біосинтезу антибіотиків – не єдиний методичний прийом в експериментах з комбінаторного біосинтезу антибіотиків. Надекспресія певних генів у продуцентах антибіотиків теж може вести до синтезу нових сполук. Однак, такий спосіб буде функціонувати у штамх, в яких синтез антибіотика уже певним чином змінено, створюючи передумови для формування шунтових шляхів метаболізму. У штамх дикого типу такий прийом, очевидно, не функціонує, оскільки Lnd/Lan-білки ранніх етапів модифікації ангуциклінонів дуже ефективно конкурують з білками пізніх модифікацій за спільний пул інтермедіатів, перешкоджаючи накопиченню нових сполук. На відміну від цього, мутанти за генами ранніх етапів окиснення і глікозилювання ландоміцинів є зручними об'єктами біокомбінаторних маніпуляцій. Аналогічно, ген пренілсинтази *moeN5* кодує пізній етап модифікації моеноміцинів, і маніпуляції з ним також виявились плідним напрямом комбінаторного біосинтезу. Тому ця робота розширює набір методів комбінаторного біосинтезу полікетидних і фосфогліколіпідних антибіотиків і свідчить, що потенціал генетичних методів у цій галузі залишається доволі значним.

Подяки. Дослідження у лабораторії проф. Федоренка В. О. підтримано грантами МОНмолодьспорту Бз-01Ф і Бз-98Ф.

Література

1. Payne D. J. Desperately seeking new antibiotics // Science. – 2008. – Vol. 321, № 5896. – P.1644–1645.
2. Luzhetskyy A., Pelzer A., Bechthold A. The future of natural products as a source of new antibiotics // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2007. – Vol. 8, № 8. – P.608 – 613.
3. Francotte E. Chirality in drug research Vol. 33. Eds.: Mannhold R, Kubinyi G., Folker H. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006. 360 стор.
4. Ostash B., Yan X., Fedorenko V., Bechthold A. Chemoenzymatic and bioenzymatic synthesis of carbohydrate containing natural products // Top. Curr. Chem. – 2010b. – Vol. 297. – P.105–148.
5. Zhu L., Ostash B., Rix Y [et al.]. Identification of the function of gene *lndM2* encoding a bifunctional oxygenase-reductase involved in the biosynthesis of the antitumor antibiotic landomycin E by *Streptomyces globisporus* 1912 supports the originally

assigned structure for landomycinone // J. Org. Chem. – 2005. – Vol. 70, № 2. – P.631–638.

6. *Ostash B., Saghatelian A., Walker S.* A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A // Chem. Biol. – 2007. – Vol.14. – P.257–267.

7. *Ostash B., Walker S.* Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, biological activity // Nat. Prod. Rep. – 2010. – Vol. 27. – P. 1594–1617.

Резюме

У роботі доведено ефективність надекспресії генів та генних нокаутів для створення нових сполук ландомицинового і моеномицинового рядів. Зокрема, надекспресія генів пізніх модифікацій полікетидного каркасу у мутантах за генами ранніх модифікацій веде до продукції нових сполук.

В работе показана эффективность повышенной экспрессии генов и генных нокаутов для создания новых соединений ландомицинового и моеномицинового рядов. В частности, повышенная экспрессия генов поздних модификаций поликетидного каркаса в мутантах по генам ранних модификаций ведет к продукции новых соединений.

In this work we revealed the utility of homologous gene overexpression and knock-outs for the generation of novel compounds of landomycin and moenomycin families. In particular, overexpression of genes for late polyketide tailoring reactions in the mutants deficient in early polyketide modifications leads to the production of novel angucycline molecules.

ПЕТРАЧКОВА Т.А., ПРОНИНА О.В., ШЕПЕТА Ю.Б., РУШКОВСКИЙ С.Р.

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,

Украина, 01061, Киев, ул. Владимирская 64, e-mail: tanya.petrachkova@gmail.com

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ *cdc13-1* НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Белок CDC13p защищает дрожжевую теломеру от повреждений, связывая 3'-выступающий конец теломерной одноцепочечной ДНК [1]. Клетки, несущие точечную мутацию *cdc13-1* становятся чувствительными к повышенным температурам, поскольку при возрастании температуры выше 26 °C нарушается связь белка CDC13p с теломерой, а концы хромосом уязвляются клеткой как повреждения ДНК [2-5]. Таким образом, изменяя температуру культивирования, мы можем исследовать влияние дестабилизации теломерных участков хромосом на процессы, происходящие на различных этапах формирования дрожжевой колонии. Как было показано нами ранее, процессы формирования и старения дрожжевых колоний сопровождаются нарастанием гетерогенности клеточной популяции, дестабилизацией ядерного и митохондриального геномов и формированием адаптивного вторичного роста [6,7]. Целью нашей работы было изучение влияния мутации *cdc13-1* на динамику клеточной популяции в колониях дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Материалы и методы

Работа проводилась на гаплоидных штаммах дрожжей *S. cerevisiae* DLY 1108 несущем мутацию *cdc13-1-int*. В качестве контроля использовали родительский штамм DLY 640 (линия W303) [2]. Колонии культивировали на полной питательной среде YPD при температуре 22 °C и 28 °C на протяжении 30 дней. Морфологию колоний оценивали на гигантских колониях. На протяжении периода наблюдения из материала колоний делали цитологические препараты, на которых с помощью световой микроскопии (световой микроскоп МЛ2) оценивали изменения в морфологии клеток. Состояние ядерного и митохондриального геномов оценивали с помощью люминисцентной микроскопии (прижизненное окрашивание DAPI, микроскоп Люам-4). Колониеобразующую способность культуры определяли с помощью метода микроколоний.

Результаты и обсуждение

Колонии штамма DLY 1108, культивировавшихся при 28 °C имели неправильную форму в результате активного образования секторов с измененной окраской. Их морфология значительно отличалась как от морфологии колоний, росших при 22 °C, так и от морфологии колоний родительского штамма (рис.1). Вторичный адаптивный рост (появление так называемых “бордавок” - вторичных колоний – на поверхности основной колонии) наблюдался на поздних сроках развития как родительского, так и мутантного штаммов при обеих температурах. Однако, при культивировании колоний штамма DLY 1108 при 28 °C вторичный рост формировался более активно, он распространялся по всей поверхности колонии (рис.1). При этом степень формирования вторичного роста на секторах колоний резко варьировала вплоть до его полного отсутствия. Проверка фенотипа клеток необрастающих секторов показала их неспособность расти на неферментируемых источниках углерода, что говорит о нарушении в процессе митохондриального дыхания и согласуется с нашими предыдущими данными о его влиянии на формирование вторичного роста [6].

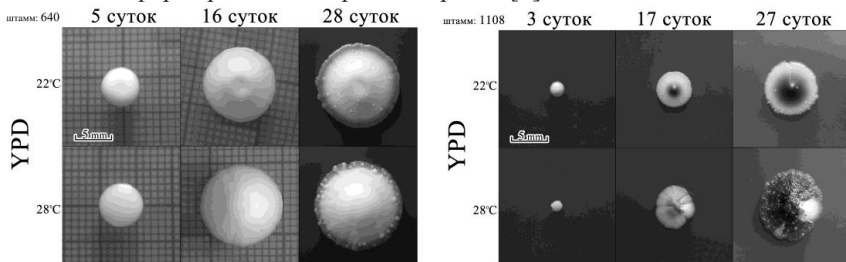


Рис.1 Морфология колоний штаммов DLY 640 и DLY 1108 культивируемых при 22°C и 28°C

Нарушения в морфологии колоний штамма DLY 1108, культивированного при 28° С, сопровождавшееся формированием секторов с измененной окраской и потерей способности к митохондриальному дыханию, активный вторичный рост свидетельствуют о дестабилизации состояния клеточной культуры. Данное предположение было подтверждено результатами цитологического анализа. При 22 °С на протяжении всего периода культивирования клетки имели типичную морфологию, характерную для родительского штамма. После 1 суток инкубации при 28° С были отмечены значительные изменения в морфологии клеток, свидетельствующие о нарушениях в клеточном цикле (рис 2.Г). Однако, при дальнейшем культивировании наряду с клетками с измененной морфологией регистрируются клетки с нормальным фенотипом, находящиеся как в стационарной, так и в логарифмической фазе роста (2 Д, Е).

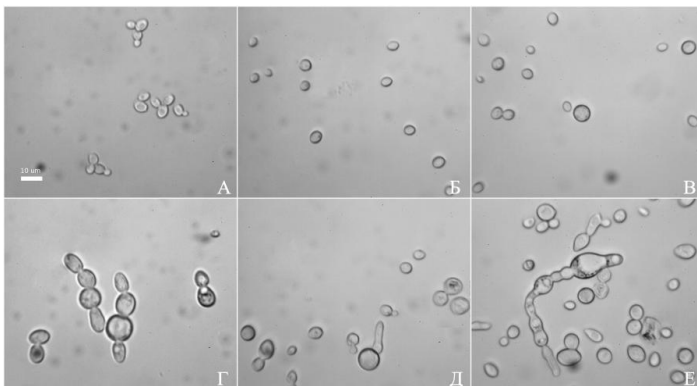


Рис.2 Гетерогенность клеточных популяций в культуре *cdc13-1* штамма на 1, 16 и 26 сутки культивирования при 22 °С (А-В) и 28 °С (Г-Е)

Анализ препаратов под люминесцентным микроскопом показал значительные нарушения в состоянии ядерного и митохондриального геномов в культурах, росших при 28 °С в течение суток. Присутствуют ядра неправильной формы, многоядерные клетки, большие безядерные почки, клетки без митохондриальной ДНК, наблюдается фрагментация ядерного материала и его распространение по клетке, что говорит об активных процессах апоптической гибели и нарушении клеточного цикла (рис.3 Г). При дальнейшем культивировании выделяется субпопуляция клеток с нормальной морфологией ядра и присутствующей митохондриальной ДНК (рис.3, Д-Е). Таким образом, данные световой и люминесцентной микроскопии свидетельствуют, что при длительном культивировании штамма DLY 1108 при 28 °С выделяются субпопуляции клеток, которые по своей морфологии и состоянию ядерного и митохондриального геномов напоминают как роди-

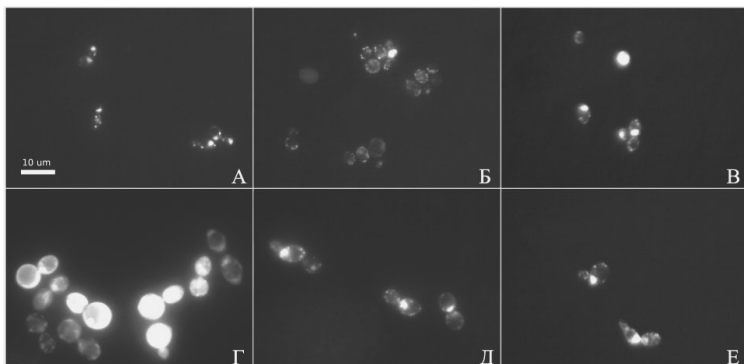


Рис 3. Состояние ядерного и митохондриального геномов в культуре штамма DLY 1108 на 1, 16 и 26 сутки культивирования при 22 °С (А-В) и 28 °С (Г-Е)

тельский штамм, так и клетки штамма DLY 1108, росших при оптимальной температуре 22 °С.

Для того, чтобы подтвердить, что выделяющиеся субпопуляции клеток с нормальной морфологией адаптированы к росту при 28 °С, нами был использован метод микроколоний. Клетки, находившиеся при 28 °С на протяжении суток, не были способны формировать микроколонии, что говорит о срабатывании механизма клеточного чек-пойнта при нарушении функций белка CDC13p. Дальнейшее культивирование клеток при 28 °С сопровождалось восстановлением способности формировать микроколонии. Клетки колоний штамма DLY 1108, росших при 22 °С, были способны образовывать микроколонии на протяжении всего периода культивирования (рис.4 А-В).

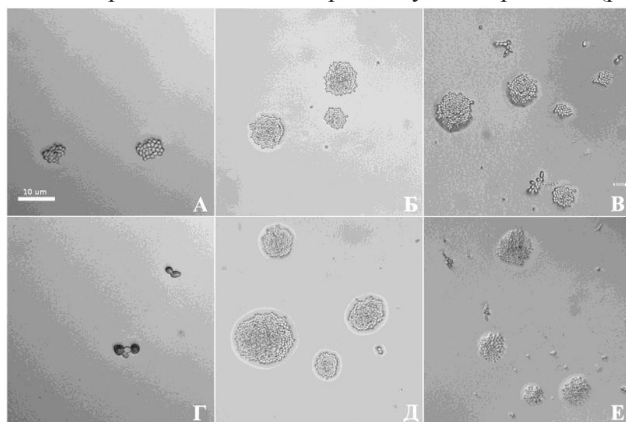


Рис.4 Развитие микроколоний штамма DLY 1108 на 1, 16 и 26 сутки культивирования при 22 °С (А-В) и 28 °С (Г-Е). А, Г 16 часов, Б, В, Д, Е – 24 часа

Таким образом, на фоне дестабилизации состояния клеточной культуры при росте штамма DLY 1108 при 28 °С появляются субпопуляции клеток, преодолевающие неблагоприятный эффект мутации *cdc13-1-int*. Это возможно либо в результате появления мутаций, супрессирующих проявления мутации *cdc13-1-int*, или активации альтернативных путей (рекомбинационных) поддержания стабильности теломер [5].

Выводы

Наличие мутации *cdc13-1-int* приводит к дестабилизации состояния клеточной культуры при 28 °С и выделению субпопуляций клеток, преодолевающих неблагоприятный эффект мутации.

Литература

1. *Lydall D.* Hiding at the ends of yeast chromosomes: telomeres, nucleases and checkpoint pathways // *J Cell Sci.* – 2003. – Vol. 116. – P. 4057 – 4065.

2. *Zubko M., Guillard S., Lydall D.* Exo1 and Rad24 differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* *cdc13-1* mutants // *Genetics.* – 2004. – Vol. 168. – P. 103 – 115.

3. *Lustig J.* Cdc13 subcomplexes regulate multiple telomere functions // *Nature structural biology.* – 2001. – Vol. 8, №4. – P. 297 – 299.

4. *Wysocki R., Kron J.S.* Yeast cell death during DNA damage arrest is independent of caspase or reactive oxygen species // *The Journal of Cell Biology.* – 2004. – Vol. 166, №3. – P. 311 – 316.

5. *Addinall S.G., Downey M., Yu M. et al.* A Genomewide Suppressor and Enhancer Analysis of *cdc13-1* Reveals Varied Cellular Processes Influencing Telomere Caping in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics.* – 2008. – Vol. 180. P. 2251 - 2266.

6. *Пронина О.В., Рушковский С. П., Петрачкова Т.А., Шенета Ю.Б.* Влияние потери митохондриальной ДНК на процессы старения в колониях дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Фактори експериментальної еволюції організмів: збірник наукових праць, т.11. – Київ: Логос, 2011. – с.69-73.

7. *Pronina O.V., Rushkovsky S.R. Shepeta Y.B., Mokrosnop V.M.* Heterogeneity of the cell population and genome instability during colony adaptive regrowth in yeast *Saccharomyces cerevisiae* Crimean Meeting: Third International Conference, Dedicated to N.W.Timofeev Ressonvsky «Modern problems of genetics, radiobiology, radioecology and evolution», Alushta, 9-14 October 2010. – Dubna: JINR, – 2010. – p. 24

Резюме

Описано влияние мутации *cdc13-1* на состояние клеточной популяции температурно-чувствительного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Показано появление субпопуляций клеток, преодолевающих неблагоприятный эффект мутации.

Описано вплив мутації *cdc13-1* на стан клітинної популяції температурно-чутливого штаму дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Показано появу субпопуляцій клітин, які здатні подолати негативний вплив мутації.

An influence of *cdc13-1* mutation on the cell population state of temperature sensitive strain of yeast *Saccharomyces cerevisiae* was described. It was shown the appearance of the cell subpopulations that able to overcome the negative effects of the mutation.

ПОЛІЩУК Л.В., ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., ЛУК'ЯНЧУК В.В.

*Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
Україна, Д03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 154,
e-mail: Polischuk@serv.imv.kiev.ua*

ДОСЛІДЖЕННЯ СИНТЕЗУ КАРОТИНОЇДІВ Crt^+ ТА Lcp^+ МУТАНТАМИ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912

В літературі широко представлено дані щодо біосинтезу каротиноїдів представниками різних родин мікроорганізмів, серед яких стрептоміцетам належить помітне місце. Масова доля стрептоміцетів, що можуть продукувати каротиноїди, складає до 15 %. Дослідження біосинтезу цих пігментів проводилося у багатьох видів (наприклад *S. chrysomallus var. carotenoides*, *S. mediolani*, *S. setonii*, *S. griseus*, *S. coelicolor* A3(2) та ряду інших) [3-5].

Встановлено, що синтез каротиноїдів у більшості стрептоміцетів є фотоіндукованим процесом, однак у ряду видів стрептоміцетів цей процес є конститутивним [7]. Однак, здатність стрептоміцетів синтезувати каротиноїди - це нестабільна ознака, що втрачається з великою частотою.

Дослідження виявили значну подібність будови кластерів генів, що детермінують каротиногенез у ряду видів стрептоміцетів (*S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. setonii*, *S. avermitilis*) та їх аналогічне розташування на хромосомі [4]. При дослідженні геному ряду видів стрептоміцетів було встановлено локалізацію кластерів генів, що детермінують синтез вторинних метаболітів і ряду інших властивостей, втрата яких не є летальною для клітини, в ділянці кінцевих інвертованих повторів. Мутанти стрептоміцетів (наприклад *Streptomyces setonii* ISP53951995), що синтезують каротиноїди були отримані індукованим мутагенезом [3]. В той же час, хоча *S. avermitilis* містить в своєму геномі гени біосинтезу каротиноїдів, мутантів за даною ознакою у нього не було виділено [6].

Матеріали та методи

У роботі було використано мутанти *Streptomyces globisporus* 1912, які синтезують каротиноїди, з колекції відділу генетики мікроорганізмів ІМВ НАНУ (таблиця). При виконанні роботи використовували агаризовані середовища соєве, Гаузе 1, картопляне, соєво-кукурудзяне [1].

Дослідження мінливості каротинсинтезуючих мутантів здійснювали визначенням частоти змін у Crt^+ фенотипу колоній стрептоміцету. Виявлення мутацій проводили на твердому середовищі візуально за зміною забарвлення досліджуваних культур, а саме рахувалися червоні (Crt^+), непігментовані (Crt^-) і рожеві (Lcp^+) колонії. Виділення каротиноїдів і їх аналіз проводили відповідно методикам [2].

Результати та обговорення

Загальновідомо, що зміни генетичного матеріалу мікроорганізмів можуть бути викликані дією мутагенних факторів чи проходити спонтанно. Встановлено, що представники роду *Streptomyces* характеризуються зна-

чною частотою спонтанних змін генотипу. Дослідження генетичної нестабільності багатьох культур стрептоміцетів визначили, що такі зміни генотипу стаються внаслідок процесів, що детермінуються самою хромосомою.

Метою даної роботи є вивчення синтезу каротиноїдів Crt^+ та Lcp^+ мутантами штаму *Streptomyces globisporus* 1912: стабільність каротиногенезу у досліджуваних культур, залежність стабільності даної ознаки мутантів від способу їх отримання та склад комплексу синтезованих мутантами каротиноїдів.

Штам *S.globisporus* 1912 було виділено у 1990 році із зразку ґрунту, що було відібрано у сільськогосподарських угіддях Вірменії. Встановлено, що даний штам є продуцентом нового протиракового антибіотика ландоміцина Е. У штаму *S.globisporus* 1912 виявлено дві плазмідні ДНК (pSG1912-1 та pSG1912-2).

Таблиця

Використані в роботі мутанти *Streptomyces globisporus* 1912

Мутант	Фенотип	Спосіб отримання
Вихідна культура		
<i>S.globisporus</i> 1912	Дикий тип $Crt^+LndE^+Spo^+$	Ізольовано із зразка ґрунту Вірменії
Червоні культури		
4 <i>Crt</i>	$Crt^+ LndE^+ Spo^-$	Спонтанно від <i>S.globisporus</i> 1912
6 <i>Crt</i>	$Crt^+LndE^+Spo^+$	Спонтанно від <i>S.globisporus</i> 191
7 <i>Crt</i>	$Crt^+ LndE^- Spo^-$	Спонтанно від <i>S.globisporus</i> 1912
RV	$Crt^+ LndE^- Spo^+$	Нітрузогуанідин, RS2
R3	$Crt^+ LndE^- Spo^-$	Нітрузогуанідин, <i>S.globisporus</i> 3-1
Y4	$Crt^+ LndE^- Spo^-$	Нітрузогуанідин, <i>S.globisporus</i> 1912
Білі мутанти		
4W1	$Crt^- LndE^- Spo^-$	УФ-випромінювання, 4 <i>Crt</i>
4W	$Crt^- LndE^- Spo^-$	Спонтанно від 4 <i>Crt</i>
7W2	$Crt^- LndE^- Spo^-$	УФ-випромінювання, 7 <i>Crt</i>
7W6	$Crt^- LndE^- Spo^-$	УФ-випромінювання, 7 <i>Crt</i>
Рожеві мутанти		
4 <i>Lcp</i>	$Lcp^+ LndE^- Spo^-$	Спонтанно від 4 <i>Crt</i>
7 Y	$Lcp^+ LndE^+ Spo^-$	7 <i>Crt</i> , спонтанно
TrS16-1	$Lcp^+ LndE^- Spo^- Trs^R$	Трансформація мутанту б/п гібридною плазмідною TrS16
TrS16-1	$Lcp^+ LndE^- Spo^- Trs^R$	
Інші мутанти <i>S.globisporus</i> 1912		
б/п	$Crt^-LndE^-Spo^+$	Спонтанно від <i>S.globisporus</i> 1912
3-1	$Crt^-LndE^+Spo^-$	Спонтанно від <i>S.globisporus</i> 1912

Спонтанно від *S. globisporus* 1912 було отримано ряд похідних: безплазмідний варіант, що втратив здатність синтезувати антибіотик ландоміцин Е (б/п); 3-1 - надпродуцент антибіотику та ряд каротинсинтезуючих мутантів (4 Crt, 6 Crt та 7 Crt). Мутант 7 Crt, на відміну від двох інших, не синтезував антибіотик ландоміцин Е.

Індукований мутагенез хромосомної ДНК клітин викликається дією хімічних, фізичних чи біологічних мутагенів. Нітрозогуанідином оброблялася вихідна культура та її похідні варіанти і було отримано низку мутантів, у яких виявили зміни біосинтетичних властивостей - мутанти RV, R3, Y4 почали синтезувати каротиноїди.

У якості мутагенного фактору у наших дослідах застосовувалося УФ-випромінювання. Під дією УФ-променів на Crt⁺-мутанти (4 Crt та 7 Crt) було отримано тільки мутанти, що втратили здатність синтезувати каротиноїди (4W1, 7W2, 7W6).

Встановлено, що є значна вірогідність отримати варіанти зі зміненими генотипом і фенотипом в експериментах по трансформації та трансфекції культур мікроорганізмів. В роботі представлені результати дослідження двох лікопінсинтезуючих мутантів (TrS16-1, TrS16-2), отриманих після трансформації безплазмідного варіанту *S. globisporus* 1912-б/п гібридною плазмідною (TrS16; 7,7 тпн). Гібридна плазміда TrS16 побудована на базі біфункціонального вектору pWHM4 (6, 6 тпн), в якому клоновано ПЛР-копію гену *SCO* 1206 *S. coelicolor* A3(2) (1,1 тпн).

Проводилося дослідження стабільності успадкування каротиногенезу у низки відібраних мутантів *Streptomyces globisporus* 1912, отриманих як спонтанно так і після обробки мутагенними факторами. Було встановлено, що мутанти, які отримано спонтанно (4 Crt, 6 Crt та 7 Crt) і під дією нітрозогуанідину (RV та R3) мають різну стабільність набутої здатності синтезувати каротиноїди. Дослідження успадкування фенотипових ознак індукованих мутантів RV та R3 виявили появу їх варіантів зі зменшеним синтезом каротиноїдів чи таких, що втратили здатність синтезувати дані сполуки. Після кожного розсіву інтенсивно забарвленої в темно червоний колір колонії (R3-Ч), поряд з колоніями, які зберегли червоне забарвлення міцелію (R3-Ч), з'являються з великою частотою (28 %) колонії, що забарвлені у помаранчевий колір (R3-О) та безпігментні колонії (R3-Б) до 27 %. Проведені дослідження виявили, що варіант R3-Б втратив здатність синтезувати каротиноїди, в той час як R3-О синтезує всі ті ж речовини, що і R3-Ч, але в значно меншій кількості. Білі ревертанти (R3-Б) є стабільними, в той же час продовжується розщеплення R3-О та R3-Ч колоній мутантів.

Спонтанні мутанти 4 Crt, 6 Crt та 7 Crt більш стабільно зберігають дану ознаку протягом багатьох років. Однак, після численних розсівів відібрано кілька колоній (4W, 4 Lcp, Y4), які мають зміни у каротиногенезі. Так, спонтанний мутант 4 Crt (4W) не синтезує каротиноїдів, а мутанти 4 Lcp та 7Y здатні синтезувати тільки лікопін.

Нами встановлено, що поява спонтанних не пігментованих Crt^- - ревертантів у Crt^+ - мутантів (4 Crt та 7 Crt) стається у середньому з частотою 0,9%. У штаму 6 Crt жодної білої колонії не виявлено серед майже семи тисяч досліджених. У мутанту RV виявлено появу спонтанної реверсії даної ознаки у 22 % колоній. Індукований мутагенез (нітрозогуанідин) призводив до росту рівня реверсій: у штаму 7 Crt білі варіанти становили 8 % з перевірених колоній (4189 шт).

Дослідження відновлення синтезу каротиноїдів у спонтанних Crt^- - ревертантів 4W, 7 Y та 7W виявило його високий рівень – кількість Crt^+ - колоній становила від 0,03 % до 6 % досліджуваних колоній. Найбільша кількість колоній ревертантів була виявлена у мутанту 7W (6% на картопляному середовищі). Найбільш стабільно фенотип зберігав мутант 4W: його Crt^+ - колонії становили 0,03 %.

Спонтанно мутант 4 Crt (з частотою 2×10^{-4}) утворює варіанти, що синтезують тільки 1 каротиноїд – лікопін. В розсівах аспорогенного мутанту 4 Crt на картопляному середовищі було відібрано мутант 4 Lcp . Результати дослідження частоти мінливості мутанту 4 Lcp (10^{-6}) свідчать про стабільний характер успадкування мутації, в результаті якої утворилися колонії Lcp^+ - фенотипу.

Як встановлено, лікопін є попередником на шляху синтезу бета-каротину і виявлено, що мутації гена $crtY$ (кодує лікопін циклазу) роблять неможливим перетворення лікопіну у каротин і до накопичення лікопіну у клітині мутанта.

В роботі представлені результати дослідження двох каротинсинтезуючих трансформантів, отриманих трансформацією безплазмідного варіанту *S. globisporus* 1912-б/п гібридною плазмідною ($TrS16$; 7,7 тпн). У ряду отриманих трансформантів протягом певного часу спостерігалось розщеплення фенотипових ознак. Так, наприклад у клону $TrS16$ було виявлено чотири фенотипи: $Crt^- LndE^+ Spo^-$, $Crt^- LndE^- Spo^+$, $Crt^- LndE^+ Spo^+$ та $Lcp^+ LndE^- Spo^-$. Лікопінсинтезуючі варіанти ($TrS16-1$, $TrS16-2$) трансформанта $TrS16$ стабільно підтримують отриманий генотип ($Crt^+ LndE^- Spo^-$) протягом 2 років.

Як видно з таблиці, отримані каротинсинтезуючі мутанти та трансформанти демонструють одночасно зміни 2 чи 3 фенотипових ознак: синтезу антибіотику, спороутворення та каротиногенез. Як встановлено, мутації та реверсії останньої є більш лабільними.

Встановлено, що як індуковані, так і спонтанні мутації призводять до змін здебільшого у одних і тих же генах. Однак, якщо за даними літератури спонтанні зміни виявляються у 0,1 % висіяних спор, то індуковані мутації виявляють у 25-100 % клітин. Результати наших експериментів також продемонстрували більшу генетичну стабільність спонтанних мутантів.

У більшості видів стрептоміцетів процес біосинтезу каротиноїдів індукується світлом певної довжини, дії стресових факторів або регенерації

протопластів [3, 6]. Встановлено, що у всіх отриманих нами каротинсинтезуючих варіантів (отриманих в результаті, як індукованих, так і спонтанних мутації) каротиногенез є конститутивним; також не виявлено впливу синього світла на синтез каротиноїдів.

При дослідженні складу комплексу каротиноїдів, синтезованих червоними мутантами (4Crt, 6Crt, 7Crt, RVCrt і R3Crt) за допомогою тонко шарової хроматографії, спектрофотометрії та високоефективної рідинної хроматографії було виявлено, що дані мутанти синтезують бета-каротин та лікопін, тими ж методами доведено, що рожеві мутанти (4Lcp, R3Lcp, TrS16-1 і TrS16-2) синтезують тільки лікопін.

Висновки

З отриманих нами результатів з впевненістю можна сказати, що каротиноїди, що синтезуються дослідженими мутантами *S. globisporus* 1912 з розблокованим внаслідок мутацій кластером генів каротиногенезу є лікопіном і бета-каротином.

Література

1. Валагурова В. Е., Козырицкая В. Е., Иутинская Г. А. Актиномицеты рода *Streptomyces*. Описание видов и компьютерная программа их идентификации. – Киев: Наукова думка. –2003. – 645 с.

2. Голембіовська С.Л., Мацелюх Б.П. Продукування каротину і лікопіну мутантами *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. - 2008. - 70, №4. - С.45-50.

3. Kato F, Hino T, Nakaji A., Tanaka M., Koyama Y. Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene crtS, whose product is similar to a sigma factor // Mol. Gen. Genet. - 1995. – V. 247, №10. – P. 387-390

4. Okanishi Y., Ishikawa J., Hara H. et al. Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350 // J. Microbiol - 2008. – V. 190, № 11. – P. 4050–4060.

5. Steinbrenner J., Linden H. Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis* // Plant Physiol. – 2001. - V. 125 - P. 810-817.

6. Takano H, Asker D, Beppu T, Ueda K. Genetic control for light – induced carotenoid production in non-phototrophic bacteria // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 2006. - V.33. – P. 88 – 93

7. Takano H., Obitsu S., Beppu T., Ueda K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187, № 5. – P. 1825–1832.

Резюме

Низку спонтанних та індукованих мутантів, що синтезують каротиноїди, отримано у штаму *Streptomyces globisporus* 1912. Доведено, що варіанти, повітряний міцелій яких забарвлений в темно-червоний колір продукують бета-каротин та лікопін; рожеві мутанти синтезують тільки лікопін. Встановлено, що спонтанні мутанти більш стабільно, ніж індуковані, успадковують набутий внаслідок мутації каротиногенез.

Ряд спонтанних і індукційованих мутантів, синтезують каротиноїди, отримано у штаму *Streptomyces globisporus* 1912. Доказано, що варіанти, з повітряного міцелію яких окрашен в темно-червоний колір синтезують бета-каротин і лікопін; рожеві мутанти лікопін. Встановлено, що спонтанні мутанти стабільніше, ніж індукційовані, наслідують придобаний внаслідок мутацій каротиногенез.

Row of spontaneous and induced mutants of *Streptomyces globisporus* 1912 that synthesize carotenoids was obtained. Variants with dark-red air mycelium synthesized beta-carotene and lycopene; pink mutants synthesized only lycopene, were proved. It was found, that spontaneous mutants more stably, than induced ones, inherited carotenogenesis which were results of mutation.

ПОЛІЩУК Л.В., ЛУК'ЯНЧУК В.В.

*Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
Україна, Д03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 154,
e-mail: Polischuk@serv.imv.kiev.ua*

АНАЛІЗ ФЕНОТИПОВИХ ОЗНАК ТРАНСФОРМАНТІВ STREPTOMYCES GLOBISPORUS 1912–Б/П

Як відомо, отримання протопластів з клітин реципієнтного штаму мікроорганізму та проведення їх трансформації гібридною ДНК – є поширеними генно-інженерними методами. Встановлено, проведення таких маніпуляцій з клітинами стрептоміцетів призводять до появи як очікуваних генотипових та фенотипових змін регенерованих клітин, так і до небажаних та неочікуваних мутацій.

Встановлено, що наслідком протопластування можуть мати місце зміни наявних у вихідній культурі властивостей чи поява нових [1]. Так, встановлено появу регенерантів у штаму *S. galbus* (*F*) *subsp. achromogenes* 695 зі значними змінами у рівні синтезу та складі комплексу синтезованих антибіотичних речовин [2]. Також повідомляється, що внаслідок протопластування у штаму *S. setonii* ISP5395, який не продукував каротиноїди було отримано мутант, що набув таку здатність [3].

Матеріали і методи

В роботі аналізували фенотипові ознаки 39 трансформантів, що було отримано при трансформації гібридними плазмідами протопластів бесплазмідного варіанта штаму *S. globisporus* 1912 [4].

Здатність продукувати антибіотичні речовини досліджували накладанням 5 денних блоків, що вирощували газоном на агаризованому соєвому середовищі, на свіжнанесені газони 7 тестерних культур стрептоміцетів *S. griseus* 3934, *S. coelicolor* A3(2), *S. olivaceus* VKX, *S. griseus* Б6, *S. lividans* 1326, *S. levoris* 165, *S. globisporus* 1912- б/п (реципієнт) [5].

Екстракцію та дослідження складу комплексу синтезованих метаболітів проводили згідно методикам [6, 7].

Результати та обговорення

Штам *S. globisporus* 1912 виділено у 1970 році із зразку ґрунту, що було відібрано у сільськогосподарських угіддях Вірменії. Встановлено, що даний штам є продуцентом нового протиракового антибіотика ландоміцина Е. У штаму *S. globisporus* 1912 виявлено дві плазмідні ДНК (pSG1912-1 та pSG1912-2). Спонтанно від *S. globisporus* 1912 було отримано у ряд похідних у тому числі і бесплазмідний варіант, що втратив здатність синтезувати антибіотик ландоміцин Е (*S. globisporus* 1912-б/п) [8].

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції ампліфіковано 1,1 тпн-фрагмент хромосоми *S. coelicolor* A3(2), що містить ген SCO1206, який кодує білки субодиниць ферменту полікетидсинтази III типу. Амплікони встроєно в човникові вектори pWHM4 та pAX5a по сайтам HindIII та EcoRI, гібридними конструкціями трансформовано компетентні клітини *Escherichia coli* XL1 Blue. Ряд гібридних плазмід, що побудовані на базі як pWHM4, так і pAX5a, переклоновано у протопластах бесплазмідного варіанту *S. globisporus* 1912- б/п.

Було проведено дослідження 39 тіострептонрезистентних трансформантів: 13 з яких містили гібридні плазмідні побудовані на базі вектора pWHM4 та 26 – сконструйовані на основі вектора pAX5a.

Антибіотичну активність трансформантів визначали відносно 7 штамів стрептоміцетів різних видів в тому числі і штаму – реципієнта.

При зберіганні культур стрептоміцетів у селективних умовах мала місце сегрегація фенотипових ознак трансгенних культур. Після численних пересівів (до утворення візуально однорідних газонів культур) та дослідження ряду властивостей останніх, було виявлено, що клони трансформантів *S. globisporus* 1912-б/п, за складом комплексів метаболітів, їх фізико-хімічними та біологічними властивостями можливо розділити на чотири групи:

1) Споруючі трансформанти продукують метаболіти, які забарвлюють середовище у синій колір та демонструють антибіотичну активність відносно 3-5 тест культур.

2) Аспорогенні трансформанти забарвлюють середовище у синій колір і їх метаболіти виявляють антибіотичні властивості на газонах ряду з використаних тест культур (3-5).

3) Споруючі непігментовані трансформанти, метаболіти яких не призводять до змін забарвлення середовища, що можна визначити візуально, однак пригнічують ріст окремих тест культур.

4) Споруючі трансформанти, що не синтезують ні пігментів, ні антибіотиків.

Встановлено, що перша група є найбільшою групою - до неї віднесено 60 % усіх досліджених трансгенних культур 1912-б/п.

Дослідження за допомогою фізико-хімічних методів (ТШХ та спектрофотометрія) екстрактів метаболітів ряду відібраних трансгенних культур

тур дозволили виявити різницю у складі синтезованих комплексів речовин: у культур з третьої та четвертої груп не виявлено піків у видимій частині спектрів поглинання та встановлено наявність значно меншої кількості плям при розподіленні екстрактів за допомогою ТШХ. Максимум поглинання метаболітів забарвлених трансформантів (1 та 2 групи) становив 460 нм.

Таке значення максимум поглинання є тотожним максимуму поглинання антибіотику ландоміцину Е, який продукується вихідним штамом *S. globisporus* 1912. Як відомо, максимум поглинання антрациклінового антибіотику ландоміцину Е становить 456 нм, в той час як його похідних (окисленої та дегідратованої) форм – 440 та 502 нм.

При спектрофотометрії комплексів метаболітів, що синтезувалися трансформантами, які містили плазмідні побудовані на основі різних векторів, також було виявлено різницю у наявності піку у УФ частині спектру з максимумом поглинання 235-240 нм. Такі піки поглинання були виявлені у трансформантів, що мали гібридні плазмідні побудовані на базі вектору рWНМ4.

Хроматографічне розподілення екстрактів ряду трансформантів, побудованих на базі обох векторів, виявило ряд речовин (Rf 0,23 та 0,6), відсутніх як у донорської, так реципієнтної культур. Також встановлено, що ряд трансгенних культур отримали здатність пригнічувати тестерні штами стрептоміцетів, які ні донорний штам, ні реципієнтний, ні wild type штам *S. globisporus* 1912 (з якого було отримано останній) не пригнічували.

Таким чином, спостерігалось розщеплення 2-3 фенотипових ознак відібраних тіострептоспрезистентних трансформантів: синтезу антибіотиків, спороутворення та пігментації колоній. Необхідно підкреслити, що наші багаторічні дослідження реципієнтного штаму *S. globisporus* 1912-б/п не виявляли змін у його забарвленні, споруючій та синтезі метаболітів з антибіотичною активністю.

При зберіганні одного з трансформантів (TrS 16) було виявлено розщеплення його фенотипу з утворенням чотирьох фенотипів: TrS 16-Сс - сині неспорулюючі колонії; TrS 16-Сн - сині неспорулюючі колонії; TrS 16-Б - білі споруючі колонії, TrS 16-Ч - червоні неспорулюючі колонії.

Дослідження фізико-хімічними методами їх метаболітів дозволили встановити, що синій пігмент, який синтезується TrS 16-Сс та TrS 16-Сн – це ландоміцин Е; варіант TrS 16-К синтезує суміш каротину та лікопіну. Раніше нами було виявлено та досліджено мутанти *S. globisporus* 1912, які набули здатність синтезувати ці каротиноїди в результаті як спонтанних, так і індукованих мутацій.

Ми вважаємо, вище представлені відмінності біосинтетичних можливостей трансгенних культур є проявом мутаційних змін генотипів трансгенних культур. Мутагенними факторами, за нашою думкою, могли бути процеси отримання протопластів *S. globisporus*, їх трансформація та не ви-

ключена можливість, незв'язаної з вищевказаними генно-молекулярними маніпуляціями, спонтанної мутації.

Встановлено, що мутації хромосомної ДНК у одного і того ж штаму мікроорганізму, не залежно від способу їх отримання, змінюють одні і ті ж гени. Однак, якщо спонтанні зміни виявляються у 0,1% спор, то індуковані зміни виявлені у 25-100% клітин [9, 10]. Крім того, показано, що внаслідок мутагенезу можуть проходити зміни двох чи більше генів мікроорганізмів одночасно [10, 11]. У нашому відділі накопичено велику колекцію мутантів *S. globisporus* 1912 як індукованих, так і спонтанних, у яких виявлено зміни рівня синтезу антибіотика ландоміцина Е, втрату спороутворення та появу синтезу каротиноїдів. Як встановлено, часто мутації призводять до одночасних змін кількох ознак, наприклад, мутант *S. globisporus* 1912/3-1 внаслідок спонтанних мутацій почав синтезувати антибіотик ландоміцин Е в 10-15 разів більше ніж вихідна культура та втратив здатність до спороутворення.

Дослідження хромосомних ДНК ряду видів стрептоміцетів (*S. coelicolor*; *S. griseus*, *S. setonii*, *S. avermitilis* та інших) виявили значну подібність будови кластерів генів, що детермінують синтез метаболітів та їх розташування на хромосомах. Як було встановлено, кластери генів, що детермінують синтез вторинних метаболітів (наприклад антибіотиків, каротиноїдів) і ряду інших властивостей, втрата яких не є летальною для клітини, локалізуються в більш лабільних ділянках, розташованих за межами корової структури хромосоми [10, 11].

Таким чином, можна висловити припущення, що кластери генів, які детермінують синтез антибіотика ландоміцина Е, каротиногенез та споруляцію у штама *S. globisporus* 1912 розташовані поруч і, вірогідніше всього, за межами корової ділянки хромосоми.

Висновки

Ми вважаємо, вище представлені відмінності біосинтетичних можливостей трансгенних культур є проявом мутаційних змін генотипів трансгенних культур. Мутагенними факторами, за нашою думкою, могли бути процеси отримання протопластів *Streptomyces globisporus* 1912-б/н, їх трансформація та не виключена можливість, незв'язаної з вищевказаними генно-молекулярними маніпуляціями, спонтанної мутації.

Можна висловити припущення, що кластери генів, що детермінують синтез антибіотика ландоміцина Е, каротиногенез та споруляцію у штама *Streptomyces globisporus* 1912 розташовані поруч і, вірогідніше всього, за межами корової частини хромосоми.

Література

1. Baltz R.H. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces* // Trends Microbiol. – 1998. – vol. 6, №2. – P.76– 83.
2. Йочева Л.Д., Антонова–Николова С.К. Влияние протопластирования на антибиотическую активность и состав актиномицинового комплекса штамма

Streptomyces galbus (F) subsp. *achromogenes* 695 и его активных вариантов // Антибиотики и химиотерапия.– 2000.– Т.5, № 4.– С.10– 13

3. Kato F, Hino T, Nakaji A, Tanaka M., Koyama Y. Carotenoid synthesis in *Streptomyces setonii* ISP5395 is induced by the gene crtS, whose product is similar to a sigma factor // Mol. Gen. Genet. – 1995. – vol. 247, №10. – P. 387– 390.

4. Лук'яничук В.В., Полищук Л.В. Клонування ПЛР-копій нуклеотидної послідовності гена SCO1206 *Streptomyces coelicolor* A3(2) // Мікроб. журн.– Т.72, № 3, С.46– 51.

5. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках.– Москва: Высшая школа.– 1985.– 448 с.

6. Мацелюх Б.П., Лутченко В.А., Полищук Л.В. Синтез каротиноїдів мутантними штамми *Streptomyces globisporus* 1912 // Мікробіол. журн. – 2003. – Т. 65, № 6. – С. 24– 30.

7. Мацелюх Б.П., Тимчик О.В., Мацелюх А.Б. Вплив умов вирощування *Streptomyces globisporus* 3–1 на продукування ландоміцину Е // Мікробіол. журн. – 2005. – Т. 67, № 4. – С. 44–51.

8. Полищук Л.В., Полевода Б.В., Заверуха В.Б., Мацелюх Б.П. Изучение стабильности наследования плазмиды pSG1912 клетками *Streptomyces globisporus* 1912 и гетерологичных штаммов стрептомицетов // Микробиол. ж.– 1992.– Т.54, №3.– С.9– 14.

9. Birch A., Hausler A., Hutter R. Genome rearrangement and genetic instability in *Streptomyces* spp. // Bacteriol.– 1990.– vol.172, № 8.– P. 4138– 4142.

10. Volff J.–N., Altenbuchner J. Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome // Mol. Microbiol.– 1996.– vol.27, № 2.– P.239– 246.

11. Dharmalingam K., Cullum J. Genetic instability in *Streptomyces* // J. Biosci.– 1996.– vol. 21, № 3.– P433– 444.

Резюме

Дослідження ряду фенотипових ознак 39 трансформантів *Streptomyces globisporus* 1912–б/п продемонстрували мутагенний ефект проведених генно–інженерних маніпуляцій. Встановлено, що мали місце одночасні мутації кластерів генів синтезу антибіотика, каротиногенезу та споруотворення. Висловлено припущення про близьке розташування даних генів на хромосомі *S. globisporus* 1912.

Исследование ряда фенотипических признаков 39 трансформантов *Streptomyces globisporus* 1912–б/п показали мутагенный эффект проведенных генно–инженерных манипуляций. Установлено, произошли одновременные мутации кластеров генов синтеза антибиотика ландомицина Е, каротиногенеза и спорообразования. Сделано предположение о близком расположении данных генов на хромосоме *S. globisporus* 1912.

Investigation of some phenotypic characters of 39 *Streptomyces globisporus* 1912–б/п transformants revealed the mutagenic effect of applied genetic engineering manipulations. Simultaneous mutations of gene clusters for antibiotic landomycin E synthesis, carotenogenesis and sporulation were found. We suggested close localization of these genes on *S. globisporus* 1912 chromosome.

РОЙ А.О., ХАРКЕВИЧ О.С.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Україна, Київ, МСП, Д 03680, вул. Заболотного 154;
e-mail: elenakharkevich@ukr.net*

ХІТИНОЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* СОНН, ЩО ПЕРСПЕКТИВНІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ БІОПРЕПАРАТІВ ДЛЯ РОСЛИНИЦТВА

Препарати на основі мікроорганізмів все ширше використовуються в сільському господарстві. Вони є ефективними та екологічно коректними засобами стимуляції росту і розвитку рослин та їх захисту від хвороб різної етіології. Ці препарати здатні активізувати імунні процеси в рослинному організмі та пригнічувати розвиток фітопатогенів за рахунок дії багатьох сполук, що дозволяє знизити хімічне навантаження на біосферу, а отже їх використання є доцільним та екологічно обґрунтованим.

Одними із активних антагоністів фітопатогенних бактерій та грибів є аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus*. Завдяки своїй лабільній ферментній системі вони мають перевагу перед іншими мікроорганізмами в боротьбі за джерела живлення різної природи та здатні до синтезу широкого спектру фізіологічно активних сполук [4, 12]. На основі високоактивного штаму *B. subtilis* IMB B-7023 було створено гранульований препарат для рослинництва, який позитивно зарекомендував себе при застосуванні під овочеві, хвойні, трав'янисті та інші рослини [2].

Метою даної роботи було вивчення антагоністичної та хітинолітичної активностей фосфатмобілізувальних бактерій роду *Bacillus*.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були 16 штамів фосфатмобілізувальних бактерій роду *Bacillus*, ізольованих з чорноземного ґрунту: *B. megaterium* – 5 штамів, *B. subtilis* – 4; *B. cereus* v. *mycoides* – 3; *B. pumilis* – 4 відповідно та мутантний штам *B. subtilis* IMB B-7023 str+, який був резистентним до стрептоміцину у концентрації 1600 мкг/мл, що дозволяє досліджувати інтродуковані в ризосферу рослин бацили [9]. В дослідках також використовували 3-ти штами мікроскопічних грибів: *Fusarium oxysporum* Schldt. 54; *Trichothecium roseum* (Pers.) Link 658; *Trichoderma viride* Pers. 614 – збудники хвороб сільськогосподарських рослин [1] з колекції культур відділу фізіології та систематики мікроміцетів інституту. Досліджені бацили культивували в статичних умовах при 25° С у рідкому середовищі Чапека з колоїдним хітином [3] як єдиним джерелом вуглецю та азоту протягом 3-х діб. Хітинолітичну активність визначали за утворенням редуруючих цукрів при гідролізі хітину з використанням 3,5-динітросаліцилової кислоти [11]. За одиницю хітинолітичної активності приймали таку кількість ферментного розчину, що необхідна для утворення 1 мкмоль N-ацетилглюкозаміну за 1 год. Активність виражали в одиницях на мг білка, який визначали за ме-

тодом Bradford [10]. Величину найвищої активності приймали за 100% та розраховували активність кожного дослідженого штаму відповідно. Сумісне культивування бацил з фітопатогеном *F. oxysporum* 54 проводили в рідкому середовищі Чапека в статичних умовах при 25° С протягом 7 діб. Клітини бацил вносили в середовище в концентрації $1,0 \times 10^8$ кл/мл одночасно з грибом ($2,0 \times 10^6$ конідій/мл). Після сумісного вирощування гриба з бактеріями одержану біомасу відмивали, висушували при 105° С до постійної ваги. Контролем була культура *F. oxysporum* 54, вирощена в таких же умовах. Ступінь пригнічення росту гриба виражали у відсотках за різницею значень біомаси гриба в контролі (100%) та досліді.

Статистичну обробку результатів експериментів здійснювали за допомогою програм Excel -2007 та Origin 7,5.

Результати та обговорення

Проведена попередня селекція бактерій роду *Bacillus* за ознаками здатності до біологічної трансформації фосфатів ґрунту, а також за наявністю антагоністичної активності до ряду мікроорганізмів. Раніше в наших дослідках було показано, що виділені штами бацил характеризувались високою антагоністичною активністю до широкого спектру фітопатогенних бактерій та мікроміцетів [5]. На прикладі найбільш активного штаму – *B. subtilis* ІМВ В-7023 було досліджено синтез ряду сполук фізіологічної дії, які можуть пригнічувати ріст фітопатогенних мікроміцетів. Це ферменти (каталаза, пероксидаза, протеаза), сполуки фенольної природи (4-гідроксіфенілоцтова кислота), лектини, амінокислоти, а також органічні кислоти [6–8].

При сумісному культивуванні бацил з фітопатогеном *F. oxysporum* 54 показано, що *B. cereus* v. *mycooides* 10 пригнічував ріст *F. oxysporum* 54 до 60% щодо контролю. Штам *B. subtilis* ІМВ В-7023, який є компонентом бактеріальних препаратів для рослинництва, виявив також значний пригнічуючий ефект на ріст гриба – до 50%. Маркований за стрептоміцином мутант та *B. subtilis* 11 слабо пригнічував ріст міцелію – лише на 2–5%. За допомогою світлової мікроскопії спостерігали морфологічні зміни міцелію грибів, що проявлялися у вздуттях та зонах лізису міцелію. При цьому також відбувалась адгезія клітин бактерій на гіфах гриба (рис.).

Досліджена властивість фосфатмобілізувальних штамів бацил руйнувати клітинну стінку мікроміцетів. Встановлена наявність хітинолітичних ферментів в культуральному середовищі у всіх 17 культур бацил. Найбільшою активністю характеризувався штам *B. cereus* v. *mycooides* 10 (100,0%); *B. megaterium*, штами 1, 2, 16 та *B. pumilus* – 4, 7, 8 також мали високі показники хітинолітичної активності – 67,8–82,5% відповідно. Однак стійкий до стрептоміцину штам показав найнижчу активність ферментів – лише 45,0%. Слід відмітити, що саме штами *B. cereus* v. *mycooides* 10, *B. megaterium* 16; *B. pumilus* 7, які характеризувались високою антагоністичною активністю до патогенних мікроміцетів також проявляли і високу хітинолітичну активність. Встановлено зниження антагоністичної та від-

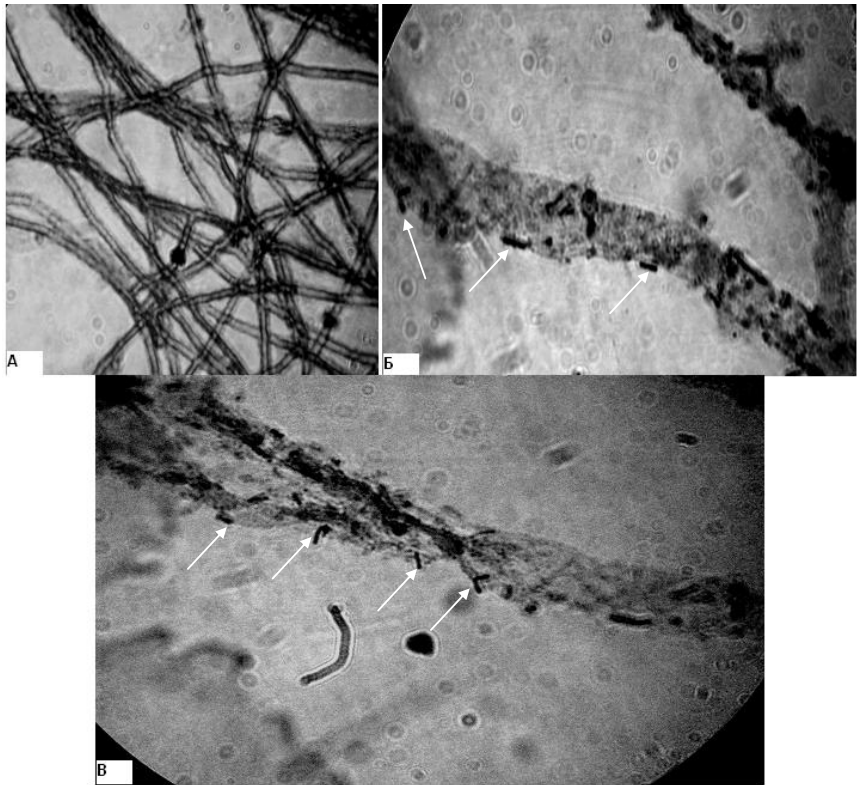


Рис. Вплив *Bacillus megaterium* 16 на морфологію гіф *Fusarium oxysporum* 54 при сумісному культивуванні в середовищі Чапека (90x10). А – контроль, Б, В – зміни міцелію, викликані бактеріями (стрілками вказані місця прикріплення і проникнення бактерій)

повідно хітинолітичної активностей для мутантного штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 str+ в порівнянні з іншими дослідженими штамами спороутворюючих бактерій, що не впливає на можливості його застосування в лабораторних дослідках як маркованого штаму.

Штам *B. cereus* v. *mycoides* 10 з найвищою хітинолітичною активністю вирощували також в середовищі на основі водопровідної води з висушеним міцелієм гриба (використовували окремо автоклавований міцелій кожного з 3-х досліджених штамів) як єдиним джерелом вуглецю та азоту. Було показано, що найбільша хітинолітична активність спостерігалась в середовищі з міцелієм *Trichotecium roseum* (100,%); тоді як з міцелієм *Trichoderma viride* 614 – 27%, а з міцелієм *F. oxysporum* 54 – 18%. Слід відмітити, що кореляція ростової та хітинолітичної активностей встановлена не була.. Здат-

ність руйнувати мертвий міцелій бацилами може відігравати важливу роль у кругообігу вуглецю та азоту у ґрунті.

Висновки

В результаті проведених досліджень показано, що виділені з чорноземного ґрунту фосфатмобілізувальні штами роду *Bacillus* здатні пригнічувати ріст фітопатогенних мікроміцетів та проявляти хітинолітичну дію щодо грибів. Антагоністичні властивості фосфатмобілізувальних бактерій роду *Bacillus* Cohn корелювали з їх хітинолітичною активністю. Показано здатність бацил використовувати актоклавований міцелій грибів як єдине джерело вуглецю та азоту.

Слід відмітити, що фосфатмобілізувальні ґрунтові бацили викликали морфологічні зміни живого міцелію мікроміцетів та були здатні руйнувати мертвий міцелій грибів. Все вищевикладене підтверджує перспективи застосування цих штамів у різних комбінаціях для створення нових біопрепаратів для рослинництва.

Література

1. Білай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. – Киев: Наукова думка, 1988. – 588 с.
2. Декларацийний патент України № 54923 А. Штам бактерій для одержання бактеріального добрива для рослинництва. Опубл. 17.03.2003. Бюл. № 3.
3. Кузнецов В.Д., Янгулова И.В. Использование среды с хитином для выделения и учета актиномицетов из почвы // Микробиология. – 1970. – Т. 39, № 5. – С. 902 – 906.
4. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn в агроэкосистемах. – М: Наука, 2007. – 119 с.
5. Рой А.А., Залоило О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К. Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бацилл к фитопатогенным грибам и бактериям // Агроекол. журн. – 2005. – № 1. – С. 50 – 55.
6. Рой А.А., Яценко И.П., Гордиенко А.С., Курдиш И.К. Свойства *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 и его стрептомицинустойчивого штамма // Прикл. биохим. микробиол. – 2011. – Т. 47, № 1. – С. 23 – 25.
7. Церковняк Л.С. Біологічно активні сполуки *Azotobacter vinelandii* ИМВ В-7076 і *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 та їх вплив на рослини: Автореф. дис.... канд. біол. наук. – Київ, 2011. – 23 с.
8. Церковняк Л.С., Рой А.О., Курдиш И.К. Синтез амінокислот *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в середовищі з гліцерофосфатом // Микробиол. журн. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 18 – 23.
9. Яценко И.П., Рой А.О. Основні властивості *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 та його маркованого штаму – компонентів бактеріальних препаратів // Агроекол. журн. – 2008. – Червень – С. 275 – 277.
10. Bradford M.M. A rapid sensitive method for the quantative of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248 – 254.
11. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars // Anal. Chem. – 1959 – N 31. – P. 426 – 428.

12. Van Veen J.A., Van Overbeek L.S., Van Elsas J.D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil // Microbiol. Molecul. Biol. Rev. – 1997. – Vol. 61, N 2. – P. 121 – 135.

Резюме

Досліджено хітинолітичну активність 17 штамів фосфатмобілізуючих ґрунтових бактерій роду *Bacillus* Cohn. Встановлено, що ці штами пригнічували ріст фітопатогенних грибів при сумісному культивуванні в статичних умовах та викликали морфологічні зміни їх міцелію. Показано здатність бацил використовувати автоклавований міцелій грибів як єдине джерело вуглецю та азоту.

Исследована хитиноподобная активность 17 штаммов фосфатмобилизирующих почвенных бактерий рода *Bacillus* Cohn. Установлено, что эти штаммы подавляли рост фитопатогенных грибов при совместном культивировании в статических условиях и вызывали морфологические изменения их мицелия. Показана способность бацилл использовать автоклавированный мицелий грибов как единственный источник углерода и азота.

The chitinolytic activity of 17 strains of phosphate mobilizing soil bacteria of genus *Bacillus* Cohn was investigated. It was established, that these strains inhibited the growth of plant pathogenic fungi under the cocultivation in static conditions and caused morphological changes of the mycelium. The ability of bacilli to use autoclaved fungal mycelium as the sole source of carbon and nitrogen was showed.

**ШТАРК О.Ю., ЖУКОВ В.А., ОВЧИННИКОВА Е.С., ДАНИЛОВА Т.Н.,
ФЕДОРОВА Я.В., ГРИШИНА О.А., КРАШЕНИННИКОВА А.С.,
БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии), Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3;
тел. (812)470 51 83; факс (812)470 43 62; e-mail: oshtark@yandex.ru*

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ У БОБОВЫХ

Арбускулярная микориза (АМ) – мутуалистический эндосимбиоз, образуемый большинством наземных растений и грибами филы *Glomeromycota*. Эти грибы представляют собой уникальную монофилетическую группу, которая коэволюционировала вместе с корнями земных растений на протяжении всей истории их развития. Предположительно, АМ сыграла решающую роль в процессе перехода растений к наземному образу жизни. АМ существует более 400 млн. лет и считается предковой формой симбиоза высших растений с различными микроорганизмами [1-3]. Грибы АМ – облигатные биотрофы – колонизируют клетки корня и ассимилируют продукты фотосинтеза (сахара, преимущественно в виде гексоз). В результате симбиоза с грибами АМ улучшается минеральное питание растений (преимущественно, фосфором), повышается их устойчивость к болезням, тяжелым ме-

таллам и засухе, а также увеличивается биоразнообразие почв, улучшается их структура, повышается плодородие [1, 4].

Таким образом, АМ имеет большое экологическое значение и высокий потенциал использования в адаптивном сельскохозяйственном производстве. Расшифровка генетических механизмов контроля развития АМ со стороны растения позволит расширить знания в различных областях биологии и разработать научную основу применения этого симбиоза в сельскохозяйственной практике.

Развитие и функционирование АМ

Процесс развития АМ включает две основные стадии: пресимбиотическую (до контакта грибной гифы с корнем) и симбиотическую (после контакта). На пресимбиотической стадии между партнерами происходит обмен диффундирующими сигнальными молекулами, выделяемыми конститутивно. Грибы АМ продуцируют молекулы липохитоолигосахаридов, т.н. Мус-факторы (от англ. «mycorrhization factors»), воспринимаемые растительными рецепторами и индуцирующие т.н. «кальциевые волны» в растительной клетке [4, 5]. Растения выделяют сесквитерпены и различные фенольные соединения, включая флавоноиды, служащие неспецифически индукторами роста и ветвления грибных гиф [4].

Растения играют активную роль в проникновении гриба АМ в корень. В результате перестройки цитоскелета клеток ризодермы и коры корня образуется тоннельная структура, РРА (от англ. «prepenetration apparatus» – аппарат, предшествующий проникновению), через которую гифа растет внутрь корня [4]. В клетках коры, прилегающих к эндодерме, формируются симбиотические компартменты, арбускулы, обеспечивающие метаболическую интеграцию партнеров. Это – сильноразветвленные грибные структуры, окруженные периабускулярной мембраной растительного происхождения. Между этой мембраной и грибной клеткой формируется активный «интерфейс», включающий полисахариды и ферменты, синтезируемые обоими партнерами [4, 6]. В клетках, содержащих арбускулы, обнаружены специфические для симбиоза фосфатные транспортеры растения и гриба. Специфические белки-транспортеры сахаров пока не локализованы [4, 7].

Микоризный путь ассимиляции фосфатов является альтернативным, поскольку растение обладает собственными системами транспорта. При высокой концентрации доступного фосфора в окружающей среде растение подавляет развитие АМ. Это является проявлением системной авторегуляции симбиоза, при нарушении которой образуется избыточное количество симбиотических структур [8]. Локально в микоризованных корнях наблюдается активация процессов, сходных с защитными реакциями растения на внедрение патогенных организмов, что является одним из предполагаемых механизмов повышения устойчивости растений к болезням за счет симбиоза с грибами АМ [4]. Эти реакции менее выражены, чем при патогенезе, и, вероятно, находятся под контролем регуляторных симбиотических генов

растения. Обнаружено множество черт сходства в развитии и функционировании АМ и азотфиксирующих клубеньков бобовых, а также других растительно-микробных симбиозов [9]. Это свидетельствует о существовании общих биологических основ взаимодействий бобовых с микроорганизмами и, соответственно, сходных систем их генетического контроля со стороны растения.

Генетическая система бобовых, контролирующая развитие и функционирование симбиотических систем

Одним из подходов, используемых для идентификации растительных симбиотических генов, является экспериментальный мутагенез. Гены, идентифицированные таким образом, т.н. *Sym*-гены [10], являются регуляторными [11]. Особенно хорошо изучена генетика развития клубеньков бобовых, образуемых с бактериями *Rizobiaceae* и некоторыми другими [12, 13]. Первые мутанты бобовых с нарушениями развития АМ были отобраны именно среди мутантов, неспособных формировать симбиотические клубеньки [14]. Этот подход является наиболее продуктивным для выявления генотипов с аномалиями развития АМ. Среди традиционных видов бобовых наиболее представительная коллекция симбиотических мутантных линий была создана для гороха (*Pisum sativum* L.) (более 200 независимых мутантов на 7 различных генотипах). В результате комплементационного анализа этих мутантов было выявлено около 40 генов, из них 9 генов оказались необходимыми для формирования, как клубеньков, так и АМ: *Sym8*, *Sym9*, *Sym14*, *Sym19*, *Sym29*, *Sym33*, *Sym36*, *Sym40* и *Sym41* [см. обзор: 13].

С использованием макро- и микросинтези геномов гороха и модельных бобовых: лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel.) K. Larsen) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.) были определены последовательности ряда регуляторных симбиотических генов гороха и их предполагаемые белковые продукты [см обзор: 13]. Растительные рецепторы, распознающие сигнальные молекулы, выделяемые грибом, пока не идентифицированы. Известно, однако, что дальнейшая передача сигнала происходит через «общий симбиотический сигнальный путь» (от англ. «Common Symbiotic Pathway», CSP), также задействованный в образовании клубенька [15]. Возможно построение следующей обобщенной модели генетического контроля развития АМ у гороха: рецепторная киназа (или комплекс) воспринимает структуру Мус-фактора, активирует киназу SYM19, что при участии катионного канала SYM8 приводит к выбросу ионов кальция из внутриклеточных «депо». «Кальциевые волны» воспринимаются кальций/кальмодулин-зависимой киназой SYM9 [см обзоры: 13, 16], которая совместно с белком SYM33 [17] активирует экспрессию последующих симбиотических генов, кодирующих гипотетические транскрипционные факторы. На примере *M. truncatula* показано, что кальций/кальмодулин-зависимая киназа ответственна за построение PPA [4]. Кроме того, известно, что ген *Sym29*, кодирующий рецепторную киназу, вовлечен в системную

регуляцию симбиоза и контролирует как число образующихся клубеньков, так и арбускул [18]. Последовательности генов CSP высококонсервативны у растений [19].

Другой подход для идентификации генов бобовых, вовлеченных в развитие и функционирование симбиозов – исследование дифференциальной экспрессии генов (как правило, определяет семейства генов, кодирующих ферменты и структурные молекулы, составляющие «молекулярную машину» симбиоза). Гены, экспрессия которых индуцируется при развитии и функционировании АМ, названы микоризинами. С использованием новейших методов транскриптомики были обнаружены сотни генов-микоризин *M. truncatula*. Индукция приблизительно ста из них, названных «симбиозины», наблюдалась при функционировании как АМ, так и азотфиксирующего симбиоза. Предполагается, что совместно индуцируемые гены могут быть связаны с различными функциями клетки, требуемыми для симбиотической эффективности, такими как активный транспорт через мембраны, окружающие симбиотические компартменты [20]. С использованием ряда симбиотических мутантов было показано, что *Sym*-гены *M. truncatula* и *P. sativum* регулируют экспрессию растительных генов-микоризин, а также генов гриба АМ [21-23].

Таким образом, у бобовых растений выявлена единая генетическая система развития АМ и азотфиксирующих клубеньков. В то же время следует отметить, что сведения о генетическом контроле развития АМ фрагментарны.

Поиск новых регуляторных генов бобовых, контролирующих развитие АМ

Для выявления генов бобовых, контролирующих развитие АМ, но не участвующих в формировании клубенька, необходимо использовать метод прямого скрининга мутантов с нарушениями развития АМ непосредственно после экспериментального мутагенеза. Этот подход достаточно трудоемок и преимущественно использовался для небобовых растений. Лишь недавно с использованием инокуляционной системы с растением-«нянькой» [24] методом прямого скрининга были выделены первые мутанты *M. truncatula* [25] и *P. sativum*, предположительно несущие мутации в неизвестных ранее генах, контролирующих развитие АМ, и не участвующих в формировании клубенька [26]. Локусы *ram-1* и *ram-2*, мутации в которых приводят к нарушению пресимбиотической стадии развития АМ у *M. truncatula*, являются кандидатами на роль рецепторов Мус-фактора [27]. Наиболее перспективным мутантом *P. sativum* оказался SGEMус⁻², мутантный фенотип которого наиболее выражен в условиях недостаточной освещенности. Подобный фенотип ранее не был описан в литературе. Авторами было установлено моногенное и рецессивное наследование данного признака. Дальнейшее изучение гена, нарушенного мутацией у линии гороха SGEMус⁻², позволит выявить молекулярно-биологические основы связи фотосинтеза

и симбиотических взаимоотношений с грибами АМ, а также механизмы регуляции данной связи.

До настоящего времени не все мутанты генетической коллекции гороха, имеющие нарушения развития клубенька, были охарактеризованы в отношении развития АМ. В особенности это относится к линиям с нарушением поздних стадий развития клубенька, например, по генам *Sym23*, *Sym24*, *Sym25*, *Sym26*, *Sym27*, *Sym32* и *Sym34*. Предполагалось, что эти гены являются специфическими только для развития клубенька и не участвуют в формировании АМ. Однако результаты фенотипического анализа, проведенного авторами, не подтвердили эту гипотезу. Напротив, линии, несущие мутантные аллели *sym23*, *sym24*, *sym27* и *sym34*, демонстрировали статистически достоверное снижение уровня микоризации корней и количества арбускул по сравнению с родительскими линиями. Согласно этому результату, данные гены вовлечены в процессы формирования не только азотфиксирующего симбиоза, но и АМ. Снижение параметров развития АМ также было выявлено авторами у мутанта гороха по гену *sym7*. Ранее было показано, что ген *sym7* кодирует активатор транскрипции GRAS-семейства, и его гомолог *NSP2* у *M. truncatula* также вовлечен в развитие клубенька и АМ [5, 28]. Таким образом, была завершена предварительная фенотипическая характеристика мутантов гороха с нарушениями развития клубенька.

Дальнейшая характеристика уникальных мутантов с дефектами развития и функционирования АМ, выявленных методом прямого скрининга, а также секвенирование и клонирование идентифицированных генов, должны внести вклад в понимание механизмов формирования и функционирования данного типа симбиоза, а также послужить основой для развития эволюционной биологии симбиозов бобовых растений.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Государственные контракты № 16.512.11.2155, П1304), грантов: президента РФ (НШ-337.2012.4), РФФИ (10-04-01146, 12-04-01687).

Литература

1. *Smith S.E., Read D.J.* 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd ed. Maryland Heights, USA: Elsevier, Academic Press. 800 p.
2. *Schüßler A.* 2002 // *Plant Soil* 244:75–83.
3. *Brundrett M.C.* 2002 // *New Phytol.* 154:275–304.
4. *Koltai H., Kapulnik Y.* (eds.) 2010. Arbuscular mycorrhizas: physiology and function, Dordrecht: Springer. 623 p.
5. *Maillet F.* et al. 2011 // *Nature* 469:58–64.
6. *Genre A., Bonfante P.* 2005 // *J Plant Interact* 1:3-13
7. *Bonfante P.* et al. 2009 // *Deising H* (ed) *The Mycota V. Plant Relationship*, 2nd ed Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 259-274.
8. *Shrihari P.C.* et al. 2000 // *Mycorrhiza* 10, 101-106.
9. *Шмарк О.Ю.* и др. 2011 // *Экологическая генетика* 2:80-94.
10. *Lie T.A.* 1971 // *Plant Soil* 34:751-752.
11. *Kouchi H.* et al. 2010 // *Plant Cell Physiol* 51 (9): 1381-1397.

12. *Provorov N.A. et al.* 2010. Developmental genetics of plant-microbe symbioses. NY, USA: Nova Science Publishers, 152 p.
13. *Борисов А.Ю.* и др. 2011 // Сельскохозяйственная биология 3:41-47.
14. *Duc G. et al.* 1989 // *Plant Sci* 60:215222.
15. *Oldroyd G.E., Downie J.A.* 2008 // *Annu Rev Plant Biol*, 59, 519-546.
16. *Shtark O.Y. et al.*, 2010 // In: Soil microbiology and sustainable crop production, G.R. Dixon, E.L. Tilston. (eds) Dordrecht: Springer. P. 119–196.
17. *Ovchinnikova E. et al.* 2011 // *MPMI* 24(11):1333-1344.
18. *Krusell L. et al.* 2002 // *Nature* 420(6914):422-426.
19. *Markmann K., Parniske M.*, 2009 // *Trends Plant Sci.* 14(2):77–86.
20. *Küster H. et al.* 2007 // *Phytochemistry* 68:8-18.
21. *Sanchez L. et al.* 2005 // *Plant Physiol.* 139:1065–1077.
22. *Seddas P.M.A. et al.* 2009 // *MPMI* 22:341–351.
23. *Kuznetsova E. et al.* 2010 // *Mycorrhiza* 20(6):427-443.
24. *Rosewarne G. et al.* 1997 // *Mycol Res* 101:966-970.
25. *Marsh J.F. et al.* 2006 // In: Handbook & Abstracts of 3rd International Conference on Legume Genomics & Genetics, Brisbane, Australia, April 9-13, 2006, p 52.
26. *Shtark O.Y. et al.* 2007 // *Pisum Genetics* 39:26-27.
27. *Marsh J.F. et al.* 2008 // In: Abstract Book of 8th European Nitrogen Fixation Conference, Gent, Belgium, August 30-September 3, 2008, p 26.
28. *Kalo P. et al.* 2005 // *Science* 308(5729):1786-1789.

Резюме

Охарактеризована генетическая система бобовых, контролирующая развитие арбускулярной микоризы (АМ). Выявлены новые регуляторные гены гороха, контролирующие развитие АМ.

The genetic system of legumes, which controls the development of arbuscular mycorrhiza (AM), is described. New regulatory pea genes, which control the development of AM, have been identified.

БІОТЕХНОЛОГІЇ В СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ ТА МЕДИЦИНІ

**¹БАВОЛ А.В., ^{1,2}МОРГУН Б.В., ²НІТОВСЬКА І.О., ²РУДАС В.А.,
¹ДУБРОВНА О.В.**

¹ *Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,*

03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17; e-mail: dubrovny@ukr.net

² *Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,*

03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ З ВИКОРИСТАННЯМ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР, ОТРИМАНИХ З АПКАЛЬНОЇ МЕРИСТЕМИ ПАГОНА

Трансформація рослин та отримання генетично модифікованих організмів передбачає перенесення чужорідної ДНК в геном заданого виду (сорту). Згідно даних Міжнародної служби оцінки результатів впровадження біотехнологічних розробок (ISAAA) [1] площа занята під трансгенними культурами в світових масштабах станом на 2011 р. складає 160 млн га та невпинно зростає. Оскільки тканини м'якої пшениці мають низьку чутливість до агробактеріальної інфекції, то більшість дослідників вважають біолістичну трансформацію найперспективнішим методом генетичної інженерії даної культури. Одним із перших повідомлень про успішну біолістичну трансформацію пшениці є робота Вейзіл та співавторів [2], після якої опубліковано значну кількість робіт, що розвивали даний напрямок [3-5]. Разом з тим, до цього часу для генетичної трансформації пшениці зазвичай використовують культуру незрілих зародків, що пов'язано з рядом труднощів. Зокрема, основними недоліками використання незрілих зародків є: 1) значні затрати виробничих потужностей та людських ресурсів; 2) обмеженість робіт у часі, оскільки незрілі зародки доступні тільки певний період протягом вегетаційного періоду (якщо рослинний матеріал вирощується на вегетаційних ділянках); 3) велика вартість експлантів (якщо рослинний матеріал вирощується в умовах штучного клімату); 4) значна тривалість експериментальної роботи, адже необхідно виростити рослину з насінини до фази колосіння; 5) необхідність контролю процесу запилення, тому що морфогенний потенціал отриманого калюсу корелює з віком використаних експлантів. Ці недоліки значно обмежують не тільки вдосконалення існуючих методик, а і загалом роботу по генетичній трансформації пшениці. Щоб уникнути зазначених недоліків дослідники пропонують альтернативні експланти: тканини зрілих зародків [6, 7], незрілі суцвіття [8], сегменти листків [9] та ін. Нами вперше була розроблена ефективна систе-

ма *in vitro*, на основі використання як експланта верхівки пагона тридобо-вих проростків [10], яка була застосована для проведення робіт по генетич-ній трансформації м'якої пшениці.

Метою даної роботи було вивчення можливості отримання трансфор-мованих клітинних ліній м'якої пшениці методом біолістичної трансфор-мації, а також виявлення оптимального віку вихідного калюсу та схем клі-тинної селекції для добору трансформованих форм.

Матеріали та методи

Матеріалом досліджень був сорт-дворучка Зимоярка, створений в Ін-ституті фізіології рослин і генетики НАН України. Індукцію калюсогене-зу та культивування калюсних культур проводили по розробленій нами ме-тодиці [10]. Як експлант використовували верхівку пагона 3-добового про-ростка.

Генетичну трансформацію здійснювали біолістичним методом, вико-ристовуючи саморобну гармату типу particle inflow gun (PIG). Біолістич-ну трансформацію м'якої пшениці проводили, використовуючи векторну конструкцію рАНС25 [13], яка містить селективний ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*), що забезпечує стійкість трансформованих клітин-них ліній до фосфінотрицину та репортерний ген β -глюкуронідази (GUS).

Для приготування золотих частинок з нанесеною плазмідною ДНК до 50 мкл суспензії часточок золота (30 мг/мл в 50% гліцеролі) діаметром 0,6 мкм (Bio-Rad) додавали 10 мкл плазмідної ДНК (1 мкг/1 мкл) та 20 мкл роз-чину ПЕГ/MgCl₂ (50% ПЕГ 2000, 5M MgCl₂) у співвідношення 4:1. Після інкубації протягом щонайменше 30 хв при кімнатній температурі часточки центрифугували 1 хв при 2000 об/хв, відбирали наdosад та ресуспендува-ли в 60 мкл абсолютного етилового спирту. Калюси за 4 години до обстрілу викладали на середовище N6 [14] з 0,3 М манітолом по центру в коло діаме-тром 3 см. Чашки з калюсами встановлювали на відстані 14 см від решітки, на яку наносили часточки з нанесеною ДНК (6 мкл). Перед обстрілом тиск у камері зменшували до 0,07 атмосфер. Після інкубування в темряві при температурі 27 °С протягом ночі калюси переносили на середовище N6. Че-рез 3 доби калюси переносили на селективне середовище.

Експресію репортерного гена β -глюкуронідази (GUS) виявляли за до-помогою гістохімічного фарбування тканин *in situ* [15]. ДНК калюсних культур виділяли згідно методики Делапорта [11] з певними модифікація-ми. Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Пере-вірку стабільності прояву ампліконів довжиною 355 п.н., здійснювали шля-хом повторного проведення ампліфікації з праймерами 5'CGTCA TGCCA GTTCC CGTGC TT3' та 5'CCGCA GGAGT GGACG GACGA3' на рослинно-му матеріалі відповідно до раніше описаних методик [12].

Результати досліджень

На першому етапі досліджень виявляли експресію гена GUS. Швидку перевірку функціональної активності цільових білків гена-репортера здій-

снювали на другу добу після трансформації шляхом виявлення транз'єнтної експресії. Для цього у довільному порядку відбирали калуси з кожної чашки. В ході роботи у всіх досліджуваних варіантах було відмічено експресію репортерного гена, що підтверджує коректність використаних параметрів трансформації та свідчить про високу функціональну активність векторної конструкції.

Відомо, що вік вихідного калусу може мати вирішальний вплив на ефективність генетичної трансформації. У наших дослідженнях використовували калус різного віку: на 14 та 28 добу культивування (по 40 чашок в кожному варіанті та по 5 чашок для контролю). Загалом в експерименті було використано 80 чашок, в кожній з яких було по 40 калусів. Ще 20 чашок, які слугували контролем, не піддавали трансформації.

Таблиця 1.

Ефективність різних схем клітинної селекції за біолістичної трансформації калусів різного віку

Вік калусу, дб	Схема клітинної селекції	Загальна кількість калусів, шт.	Кількість отриманих стійких клітинних ліній	
			шт.	%
14	пряма	400	4	1
	ступінчаста	400	7	1,75
28	пряма	400	9	2,25
	ступінчаста	400	11	2,75
14 (контроль)	пряма	200	–	–
	ступінчаста	200	–	–
28 (контроль)	пряма	200	–	–
	ступінчаста	200	–	–

Добір трансформованих клітинних ліній здійснювали на середовищі з селективним агентом – фосфінотрицином. У роботі застосовували дві схеми селекції: пряму та ступінчасту. За прямої селекції *in vitro* калуси висаджували на середовище з 10 мг/л фосфінотрицину. Загалом, після трьох пасажів було отримано 4 стійкі клітинні лінії у варіанті з 14-добовими калусами та 9 стійких клітинних ліній у варіанті з 28-добовими калусами. Також використовували ступінчасту клітинну селекцію: після трансформації калуси висаджували на середовище з 2 мг/л фосфінотрицину, а у наступних двох пасажах концентрацію селективного агента збільшували відповідно до 5 та 10 мг/л. Завдяки такому підходу вдалося отримати 7 клітинних ліній у варіанті з 14-добовими калусами та 11 стійких клітинних ліній у варіанті з 28-добовими калусами. Ефективність різних схем клітинної селекції наведена в таблиці 1. В той же час, у контрольному варіанті за прямого та ступінчастого добору стійких до фосфінотрицину клітинних ліній отримати не вдалося.

Отримані данні свідчать, що ступінчаста клітинна селекція є більш ефективною, оскільки в результаті її застосування вдалося отримати більше потенційно трансгенних клітинних ліній. Також показано, що для біолістичної трансформації більш доцільно використовувати 28 добові калуси.

В подальшому для виявлення стабільної експресії гена GUS проводили гістохімічне фарбування тканин калюсу через 42 доби після трансформації (останній пасаж на селективному середовищі). Для цього відбирали невеликі шматки з калусів, які задовольняли наступним критеріям: активно росли на селективному середовищі з фосфінотрицином та були морфогенними. Загалом з 31 отриманої клітинної лінії тільки 18 задовольняли даним параметрам. Стабільна експресія гена GUS була підтверджена у 10 клітинних ліній.

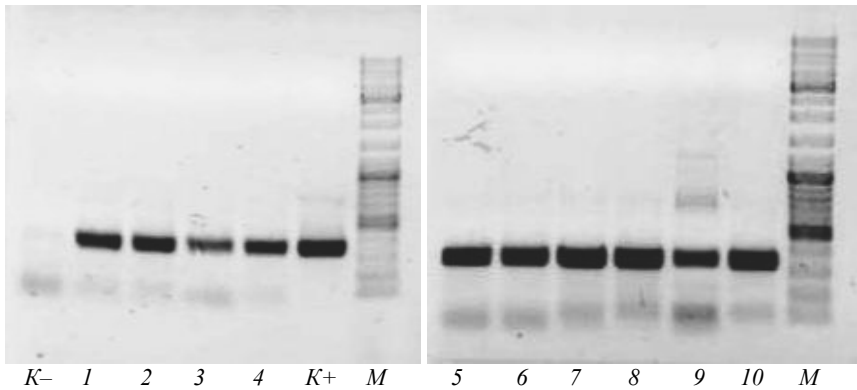


Рис. 1. ПЛР аналіз на наявність *bar* гена клітинних ліній пшениці: *K*- – негативний контроль; 1-10 – клітинні лінії (LT1-LT10); *K*+ – позитивний контроль; *M* – маркер молекулярної маси (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas)

За результатами дослідження, нами було відібрано 10 клітинних ліній у яких відмічено експресію генів *bar* (фенотипова ознака – активний ріст на середовищі з селективним агентом – фосфінотрицином) та GUS (фенотипова ознака – наявність стабільного характерного забарвлення калусів). Щоб підтвердити трансгенний статус відібраних клітинних ліній, проводили ПЛР-аналіз (рис. 1), який засвідчив наявність гена *bar* в геномі досліджуваних об'єктів.

Висновки

Таким чином, за використання методу біолістичної трансформації отримано 10 трансформованих клітинних ліній м'якої пшениці та підтверджено їх трансгенний статус. Показано, що за біолістичної трансформації використання 28-добових калусів значно ефективніше, ніж 14-добових. Для добору трансформованих клітинних ліній на середовищі з фосфінотрицином більш доцільно застосовувати ступінчасту клітинну селекцію.

Література

1. Clive J. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. *ISAAA Brief* No. 43. ISAAA: Ithaca, NY.
2. Vasil V., Castillo A-M., Fromm M. E., Vasil I. K. Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus// *Nature Biotechnology*. – 1992. – Vol. 10. –P. 667 – 674.
3. Rasco-Gaunt S., Riley A., Barcelo P., Lazzeri P. A. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues// *Plant Cell Reports*. – 1999. –Vol. 19, N 2, -P. 118-127.
4. Pastori G.M., Wilkinson M.D., Steele S.H., Sparks C.A., Jones H.D., Parry M.A. Age-dependent transformation frequency in elite wheat varieties // *J. Exp. Bot.* -2001. – Vol. 52, N 357. –P. 857-863.
5. El-Mangoury K.A., Abdrabou R.Th., Yasien M., Fahmy A. Optimization of a transformation system for three Egyptian wheat cultivars using immature embryo-derived callus via microprojectile bombardment // *Arab. J. Biotech.* -2006. -Vol. 9, N 1. –P. 175-188.
6. Delporte F., Mostadel O., Jacquemin J. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. -2001. - Vol. 67, N 2. -P.73-80.
7. Мирошніченко Д. Н., Порошин Г. Н., Долгов С. В. Генетическая трансформация пшеницы с использованием тканей зрелых семян // *Биотехнология*. –2010. -№ 6. –С. 34-41.
8. Benkirane H., Sabounji K., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* -2000.–Vol. 61. -P.107–113.
9. Haliloglu K. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments // *Bio-logia Plantarum*. -2006. -Vol. 50, N3. -P. 326-330.
10. Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І. Регенерація рослин із експлантів верхівки пагона проростків пшениці // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. -2007, - Т. 5, № 1-2. -С. 3-10.
11. Dellaport S. L., Wood J., Hicks J. A plant DNA miniprep: Version II [J] // *Plant Molecular Biology Reporter*. –1983. –Vol. 1, № 14. –P. 19–21.
12. Сахно Л.А., Моргул В.Б., Кваско Е.Ю., Кучук Н.В. Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *сур11А1* цитохрома P450ссс животного происхождения // *Биотехнология*. - 2010, - Т. 3, №5. -С. 74-82.
13. Christensen A.H., Quail P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* –1996. –Vol. 5, № 3. –P. 213-8.
14. Pescitelli S.M., Sukhapinda K. Stable transformation via electroporation into maize Type II callus and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell Rep.* –1995. –Vol. 14, –P. 712-6.
15. Jefferson R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* –1987. –Vol. 5. –P. 387-405.

Резюме

Використовуючи метод біолістичної трансформації отримано 10 трансформованих клітинних ліній м'якої пшениці та підтверджено їх трансгенний статус. Показано, що за біолістичної трансформації використання 28-добових калусів значно

ефективніше. Для добору трансформованих клітинних ліній на середовищі з фосфінотрицином більш доцільно застосовувати ступінчасту клітинну селекцію.

Используя метод библистической трансформации, получено 10 трансформированных клеточных линий мягкой пшеницы и подтвержден их трансгенный статус. Показано, что для библистической трансформации использование 28-суточных каллусов значительно эффективнее. Для отбора трансформированных клеточных линий на среде с фосфинотрицином более целесообразно применять ступенчатую клеточную селекцию.

Using the method of biolistic transformation we have obtained 10 transformed cell lines of common wheat, and confirmed their transgenic status. It is shown that the use of 28-days old calli for biolistic transformation is much more efficient compared to younger calli. For selection of transgenic cell lines at the medium containing phosphinothricin as selective agent, it is more appropriate to apply the step-type cell selection.

БАЖИНА Е.В.

Институт леса им. В.Н.Сукачева СО РАН,

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок 50/28, e-mail: genetics@ksc.krasn.ru

РЕПРОДУКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ И СОХРАНЕНИЕ ЕЕ ГЕНОФОНДА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Пихта сибирская (*Abies sibirica* Ledeb.) в горах Южной Сибири характеризуется низкой жизнеспособностью пыльцы и семян [1, 2]. Семена являются важнейшим, а часто и единственным способом воспроизводства и сохранения генофондов хвойных растений. Оценка репродуктивного потенциала вида, как правило, проводится по жизнеспособности женских генеративных структур: качеству семян и семенной продуктивности макростробиллов [3]. Снижению жизнеспособности семян данного вида в горных экосистемах способствует его усыхание [4,5]. Низкий репродуктивный потенциал и усыхание деревьев пихты сибирской в горных экосистемах могут привести к обеднению генофонда данного вида.

В настоящее время перспективным направлением сохранения генофондов растений является плантационное лесовыращивание, основанное на современных биотехнологиях массового размножения улучшенных генотипов растений [6]. Развитие биотехнологических подходов и методов культивирования *in vitro* позволяет создать высокоэффективную систему получения устойчивых растений-регенерантов, повысить качество посадочного материала, ускорить селекционный процесс и сохранить ценные генотипы растений. Одним из наиболее перспективных методов культивирования хвойных является соматический эмбриогенез, который в сочетании с криоконсервацией широко применяется при плантационном лесовыращивании в США, Китае, Франции и Канаде [6,7].

В настоящей работе проведена оценка репродуктивного потенциала пихты сибирской в горах Южной Сибири, а также представлены первые

результаты по разработке биотехнологии микрклонального получения растений-регенерантов данного вида в культуре *in vitro* для сохранения и массового тиражирования устойчивых к абиотическому стрессу генотипов деревьев пихты сибирской.

Материалы и методы

Исследования проводились в 17 разновысотных ценопопуляциях пихты сибирской, произрастающих в разнотравных, крупнотравных и зеленомошных группах типов леса в различных частях гор Южной Сибири: Хамар-Дабана, Западного и Восточного Саян, Кузнецкого Алатау и северо-восточного Алтая (табл. 1). В каждой из ценопопуляций изучали семенную продуктивность макроствобилов и качество семян 10-30 деревьев. Определялись следующие показатели: длина и ширина зрелой шишки, число семенных чешуй, число семян, выход семян. Качество семян определялось методом рентгенографии [8]. Поскольку значительную часть полных семян в популяциях уничтожает наездник-семяед (*Megastigmus specularis* Walley) определялся потенциальный выход полных семян в популяции (семена, имеющие зародыш + поврежденные конобионтами семена).

В культуру *in vitro* были введены незрелые зиготические зародыши на стадии формирования семядолей, собранные во 2 декаде августа [9]. Семена подвергались холодной обработке в течение двух недель и стерилизовались в спиртовом растворе 5%-го йода. В стерильных условиях зародыши извлекались из мегагаметофитов и переносились на питательную среду. При введении в культуру зародыши помещались на базовые питательные среды $\frac{1}{2}$ MS и $\frac{1}{2}$ LV, дополненные 2,4-Д (1 мг/л) и БАП (2 мг/л), а также 30 г/л сахарозы. Кислотность среды была приведена к 5,8 до автоклавирования. Для пролиферации применялись среды с пониженным содержанием сахарозы и БАП, различающиеся по содержанию аскорбиновой кислоты (200 и 500 мг/л). Культивирование осуществлялось в темноте, при $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Цитологические исследования каллусной ткани проводили на временных давленных препаратах с помощью микроскопа Микромед-2, статистическая обработка проводилась при помощи пакета анализа Microsoft Excel 2000.

Результаты и обсуждение

Для пихты сибирской характерна чрезвычайно высокая (среди видов семейства *Pinaceae*) семенная продуктивность макроствобилов: в зависимости от генотипических особенностей деревьев, погодных условий года развития и лесорастительных условий выход морфологически развитых семян из шишки варьирует от 56,8 до 85,5%. Однако высокий репродуктивный потенциал пихты сибирской реализуется лишь частично: доля полнозернистых семян составляет 2,9-67,7 % в разных ценопопуляциях. Одним из наиболее значительных факторов в изъятии полноценных семян является пихтовый семяед *Megastigmus specularis* Walley, изымающий в зависимости от высоты произрастания 2,7-89,0% полнозернистых семян

Таблица 1

Характеристика объектов исследований

№ п/п	Место произрастания	широта	долгота	Высота над уровнем моря, м	Состав древесности
1	д. Елань, окрестности г. Енисейск	58°21' с.ш.	91°49' в.д.	100	6П2Е1Ос1Б
2	пос. Козулька Емельяновский район	56°12' с.ш.	91°10' в.д.	300	7П1Ос1Б1К
3	хр. Восточный Саян	55°57' с.ш.	92°18' в.д.	200	5ПЗЕ2С+Ос
4	хр. Восточный Саян	55°52' с.ш.	92°51' в.д.	640	7П2К1Е
5	хр. Восточный Саян	55°53' с.ш.	92°34' в.д.	830	9П1К
6	хр. Западный Саян	53°08' с.ш.	92°56' в.д.	400	7П2Ос1Б
7	хр. Западный Саян	53°00' с.ш.	93°13' в.д.	1000	8П2К
8	хр. Западный Саян	52°50' с.ш.	93°15' в.д.	1450	8П2К
9	хр. Кузнецкий Алатау	54°93' с.ш.	88°36' в.д.	567-778	4К6П, 1К9П
10	хр. Кузнецкий Алатау	55°00' с.ш.	88°42' в.д.	850	1К9П
11	хр. Кузнецкий Алатау	54°94' с.ш.	88°33' в.д.	1000	4К6П
12	Северо-восточный Алтай	51°20' с.ш.	87°51' в.д.	542	3К7П
13	Северо-восточный Алтай	51°90' с.ш.	87°59' в.д.	1100	7К3П
14	побережье оз. Байкал	51°43' с.ш.	105°53' в.д.	550	5Б4П1К
15	хр. Хамар-Дабан	51°17' с.ш.	104°19' в.д.	1200	9П1К
16	пос. Новобирилюссы	67°57' с.ш.	90°39' в.д.	181	7П3К
17	пос. Маслянино Новосибирская обл.	54°20' с.ш.	84°13' в.д.	462	9П1К

(рис. 1). Высокая стерильность семян пихты сибирской обусловлена также недостаточным опылением семяпочек макростробила, наблюдаемым даже в оптимальных условиях произрастания, и генотипической неоднородностью деревьев [2]. Очевидно, естественное возобновление данного вида поддерживается лишь за счет значительного количества продуцируемых семян: в урожайные годы число макростробилов на дереве может превышать 150 шт., число семян 300шт. на макростробил.

Введение в культуру мегагаметофитов и изолированных зиготических зародышей пихты на ранних стадия развития (глобулярный эмбрио) оказалось не эффективным. Индукции образования каллуса не происходило. Оптимальной стадией развития зиготического зародыша для формирования каллусной массы оказался семядольный зародыш, достигающий 2/3 и более длины зародышевого канала. Формирование морфогенного каллуса наблюдалось у 30% эксплантов на 14-18 сутки культивирования на всех питательных средах. Наибольшей способностью к пролиферации обладал каллус, полученный на среде ½MS с добавлением 2,4-Д (2,0 мг/л) и 6-БАП

(1-2 мг/л), масса которого через два месяца культивирования ($0,074 \pm 0,008$ г) почти в три раза превышала массу каллуса на среде только с 6-БАП и на среде $\frac{1}{2}$ LV ($0,024 \pm 0,002$ и $0,028 \pm 0,003$ г соответственно). Однако при дальнейшем культивировании на этой среде каллусы начинали отмирать, и были пересажены на среду $\frac{1}{2}$ LV.

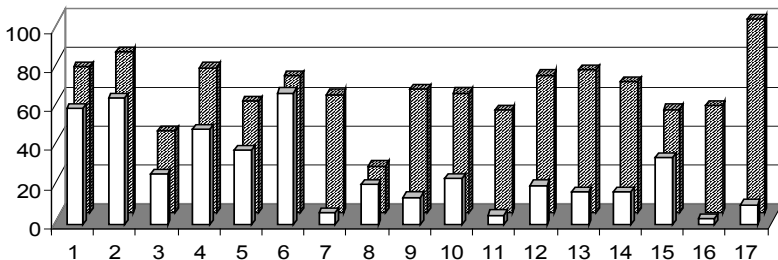


Рис. 1. Доля полнозернистых \square и потенциально полнозернистых ▨ семян пихты сибирской в различных ценопопуляциях (1-17), %.

Цитологический контроль показал, что на 12-14 сутки культивирования у экспланта происходили вытягивание и асинхронное деление клеток. Каллусная масса, полученная из сегментов проростков пихты сибирской, была очень рыхлой и представляла собой суспензию из отдельных клеточных скоплений. Морфогенный каллус включал клетки разных типов: 1- изодиаметрические, $60,0 \pm 3,5$ мкм в диаметре, 2- прозенхимные овальные или сильно вытянутые, длиной до $106,0 \pm 5,8$ мкм (рис. 2). Полученные структуры имеют сходство с зародышеподобными структурами (эмбриоидами). Каллусы пролиферировали в течение 6-12 месяцев без потери пролиферационной активности. Однако при пересадке на среду с АБК, созревания соматических зародышей не происходило, каллус некротизировался. Эксперименты по культивированию эмбриогенных каллусов пихты сибирской продолжаются.

Эксперименты по оптимизации состава среды для индукции соматического эмбриогенеза пихты сибирской показали, что наиболее значимыми факторами для индукции каллусогенеза являются стадия развития и состав среды. Оптимальной стадией развития зиготического зародыша для формирования каллусной массы оказался семядольный зародыш, достигающий $\frac{2}{3}$ и более длины зародышевого канала. Установлено, что среда $\frac{1}{2}$ MS с добавлением 6 БАП и 2,4Д, оптимальная на начальных этапах формирования каллуса пихты, не пригодна для ее дальнейшего культивирования - при длительном культивировании на этой среде каллусы отмирают. Лимитирующим индукцию каллусогенеза фактором является также присутствие кинетина. Соматический эмбриогенез – многоступенчатый процесс, включающий индукцию и пролиферацию эмбриогенного каллуса, созревание и прорастание соматических зародышей, формирование растений – регене-

рантов [10]. В наших экспериментах успешно проходили индукция и пролиферация эмбрионного каллуса. Эксперименты по подбору и оптимизации питательных сред для получения растений-регенерантов пихты сибирской продолжаются.

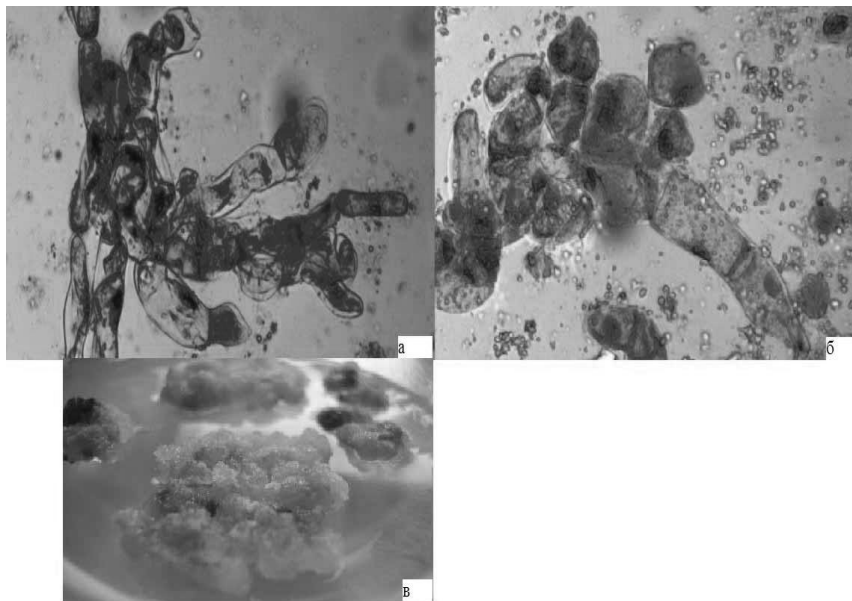


Рис. 2. Морфогенные каллусы на стадии инициации, полученные из сегментов проростков пихты сибирской: а,б – формирование эмбриональных глобул; в- морфогенный каллус

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 11-04-00281.

Литература

1. *Бажина Е.В.* Половая репродукция пихты сибирской в нарушенных лесных экосистемах озера Байкал. - Автореф. дис... канд. биол. наук.– Красноярск, 1997. - 24с.
2. *Бажина Е.В.* Генетические особенности популяций пихты сибирской с разной семенной продуктивностью. Фактори експериментальної еволюції організмів: зб.наук.пр. - Т.8. - 2010. – С. 89-93.
3. *Левина Р.Е.* Репродуктивная биология семенных растений. Обзор проблемы. - М., 1981. – 96 с.
4. *Воронин В.И.* Действие серосодержащих эмиссий на пихту сибирскую в Южном Прибайкалье: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 03.00.16. Красноярск. - 1989. - 19 с.

5. Алексеев В.А. Астапенко В.В., Басова Ю.Г., Бондарев А.И., Лузанов В.Г., Отнюкова Т.Н., Яновский В.М. Состояние пихтовых лесов Кузнецкого Алатау// Лесное хозяйство. - № 4. - 1999. - С. 51-53.

6. *Tissue culture research at the CFS: its history, current status and potential benefits:* http://publications.gc.ca/collections/collection_2011/rncan-nrcan/Fo114-11-2011-eng.pdf

7. Klimaszewska K., Cyr D.R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development// *Dendrobiology*. 2002. - V. 48. - P. 31–39.

8. Щербакова М.А. Определение качества семян хвойных пород рентгенографическим методом. – Красноярск, 1965. – 35 с.

9. Malabadi R. B., Van Staden J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // *Tree Physiology*. - 2005. - V. 25. - P. 11–16.

10. Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P. et al. Developmental pathways of somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* - 2002. - V. 69. - P. 233–249.

Резюме

Проведен анализ репродуктивного потенциала 17 ценопопуляций пихты сибирской. Представлены результаты экспериментов по микроклональному размножению данного вида.

Проведено аналіз репродуктивного потенціалу 17 ценопопуляцій *Abies sibirica* Ledeb. Наведени результати мікроклонального розмноження у культурі *in vitro*.

The analysis of *Abies sibirica* Ledeb. macrostrobiles seed productivity in 17 local population have been carried out. The first results of *in vitro* cultivation were presented.

БЕЛОКУРОВА В.Б., КИЩЕНКО Е.М.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 03680, Киев, ул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: lera@icbge.org.ua

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ТРАНСГЕННЫХ КОРНЕЙ *ACHILLEA LINGULATA* WALDST. & KIT

Род тысячелистник, *Achillea* L. (Compositae) включает, по разным оценкам от 115 до 140 видов, растущих в Европе, Азии, Северной Африке и натурализованных в других частях мира. С давних времен эти растения широко используются в медицине, а разнообразие их лекарственных свойств связывают с существованием различных хемотипов [1-4]. Их фармакологическое действие обусловлено, прежде всего, флавоноидами, кумаринами, сесквитерпеновыми лактонами, лигнанами, стеролами [1, 2, 5-7]. Показаны антимикробная и антиоксидантная активности экстрактов [8, 9]. Ряд публикаций посвящён изучению химического состава и фармакологических свойств *Achillea lingulata* [5, 8, 10 - 14]. В частности, сообщается об антимикробной [8] и антигрибковой активностях [14] экстрактов. Помимо надземных частей растений, материалом для таких исследований являются также их корни [5, 15,16].

A.lingulata - редкий вид флоры Украины, занесённый в Красную книгу [17], поэтому получение растительной биомассы для исследований не-

посредственно из природных популяций невозможно. Дополнительные возможности сохранения и изучения эндемичных и редких растений предоставляют методы биотехнологии, такие как выращивание в коллекциях *in vitro* и использование методов генетической трансформации. Так, перспективным источником ценных вторичных метаболитов из растений различных таксономических групп являются культуры трансформированных корней (*hairy roots*). Трансгенные корни генетически стабильны, имеют изменённый фенотип, их можно масштабно культивировать. Как правило, уровень синтеза химических соединений в них стабилен и не уступает интактным растениям. Показано также, что культуры трансформированных корней способны продуцировать рекомбинантные белки [18, 19]. Особое значение подобные исследования имеют в тех случаях, когда источником биологически активных соединений являются охраняемые и/или эндемичные виды растений.

Материалы и методы

Растительный материал. Растения *Achillea lingulata* были получены из семян, переданных из университета Лейпцига (Германия) в банк семян представителей мировой флоры ИКБГИ. Растения поддерживают на безгормональной среде Мурасиге-Скуга (MS) [20] в условиях 16-часового фотопериода при регулярных субкультивированиях каждые 2 месяца.

Штаммы агробактерий. В работе использовали два агропиновых штамма *Agrobacterium rhizogenes* - штамм А4 из коллекции ИКБГИ и штамм 1601, любезно предоставленный к.б.н. И.Н.Кузовкиной, Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН. Генетическая трансформация и получение культур трансгенных корней. Экспланты листьев асептических растений нарезали на сегменты длиной около 1 см и прекультивировали на среде для каллусообразования в условиях 16-часового фотопериода в течение суток. Суспензию *A.rhizogenes* наращивали в жидкой среде LB на шейкере в течение ночи и разбавляли жидкой MS в соотношении 1:1. Фрагменты листьев помещали в бактериальную суспензию на 15 минут, промокали стерильной фильтровальной бумагой и переносили на агаризованную безгормональную среду MS. Кокультивацию проводили в течение суток в термостате при 26°C. Затем экспланты отмывали в жидкой среде MS, переносили на агаризованную MS с 600 мг/л цефотаксима (Cf) для элиминации агробактерий и культивировали в стандартных условиях культуральной комнаты при 24°C до появления центров корнеобразования при регулярных (раз в две недели) пересадках на свежую среду с постепенным уменьшением концентрации Cf. Молекулярно-биологический анализ. Анализировали суммарную растительную ДНК, экстрагированную ЦТАБ-методом [21]. Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали после гель-электрофореза в Tris-ацетатном буфере путём сравнения интенсивности поглощения ультрафиолетового света с маркерной ДНК известной концентрации. Электрофорез нативной ДНК проводили в 0,8% агарозном

геле. Как позитивный контроль для реакции амплификации использовали плазмидную ДНК векторов или суммарную ДНК агробактерий. Полимерно-цепную реакцию (ПЦР) проводили согласно рекомендациям [22] в термоциклере Mastercycler® personal (Eppendorf). Реакционная смесь содержала 100 нг суммарной растительной ДНК, солевой буфер (10 мМ Tris-HCl, pH 9,0, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,01% Тритон X-100), по 200 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов, по 0,2 мкМ каждого из праймеров и 1 единицу Taq-полимеразы. Общий объём смеси составлял 20 мкл. Реакцию амплификации ДНК проводили с использованием пары праймеров, специфичных к гену *rolB*: 5'ATGGATCCCAAATGTGCTATTCCTTCCACGA3' и 5'TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTT ACTGCAGC3' (продукт амплификации 780 п.н.). Использовали следующую программу: денатурация 94°C/3 мин; 34 цикла (денатурация 94°C/30 с, отжиг 65°C/30 с, синтез 72°C/45 с); заключительный синтез 72°C/3 мин. Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле в трис-ацетатной буферной системе.

Результаты и обсуждение

Важность работы по созданию культуры *in vitro* *Achillea lingulata* обусловлена природоохранным статусом этого вида, его ограниченным ареалом и медленными темпами возобновления растений в естественных популяциях. Учитывая растущий интерес к использованию представителей рода *Achillea* как потенциального источника ценных метаболитов в биотехнологических исследованиях, целью работы был подбор оптимальных условий генетической трансформации и получения культуры трансгенных корней для изучения параметров роста и анализа на биологическую активность.

Как известно, эффективность работы по генетической трансформации зависит от ряда факторов: подбора оптимального типа эксплантов, штамма агробактерий и режимов кокультивации. Трансформацию фрагментов листьев *A. lingulata* проводили с использованием модифицированного метода листовых дисков, как описано выше. Формирование корней начиналось в течение 2-3 недель после кокультивации. В контроле, при культивировании фрагментов листьев на безгормональной среде без кокультивации, корни не формировались. Использование ацетосирингона (100 мкМ) в составе среды для кокультивации не влияло на эффективность трансформации; более значительная разница отмечена для разных штаммов агробактерий. После кокультивации с агробактериями штамма А4 на каждом экспланте формировалось от 1 до 3 центров корнеобразования (Рис 1). Менее активным в наших опытах был штамм 1601. Вместе с тем в ряде публикаций отмечено его успешное использование в работе с другими видами растений и эффективность, превышающая таковую штамма А4.

Корни переносили по одному в чашки Петри с безгормональной агаризованной средой MS и выращивали в стандартных условиях как отдельные клоны. Кроме того, проводили выращивание в жидких средах на шейкере

для оценки темпов роста по сравнению с культурой изолированных корней *A. lingulata* на безгормональных средах и средах с ауксинами. В течение первых двух месяцев культивирования прирост биомассы трансгенных корней в 57,3 раз превысил этот показатель для изолированных корней на безгормональной среде и в 9,8 раз – на среде с ауксинами.

С помощью ПЦР был проведен молекулярно-биологический анализ ряда клонов индуцированных корней на наличие гена *rolB* (Рис. 1). Все проанализированные клоны показали позитивный результат, что подтверждает их трансгенную природу.

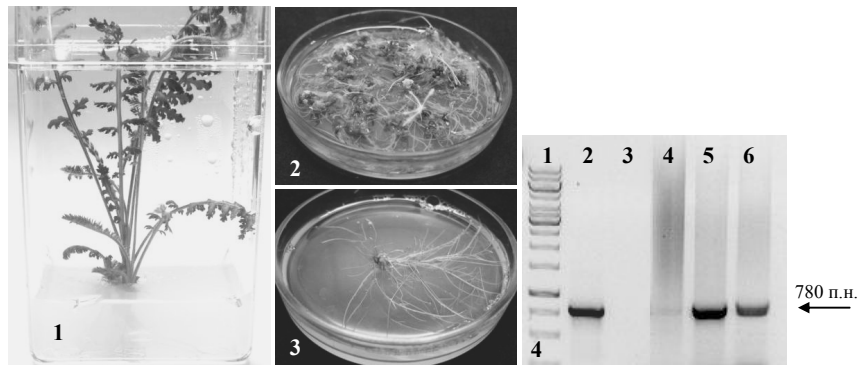


Рис. 1. Получение культур трансформированных корней *Achillea lingulata*: 1 – исходное растение в асептической культуре; 2 – формирование центров корнеобразования после кокультивации с агробактерией; 3 – трансгенные корни на агаризованной среде, 4 – электрофореграмма результатов ПЦР с использованием праймеров к гену *rolB*: 1 – ДНК маркер, O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder («Fermentas»), 2 – позитивный контроль, суммарная ДНК агробактерии штамм А4, 3 – негативный контроль, без ДНК-матрицы, 4 – ДНК исходного нетрансформированного растения, 5, 6 – ДНК линий трансгенных корней

Несмотря на то, что согласно данным литературы культуры трансгенных корней уже индуцированы для представителей более чем 100 родов из разных семейств, публикация [16] остаётся едва ли не единственной, относящейся к растениям рода *Achillea*. В этой работе выявлены также качественные и количественные различия в составе эфирных масел интактных и трансгенных корней, а также между разными клонами трансгенных корней. В нашей работе впервые индуцированы культуры трансгенных корней охраняемого вида *Achillea lingulata*.

Выводы

Показана высокая эффективность использования штамма А4 *Agrobacterium rhizogenes* для индукции культур трансгенных корней *Achillea lingulata*.

Работа выполнялась в рамках проекта по поддержанию объекта национального научного достояния Украины «Коллекция зародышевой плазмы растений флоры Украины и мировой флоры» и проекта «Создание культур изолированных и трансгенных корней *in vitro* и анализ их биологической активности» целевой комплексной программы НАН Украины “Фундаментальные основы молекулярных и клеточных биотехнологий”.

Литература

1. *Nemeth E., Bernath J.* Biological Activities of Yarrow Species (*Achillea* spp.). // *Current Pharmaceutical Design.* – 2008. – vol. 14, № 29. – p. 3151-3167.
2. *Shafaghat A.* Composition and antibacterial activity of the volatile oils from different parts of *Achillea tenuifolia* Lam. from Iran. // *Journal of Medicinal Plants.* – 2009. – vol. 8, № 31. – p. 93-98.
3. *Azizi M., Chizzola R., Ghani A., Oroojalian C.* Composition at different development stages of the essential oil of four *Achillea* species grown in Iran. // *Natural Product Communications.* – 2010. - vol. 5, № 2. – p. 283 – 290.
4. *Saediņa S., Gohari AR., Mokhber-Dezfuli N, Kiuchi F.* A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. // *DARU (Journal of Pharmaceutical Sciences).* – 2011. - vol. 19, № 3. - 173-186.
5. *Trifunovic S., Vajs V., Tesevic V., Djokovic D., Miloslavljjevic S.* Lignans from the plant species *Achillea linguata*. // *J.Serb.Chem.Soc.* 2003. - vol. 68, № 4–5, p. 277–280.
6. *Kovacevic N.N., Ristic M. S., Tasic S.R., Menkovic N.R. , Grubisic D.V.* Comparative Study of Essential Oil of Three *Achillea* Species from Serbia. // *The Journal of essential oil research.* – 2005. - vol. 17, № 1. – p. 57-60.
7. *Toncer O., Basbag S., Karaman S., Diraz E., Basbag M.* Chemical composition of the essential oils of some *Achillea* species growing wild in Turkey. // *Int. J. Agric. Biol.* – 2010. - vol. 12. – p. 527–530.
8. *Stojanovic G., Radulovic N., Hashimoto T., Palic R.* *In vitro* antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: the composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2005. – vol. 101. - 185–190.
9. *Bozin B., Mimica-Dukic N., Bogavac M., Suvajdzic L., Simin N., Samojlik I., Couladis M.* Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Achillea collina* Becker ex Heimerl s.l. and *A. pannonica* Scheele essential oils. // *Molecules.* – 2008. - vol. 13. – p. 2058-2068.
10. *Palić R., Stojanović G., Randelović N., Randelović V., Veličković J.* The fatty acids from plants of the genus *Achillea*. // *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology.* – 2000. - vol. 2, № 2. – p. 101 – 104.
11. *Ivancheva S., Tomas-Barberan F., Tsvetkova R.* Comparative analysis of flavonoids in *Achillea* sp. sect. *Millefolium* and sect. *Ptarmica*. // *Докл. Болг. АН.* – 2002. - vol. 55, № 5. – p. 43-46.
12. *Kovacevic N.N., Ristic M. S., Tasic S.R., Menkovic N.R., Grubisic D.V.* Comparative study of essential oil of three *Achillea* species from Serbia. // *The Journal of essential oil research.* – 2005. - vol. 17, № 1. - p. 57-60.
13. *Kundakovic T., Fokialakis N., Kovacevic N., Chinou I.* Essential oil composition of *Achillea linguata* and *A. umbellata*. // *Flavour and Fragrance Journal.* – 2007. – vol. 22, № 3. – p. 184–187.

14. Kundaković, T., Soković, M., Kovačević, N. Antifungal activity of two *Achillea* species. - 3rd Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries. - Nitra, Slovak Republic, Sept. 5 – 8, 2004. - p. 110.

15. Jovanovic O., Radulovic N., Palic R., Zlatkovic B. Root essential oil of *Achillea lingulata* Waldst. & Kit. (Asteraceae). - Journal of Essential Oil Research. – 2010. – Vol. 22, №. 4. - p. 336-339.

16. Lourenço P.M.L., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Oliveira M.M., Deans S.G., Scheffer J.J.C. Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium*. – Phytochemistry – 1999. - vol. 51, №. 5. – p. 637-642.

17. «Червона книга України. Рослинний світ» (під ред. Я.П.Дідуха) // К.: Глобалконсалтинг. – 2009. – с. 388.

18. Hu Z.-B., Du M. Hairy root and its application in plant genetic engineering. // J. of Integrative Plant Biology. – 2006. - vol. 48, № 2. – p. 121-127.

19. Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. // Current Opinion in Plant Biology. – 2006. - vol. 9. – p. 341–346.

20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - Physiol. Plant. – 1962. - vol. 15. - p. 473-497.

21. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – vol. 12. – p. 13–15.

22. Маниатис Т., Фроч Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. – М. Мир, 1984. – 545 с.

Резюме

Індуцированы культури трансгенних кореней охораняемого вида *Achillea lingulata*. Показана зависимость эффективности генетической трансформации от штамма агробактерий и способность корневых культур к интенсивному росту на агаризованных и жидких безгормональных средах.

Індуковано культури трансгенних коренів *Achillea lingulata*. Показано залежність ефективності генетичної трансформації від штаму агробактерій та здатність корневих культур до інтенсивного росту на агаризованих та рідких безгормональних середовищах.

Achillea lingulata hairy root cultures were induced. Efficiency of genetic transformation differed depending on *A.rhizogenes* strain. Hairy root clones were rapidly growing both on agar-solidified and liquid hormone-free culture media.

БІЛИНЬСЬКА О. В., ТИМЧУК С. М., ДЕРЕБІЗОВА О. Ю.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України, 61128, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ *IN VITRO* ПРИ ВИКОРИСТАННІ ЯК ГЕЛЕУТВОРЮВАЧІВ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ЗЕРНОВИХ КРОХМАЛІВ ГОРОХУ З РІЗНИМ ВМІСТОМ АМІЛОЗИ

Як відомо, доцільність застосування культури пиляків *in vitro* для отримання гомозиготних ліній подвоєних гаплоїдів в селекції визначаєть-

ся можливістю забезпечити масовий характер регенерації рослин у якомога більшій кількості генотипів. З огляду на це важливим завданням при розробці технологій, що ґрунтуються на культивуванні пиляків, є не лише ініціація аномального спорофітного розвитку мікроспор, а головним чином його спрямування у бік формування структур з високим регенераційним потенціалом і пошук шляхів ефективного завершення морфогенетичних програм з утворенням повноцінних рослин-регенерантів, здатних дати наслідне потомство.

Найбільша регенераційна здатність притаманна ембріодам – біполярним структурам із спряженим розвитком стеблового і кореневого апексів [1], тому стимулювання прямого ембріодогенезу або розвитку ембріодів з ембріогенного калусу дозволяє значно підвищити результативність гаплопродукційного процесу.

Нами вперше встановлено позитивний вплив на ембріодогенез у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю заміни агар-агару на хімічно модифіковані крохмалі [2] та природні кукурудзяні крохмалі з підвищеним вмістом амілози, отримані з зерна ліній-носіїв рецесивних мутацій *ae* і *su*₂ [3, 4]. Однак при застосуванні кукурудзи як джерела крохмалів слід враховувати технічні проблеми, пов'язані із складністю відокремлення крохмалю від білка, представленого в основному спирторозчинною фракцією [5]. Натомість за значно простішою процедурою можуть бути отримані крохмалі гороху, зернові білки якого складаються з соле- і водорозчинних фракцій [6].

Серед форм гороху, які можуть розглядатися як джерела високоамілозних крохмалів, на найбільшу увагу заслуговують носії мутації *r* (*rugosus*), яка блокує активність крохмаль-розгалужуючого ферменту [8] і підвищує вміст амілози у крохмалі з 30 до 75 % [8].

Оскільки можливість використання крохмалів гороху у складі живильних середовищ для культивування рослинних клітин, тканин та органів раніше не досліджувалася, це стало підставою для проведення оцінки гелеутворюючих властивостей і морфогенетичного ефекту згаданих природних полімерів у культурі *in vitro* пиляків ярого ячменю.

Матеріали та методи

Як матеріал у дослідженнях було використано лінію ярого ячменю (*Hordeum vulgare* L.) ДГ00-126, отриману нами методом культури пиляків *in vitro* на основі гібридної комбінації Екзотик×Харківський 74. Рослинодонори пиляків вирощували у польових умовах. Добір колосся, попередню обробку та отримання асептичної культури пиляків проводили за методиками, опис яких наведено у роботах, опублікованих раніше [9, 10].

За базове для культивування пиляків *in vitro* було обрано середовище NMSмод.2 [2], яке у контролі містило 0,8 % агар-агару “Difco” (США). До складу трьох інших середовищ замість агар-агару було введено у концентрації 6,5 % одержані власноруч за стандартними методиками [5] препара-

ти зернових крохмалів гороху (*Pisum sativum* L.) і кукурудзи (*Zea mays* L.) з різним співвідношенням амілози і амілопектину.

Крохмаль нормального типу (вміст амілози 30 %) отримували з зерна сорту гороху Банан (Україна) – носія домінантного алелю R. Високоамілозний крохмаль (вміст амілози 70 %) отримували з зерна сорту гороху Альфа (Росія) – рецесивної гомозиготи rr (мутація *rugosus*). Джерелом високоамілозного кукурудзяного крохмалю (вміст амілози 40 %) слугувала лінія з робочої колекції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва AC-11su₂ – носій рецесивної мутації su₂.

Калюси та ембріюїди для отримання рослин-регенерантів пересаджували на модифіковане середовище MS [11], яке містило 0,8 % агар-агару (“Difco”, США). Ефективність андрогенезу *in vitro* визначали за кількістю морфогенних пиляків, тобто пиляків, на поверхні яких утворилися калюси чи ембріюїди, і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загальної кількості культивованих пиляків. Для статистичної обробки результатів досліджень застосовано загальноприйняті методи варіаційної статистики.

Результати і обговорення

Дослідження гелеутворюючих властивостей показали, що гороховий крохмаль нормального типу у концентрації 6,5 % при нагріванні утворив густий клейстер, а через 12 годин – непрозорий гель білого кольору, придатної для культивування пиляків щільності, який зберігав притаманну йому структуру впродовж 30 і більше діб на відміну від деформованого шпаринами кукурудзяного крохмалю нормального типу [3].

Недоліком горохового крохмалю нормального типу були значні його втрати при перенесенні з посуду, в якому заварювали клейстер, у культуральні посудини, а в разі використання в якості останніх пробірок – залишки клейстеру (після застигання – гелю) на стінках, що ускладнювало інокуляцію пиляків і подальші спостереження за ростом і розвитком культури.

Цієї вади був позбавлений препарат горохового крохмалю амілозного типу, який у концентрації 6,5 % утворював значно більш рідкий клейстер, ніж крохмаль аналогічного типу з кукурудзи su₂. Клейстер з високоамілозного крохмалю гороху практично без залишків на стінках хімічного посуду переносився у пробірки і чашки Петрі та застигав у вигляді гелю, який був придатним для підтримання культури *in vitro*. Цей гель, як і гель з su₂-крохмалю кукурудзи, зберігав свої структурно-механічні властивості впродовж 35–40 діб.

Аналізуючи показники гаплопродукції, отримані у ході експерименту (рис. 1), слід зазначити, що вміст амілози у препаратах горохового крохмалю мав істотний вплив на формування андрогенних структур і регенерацію рослин у культурі пиляків ярого ячменю. Зокрема, на середовищі NMSrr, яке містило високоамілозний крохмаль, кількість морфогенних пиляків і частота регенерації зелених рослин були істотно вищими, ніж на середовищі NMSRR з крохмалем нормального типу. На останньому середовищі

утворилося істотно менше андрогенних структур і рослин-регенерантів, ніж у контролі, тобто на середовищі з агар-агаром. Високоамілозні крохмалі незалежно від джерела одержання, не поступалися за морфогенетичним ефектом високоартісному агар-агару «Difco» (контроль), а на середовищі NMSrr було отримано істотно вищу кількість морфогенних пиляків, ніж на середовищі NMSsu₂, яке містило високоамілозний крохмаль кукурудзи.

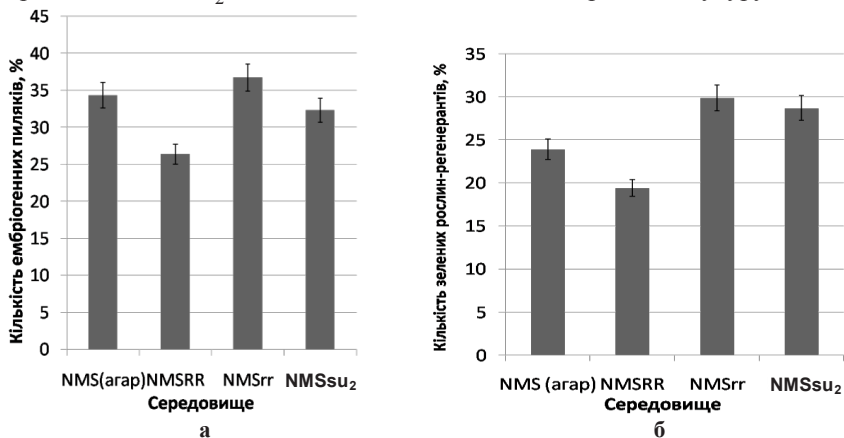


Рис. 1. Утворення морфогенних структур (а) і регенерація рослин (б) у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю (лінія ДГ00-126) на живильних середовищах, які містили в якості гелеутворювача: NMS(агар) – агар-агар (0,8 %, «Difco», США); NMSRR – крохмаль нормального типу з зерна гороху (6,5 %); NMSrr – крохмаль амілозного типу з зерна гороху (6,5 %, мутація *rugosus*); NMSsu₂ – кукурудзяний крохмаль амілозного типу (6,5 %, мутація su₂).

Звертає на себе увагу той факт, що за частотою регенерації зелених рослин високоамілозний крохмаль гороху (середовище NMSrr) не мав істотних переваг над крохмалем аналогічного типу, отриманим з зерна кукурудзи (середовище NMSsu₂), але обидва крохмалі були кращими гелеутворювачами, ніж агар-агар щодо впливу на цей показник ефективності пилякової культури.

Спостереження показали, що формування калусу та ембріодів відбувалося одночасно на усіх середовищах. Незалежно від природи гелеутворювача мало місце проростання ембріодів на індукційному середовищі (рис. 2).

На середовищі з крохмалем нормального типу калус був більш структурованим і характеризувався менш активним ростом, а листки рослин-регенерантів були яскраво забарвлені за повної відсутності ознак вітрифікації, що сприяло підвищенню їхньої життєздатності.

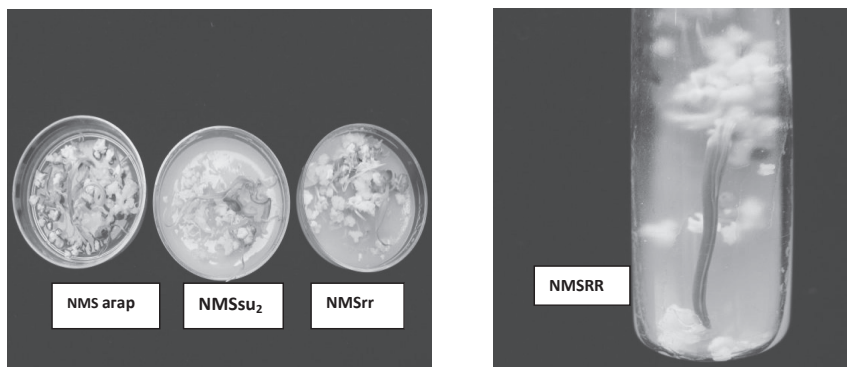


Рис. 2. Утворення морфогенних структур та регенерація рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю (лінія ДГ00-126) на живильних середовищах, які різнилися за гелеутворюючим компонентом (позначення ті ж, що на рис. 1)

Висновки

Вперше проведена оцінка гелеутворюючих властивостей і морфогенного ефекту у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю крохмалів гороху, отриманих із зерна сортів-носіїв домінантного і рецесивних алелів генів структури ендосперму, які визначають співвідношення у крохмалі його сополімерів амілози та амілопектину. Незважаючи на те, що гороховий високоамілозний крохмаль не мав істотних переваг порівняно з кукурудзяним крохмалем аналогічного типу за частотою регенерації рослин, підставою вважати цей препарат перспективним для використання у біотехнології рослин є набагато простіша процедура його отримання, пов'язана з переважанням серед запасних білків соле- і водорозчинної фракції, і поліпшені технологічні характеристики.

Література

1. Батицина Т. Б. Хлебное зерно / Отв. ред. М. С. Яковлев. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
2. Белинская Е. В., Дульнев П. Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – т. 39, № 2. – С. 136–143.
3. Белинская Е. В., Тымчук С. М., Дульнев П. Г., Дербизова О. Ю. Использование высокоамилозного крахмала в питательной среде для культивирования пыльников ячменя // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – т. 41, № 6. – С. 539 – 546.
4. Білінська О. В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae* і *su*₂) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2010. – Вип. 11 (№ 905). – С. 60 – 65.

5. *Puxter M., Аугустат З., Шурбаум К.* Избранные методы исследования крахмала. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 183 с.

6. *Casey R., Domoney C., Smith A.M.* Biochemistry and Molecular Biology of Seed Products // Peas: genetics, molecular biology and biotechnology / R. Casey, D. R. Davies Eds. – Wallingford, UK: CAB Int., 1993. – P.121-164.

7. *Martin C., Smith F. M.* Starch biosynthesis // *The Plant Cell.* – 1995. – V.7. – P. 971–985.

8. *Hedley C. L., Bogracheva T. Ya., Lloyd J. R., Wang T. L.* Manipulation of starch composition and quality in pea seeds // *Agri-Food Quality. An Interdisciplinary Approach* / G. R. Fenwick, C. Hedley, R. L. Richards, S. Khokhar Eds. – Cambridge: The Royal Soc. Chem., 1996. – P. 138–148.

9. *Білинська О. В.* Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореф. дис. канд. біол. наук. – Харків, 1997. – 19 с.

10. *Белинская Е. В.* Влияние предобработки колосьев на эффективность индукции гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // *Физиология и биохимия культурных растений.* – 2005. – т. 37, № 5. – С. 436 – 442.

11. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – v. 15. – P. 473 – 497.

Резюме

Досліджено гелеутворюючу здатність і вплив на частоту індукції морфогенних структур і регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю крохмалів, отриманих із зерна сортів гороху – носіїв домінантного (*R*) і рецесивного (*r*) алелів гена, який контролює вміст амілози. Встановлено, що за морфогенетичним ефектом високоамілозний гороховий крохмаль не поступався кукурудзяному крохмалю того ж типу (мутація *su₂*), але мав поліпшені технологічні властивості.

Исследованы гелеобразующая способность и влияние на частоту индукции морфогенных структур и регенерации растений в культуре пыльников *in vitro* ярого ячменя крахмалов, полученных из зерна сортов гороха – носителей доминантного (*R*) и рецессивного (*r*) аллелей гена, контролирующего содержание амилозы. Установлено, что по морфогенетическому эффекту высокоамилозный крахмал гороха не уступал кукурузному крахмалу того же типа (мутация *su₂*), но имел улучшенные технологические свойства.

Gelatinized properties and influence on the rate of morphogenic structure induction and plant regeneration in spring barley anther culture *in vitro* of starches obtained from seeds of pea cultivars which were the carriers of dominant (*R*) and recessive (*r*) alleles of gene controlling an amylose content have been studied. There has been revealed that a pea starch with a high amylose content had the same morphogenetic effect as a corn starch of the same type (mutation *su₂*), but it possessed an improved technological capacities.

БІЛИНЬСЬКА О. В., СОКОЛЬНИКОВА Я. М.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України, 61128, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

ГЕНОТИПНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ РІПАКУ (*BRASSICA NAPUS* L.)

Клональне мікророзмноження як особливий спосіб вегетативно-го розмноження *in vitro* є основою найбільш поширених біотехнологій отримання садивного матеріалу багатьох видів декоративних, лікарських, плодово-ягідних, овочевих та інших культур [1, 2]. Цей методичний підхід застосовується у експериментах з віддаленої гібридизації, часто разом з ембріокультурою, для одержання унікальних генотипів в разі низького виходу гібридного насіння і його низької схожості [3]. Від наявності надійних і легко відтворюваних методик масової регенерації з різних експлантатів значною мірою залежать ефективність генетичної трансформації [4].

У гаплоїдній селекції за допомогою клонального мікророзмноження може бути вирішена важлива проблема збереженості і одержання насінневого потомства цінних рекомбінантів, загибель частини яких відбувається під дією токсичних диплоїдизуючих речовин, а також при перенесенні рослин з умов *in vitro* у *ex vitro* [5].

Оскільки у ріпаку рівень спонтанної диплоїдизації у культурі пиляків та ізольованих мікроспор *in vitro* рідко перевищує 20 % [6, 7], на відміну від ячменю, у якого цей показник може сягати 90 % [8], клональне мікророзмноження регенерантів ріпаку перед коліцинуванням має бути обов'язковим елементом технології створення ліній подвоєних гаплоїдів.

Встановлено, що збільшення кількості регенерантів ріпаку андрогенного походження досягається за рахунок індукування вторинного ебріодогенезу [9] або утворення множинних пагонів за втрати апікального домінування при проростанні ембріодів [6]. Окрім цього, очевидно, що усі прийоми клонального мікророзмноження, які були успішно застосовані на диплоїдних рослинах ріпаку [10, 11, 12, 13], можуть бути поширені на гаплоїдні регенеранти, отримані у культурі пиляків *in vitro*.

Зважаючи на те, що у ріпаку проростання котиледольних ембріодів андрогенного походження відбувається майже так, як формування проростків з насіння, метою досліджень була оцінка ефективності клонального мікророзмноження у культурі сім'дольних експлантатів диплоїдних рослин ріпаку озимого та ярого в залежності від генотипу, а також удосконалення методики живцювання *in vitro*.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал для досліджень було представлено сортами озимого ріпаку (*Brassica napus* L.) української селекції Сенатор Люкс, Света, Атлант, Чорний велетень, Дангал, Тисменецький та сортами ярого ріпаку Лужок, Оріон, Марія, Маріне, Микитинецький.

За експлантат використано сім'ядолі 3–6-денних проростків, отриманих в умовах *in vitro* з насіння, яке стерилізували впродовж 1 хв 70° етиловим спиртом, 15–20 хв препаратом “Domestos” (концентрація 30 %), після чого тричі відмивали стерильною дистильованою водою. Насіння пророщували на мінімальному середовищі МС [14], яке містило 10 г/л сахарози, при температурі 25 °С і 16-годинному фотоперіоді.

Експлантати готували до інокуляції як описано у роботі Івашути і Мазіна [12] і культивували на середовищі МС, яке містило 3 мг/л БАП і 0,5 мг/л НУК. Морфогенетичну реакцію експлантатів визначали через 7; 14; 21 і 30 діб після початку експерименту. Живцювання *in vitro* проводили, керуючись рекомендаціями І. Д. Ситника [13]. Препарат хімічно модифікованого крохмалю ДККмод було надано П. Г. Дульневим (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ).

Ефективність клонального мікророзмноження визначали за кількістю експлантатів з морфогенетичною реакцією (пагоноутворення, ризогенез, калюсогенез) та кількістю пагонів у відсотках від загальної кількості експлантатів.

У досліді з мікроживцювання підраховували кількість живців та утворених пагонів і обчислювали коефіцієнт розмноження як відношення кількості рослин, отриманих з пагонів, до числа рослин, використаних для живцювання. Експериментальні дані оброблено з використанням загальновідомих методів варіаційної статистики [15].

Результати і обговорення

Спостереження показали, що у культурі сім'ядольних експлантатів ріпаку вже через 3–5 діб після інокуляції відбувалося подовження черешків і збільшення розмірів сім'ядолей. Через 15–20 діб на зрізі черешків мали місце три типи реакції: прямий пагоновий органогенез, ризогенез та калюсогенез, кількісна характеристика яких наведена у таблиці 1.

Як видно з цієї таблиці, за здатністю до пагоноутворення виділилися сорти Оріон та Марія – біля 80 % експлантатів з пагоноутворенням і відповідно 130 і 150 % пагонів від загальної кількості експлантатів. Цікаво, що сорту Оріон, як свідчать результати наших досліджень, була притаманна висока здатність до прямого ембріодогенезу у культурі пиляків *in vitro* (близько 60 ембріодів на 100 культивованих пиляків). Високою частотою утворення мікропагонів характеризувалися також сорти Дангал, Тисменецький, Света, Чорний велетень, Маріне, Микитинецький. Найнижчу здатність до пагонового морфогенезу мав сорт Лужок, у якого відмічено переважання ризогенезу.

Таблиця 1

Здатність до калюсогенезу і регенерації у культурі *in vitro* сім'ядольних експлантатів озимого та ярого ріпаку

Генотип	Висаджено експлантатів, шт.	Утворили пагони		Утворили коріння,%	Утворили калюс,%
		% ¹⁾	% ²⁾		
Сенатор Люкс	51	21,56±5,76	49,02±7,00	7,84±3,74	21,56±5,78
Света	51	47,06±6,99	156,86	39,22±6,84	13,72±4,82
Атлант	55	36,36±6,49	89,09±4,20	27,27±6,00	10,91±4,20
Чорний велетень	52	48,08±6,93	111,54	23,08±5,84	11,54±4,42
Дангал	40	67,50±7,41	185,0	15,00±5,65	5,0±3,45
Тисменецький	46	56,52±7,31	150,0	28,26±6,64	2,17±2,15
Лужок	40	2,50±2,50	2,50±2,50	42,50±7,81	20,0±12,65
Оріон	52	80,77±5,47	130,77	26,92±6,15	1,92±1,90
Микитинецький	38	47,36±8,09	89,47±4,98	39,47±7,93	0,0
Марія	40	80,00±6,32	150,0	37,5±7,65	0,0
Маріне	55	47,27±6,73	114,55	34,55±6,41	3,64±2,46

1) Кількість експлантатів з пагоноутворенням.
2) Кількість пагонів відносно загальної кількості експлантатів.

Порівнюючи отримані результати з наведеними у літературі [12], слід зазначити, що за частотою пагоноутворення сорти Света, Чорний велетень, Маріне та Микитинецький були на рівні сорту Промінь, у якого цей показник сягав 47,9 %. Сорти Марія і Оріон перевищили кращий за частотою пагоноутворення сорт Тисменецький (66,0 %), щодо якого в нашому експерименті одержано такі ж характеристики регенераційної здатності (56,52±7,31). Сорт Лужок мав частоту пагоноутворення на рівні сорту Тандем (3,7 %).

З метою відпрацювання альтернативних методичних підходів для розмноження андрогенних регенерантів, ефективних, але з меншою залежністю від генотипу, було проведено дослідження з мікроживцювання. Як показали експерименти, проведені на асептичних рослинах сорту озимого ріпаку Сенатор Люкс, за рекомендованої у літературі для стимулювання розвитку пазушних бруньок концентрації БАП від 2 мг/л до 3 мг/л [12] не вдалося ініціювати пагоноутворення у жодного живця. Натомість зниження концентрації цього цитокініну до 0,5 мг/л сприяло активному пагоноутворенню (таблиця 2) і дозволило отримати коефіцієнт розмноження від 1:4 у сорту Света до 1:10 у сорту Сенатор Люкс при середньому значенні 1:6.

Високі коефіцієнти розмноження незалежно від рівня плоідності було отримано у рослин сорту ярого ріпаку Лужок. При цьому встановлено, що причиною більш активного пагоноутворення у гаплоїдів було формування рослини з множинними пагонами при проростанні одного з ембріодів.

Ефективність живцювання *in vitro* рослин озимого і ярого ріпаку

Генотип	Кількість донорних рослин, шт.	Кількість живців, шт.	Кількість живців, які утворили пагони, шт.	Кількість пагонів, шт.	Коефіцієнт розмноження
Сенатор Люкс	26	82	82	272	1:10
Света	26	49	45	106	1:4
Света ^[1]	12	20	20	38	1:3
Лужок (n=19) ^[2]	2	3	3	17	1:8
Лужок (2n=38) ^[3]	2	4	4	10	1:5

Примітки: ^[1] Живці культивували на середовищі, яке містило як гелеутворювач хімічно модифікований крохмаль ДККмод (120 г/л). ^[2] Гаплоїдні рослини, отримані методом культури пиляків *in vitro*. ^[3] Диплоїдні рослини, вирощені з насіння.

Враховуючи позитивний досвід клонального мікророзмноження ряду овочевих культур на середовищах, які містили замість агар-агару хімічно модифікований крохмаль ДККмод [17], нами започатковано дослідження з вивчення можливості використання цього препарату для мікроживцювання ріпаку.

Результати, наведені у таблиці 2, вказують на те, що у сорту озимого ріпаку Света на середовищі з ДККмод було отримано дещо менший, ніж на середовищі з агар-агаром, коефіцієнт розмноження (1:3 проти 1:4). Але живці, які культивувалися на крохмалевмісному середовищі, і отримані з них пагони мали більш яскраве забарвлення і укорінювалися на безгормональному середовищі з частотою 100 %. Рослини, одержані з таких пагонів, також мали більш яскраве забарвлення і потовщене стебло за повної відсутності ознак вітрифікації. Слід зазначити, що на середовищі з хімічно модифікованим крохмалем ріст рослин ріпаку помітно уповільнювався, що є підставою для припущення про перспективність використання цього середовища для їх довготривалого зберігання в умовах безпересадної культури *in vitro*.

Висновки

Таким чином, підтверджено генотипну залежність морфогенезу у культурі *in vitro* сім'ядольних експлантів озимого та ярого ріпаку. Удосконалено методику мікроживцювання ріпаку, яка дозволяє впродовж двох місяців отримати рослинний матеріал з середнім коефіцієнтом розмноження 1:6. Вперше для мікроживцювання ріпаку застосовано середовище з хімічно модифікованим крохмалем ДККмод.

Література

1. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Стан і перспективи клонального мікророзмноження рослин в Україні // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – т. 1. – С. 484–500.
2. Митрофанова И. В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Тр. Никит. Бот. сада. – 1997. – т. 119. – С. 63–95.
3. Перишина Л. А., Шумный В. К. Проблемы использования методов *in vitro* при отдаленной гибридизации злаков // Биология культивируемых клеток и биотехнологии растений / Отв. ред. Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1991. – С. 102–114.
4. Сахно Л. А., Гочева Е. А., Комарницький І. К., Кучук Н. В. Стабільна експресія беспромоторного гена *bag* в трансформованих рослинах рапса // Цитологія і генетика. – 2008. – т. 42, № 1. – С. 21–28.
5. Котлярова Е. Б. Аспекти применения методов биотехнологии в селекции ярового рапса (*Brassica napus* L.): Автореф. дис. канд. биол. наук. – Рамонь, 2007. – 20 с.
6. Smýkalová I., Větrovcová M., Klíma M., Mářčácková I., Griba M. Efficiency of microspore culture for doubled haploid production in breeding project “Czech Winter Rape” // Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2006. – v. 42, N 2. – P. 58–71.
7. Абадовская Т.В. Особенности андрогенеза *in vitro* в процессе создания дигаметоидных линий рапса: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Минск, 1994. – 18 с.
8. Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B. Production of doubled haploids in frequencies sufficient for barley breeding programs // Plant Cell Rept. – 1989. – v. 8, N 2. – P. 110–118.
9. Thomas E., Wenzel G. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus* L. // Z. Pflanzenzuecht. – 1975. – v. 78. – P. 525–530.
10. Ралдугина Г. Н., Соболюкова Г. И. Факторы, влияющие на органогенез у семядольных эксплантов рапса // Физиология растений. – 1995. – т. 42, № 6. – С. 916–921.
11. Khan R. M., Rashid H., Quraishi A. High frequency shoot regeneration from hypocotyl of canola (*Brassica napus* L.) cv. Dunkled // Plant Tissue Culture. – 2002. – v. 12, N 2. – P. 131–138.
12. Иващута С. И., Мазин В. В. Регенерация озимого рапса *in vitro* для проведения генетической трансформации // Физиология растений. – 1994. – т. 41, № 3. – С. 440–442.
13. Ситник І. Д., Кляченко О. Л., Кокорін О. Г. Озимий та ярий ріпак / Ред. І. Д. Ситника. – К.: Знання України, 2005. – 84 с.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – v. 15. – P. 473–497.
15. Плохинский Н.А. Биометрия. – М.: Изд. Московского университета, 1964. – 367 с.
16. Деклараційний патент на винахід 52031 Україна, МПК 7, C08B31/02, A01N57/00, A01N59/00, A01C1/06. Спосіб отримання полімерних матеріалів / П. Г. Дульнев, С. І. Кондратенко, Т. В. Чернишенко, В. П. Мірошниченко, Т. В. Івченко, С. А. Гончарова. – u2002010237; заявл. 09.0.2002– Оpubл. 17.01.2005.12.02, Бюл. № 12.

Резюме

Досліджено вплив генотипу на ефективність пагонового і кореневого морфогенезу у культурі *in vitro* сім'ядольних експлантатів ріпаку озимого та ярого (*Brassica napus* L.). Серед сортів вітчизняної селекції виявлено генотипи з високою регенераційною здатністю. Доведено можливість використання як гелеутворювача середовища для мікророзмноження ріпаку хімічно модифікованого крохмалю ДККмод.

Исследовано влияние генотипа на эффективность стеблевого и корневого морфогенеза в культуре *in vitro* семядольных эксплантатов рапса озимого и ярого (*Brassica napus* L.). Среди сортов отечественной селекции выявлены гентипы с высокой регенерационной способностью. Доказана возможность использования в качестве гелеобразователя среды для микроочеренкования рапса химически модифицированного крахмала ДККмод.

Effect of genotype on shoot and root morphogenesis in culture *in vitro* of winter and spring oilseed rape (*Brassica napus* L.) cotyledonary explants has been investigated. Genotypes possessing a high regeneration capacity have been found among cultivars of Ukrainian breeding. It has been proved a possibility of use chemically modified starch DKK-mod as a gelling substance of medium for micropropagation of oilseed rape.

БІЛЯВСЬКА Л.О., ПЕТРЕНКО Т.В., КОЗИРИЦЬКА В.С., ГУТИНСЬКА Г.О.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ МПС, Д03680, Україна, e-mail: bilyvskal@
ukr.net*

НОВИЙ КОМПЛЕКСНИЙ АВЕРМЕКТИНВІСНИЙ БІОПРЕПАРАТ АСКОЛЬДІЯ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА

Перспективним елементом сучасних агробіотехнологій є впровадження у виробництво препаратів природного походження на основі мікроорганізмів та продуктів їх метаболізму, які проявляють фітозахисну, а також рістстимулюючу активність, підвищують стійкість рослин до стресових чинників [5].

Ідеї адаптивного землеробства, у тому числі системи інтегрованого біологічного захисту і стимуляції росту рослин знаходять все більше прихильників серед виробників, а також вчених, зайнятих розробкою біотехнологій захисту рослин та підвищенням продуктивності сільськогосподарських культур [4]. Новий підхід потребує повернення до раціонального господарювання, бережливого відношення до природних ресурсів, пошуку шляхів комплексного біологічного захисту рослин від шкідників, хвороб та бур'янів, фіторегуляції онтогенезу рослин [1].

Серед мікроорганізмів - продуцентів біологічно активних речовин провідна роль належить ґрунтовим стрептоміцетам, на основі яких розроблені біотехнології отримання препаратів для сільського господарства, охорони навколишнього середовища тощо. Вони здатні синтезувати широкий спектр фізіологічно активних речовин (амінокислоти, вітаміни, ферменти,

ліпіди, антибіотики та інші), які відіграють важливу роль у взаємовідносинах мікроорганізмів та вищих рослин.

В останні десятиліття в практику сільського господарства впроваджуються препарати, створені на основі макролідного антибіотика авермектину – продукту метаболізму ґрунтового стрептоміцету *Streptomyces avermitilis*. На основі авермектину створено ряд препаратів, які використовують як біопестициди для регуляції чисельності екзо- і ендопаразитів рослин, у тому числі і нематод. Співробітниками ІМВ НАН України селекціонований штам стрептоміцету *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 [6], здатний до синтезу авермектинів на основі якого створено вітчизняний препарат – Аверком, який характеризується високою нематодцидною та рістстимулюючою дією.

Зважаючи на те, що нагальною потребою сучасного рослинництва є розробка системи біологічного захисту рослин, особливої актуальності набуває питання розробки поліфункціональних препаратів з фітозахисними, рістстимулювальними та імуностимулювальними властивостями на основі екологічно безпечних авермектинвмісних біопрепаратів, зокрема Аверком, та регуляторів росту рослин (PPP) [2].

Метою наших досліджень було розробити біотехнологічні підходи для створення комплексного поліфункціонального препарату з біозахисною і ріст регулюючою дією для рослинництва.

Матеріали і методи

Складові для створення комплексного біопрепарату Аскольдія: антипаразитарний препарат Аверком, отриманий шляхом етанольної екстракції міцеллю 7-добової культури *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 та регулятор росту рослин Радостим у співвідношенні (1:50) та нормою витрати 135 мл/т насіння.

Вплив нового композиційного авермектинвмісного біопрепарату Аскольдія в порівнянні з його компонентами на ріст, розвиток і продуктивність пшениці ярої вивчали в умовах вегетаційного дослідження [3]. Насіння в день висіву обробляли препаратами у рекомендованих нормах витрати за схемою: 1. Контроль (без обробки біопрепаратами + $N_{60}P_{90}K_{90}$), далі по фону з внесенням мінеральних добрив $N_{60}P_{90}K_{90}$, 2. Аверком (20 мл/т), 3. Радостим (250 мл/т), 4. Аскольдія (Аверком + Радостим (135 мл/т). Дію біопрепарату Аскольдія порівнювали з контрольним варіантом та його окремими компонентами Аверкомом і Радостимом.

Визначали морфометричні показники розвитку рослин, вміст хлорофілів “a” і “b” у листках за методикою Велбурна [8].

Азотфіксувальну активність коренів пшениці із ризосферним ґрунтом визначали ацетиленовим методом [7].

Веgetаційний дослід проводили в 5-ти кратному повторенні. Розрахунки і статистичну обробку даних виконували за допомогою комп’ютерної програми Statistica 6.0.

Результати та обговорення

Проведені аналітичні дослідження складових комплексного поліфункціонального препарату Аскольдія. У складі Аверкому наявні: основна діюча речовина – антипаразитарний антибіотик авермектин (100 мг/л), а також інші, не менш важливі, біологічно активні продукти метаболізму продуцента – фосфоліпіди, стерини, ненасичені жирні кислоти (олеїнова, лінолева, ліноленова, арахідонова), фітогормони (індолілоцтова кислота, ізопентиладенін, зеатин, зеатинрибозид, брасиностероїди), амінокислоти, вітаміни групи В (тіамін, біотин). Регулятор росту рослин Радостим містить: біостимулятор «Емістим С» - збалансовану композицію біологічно-активних сполук, калієву сіль α -нафтілоцтової кислоти та мікроелементи [2].

Досліджуваний препарат Аскольдія суттєво впливав на ріст та накопичення надземної і кореневої маси рослин пшениці, яка зростала на 64 та 45 % відповідно до контролю, тоді як за дії окремих його компонентів Аверкому та Радостиму ці показники були дещо нижчими (табл. 1).

Таблиця 1

Формування надземної та кореневої маси ярої пшениці сорту Зимоярка за умов передпосівної обробки насіння біопрепаратом Аскольдія (фаза колосіння)

№ п/п	Варіант	Надземна маса		Маса коріння	
		г/рослину	% до контролю	г/рослину	% до контролю
1	Контроль (без обробки препаратами + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀)	2,76 ± 0,16	100	3,12 ± 0,22	100
2	Аверком + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	3,24 ± 0,12	117	4,35 ± 0,14	139
3	Радостим+ N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	3,36 ± 0,17	122	4,28 ± 0,03	137
4	Аскольдія+ N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	4,53 ± 0,12	164	4,53 ± 0,06	145

Дані свідчать, що за передпосівної обробки насіння комплексним поліфункціональним препаратом Аскольдія характерною особливістю розвитку рослин пшениці було активне формування ними потужної надземної маси та кореневої системи, що підтверджує синергічну дію складових препаратів. Одержані нами результати стосовно впливу біопрепаратів на нагромадження зеленої маси і ризогенез коріння пшениці співпадають із даними інших авторів [5].

Рівень ацетиленвідновлювальної активності ризосфери коренів пшениці за передпосівної обробки насіння біопрепаратом Аскольдія був вищим за контрольний варіант на 26 %, тоді як за дії окремих його компонентів Аверкому та Радостиму цей показник був нижчим і становив 17 та 9 % відповідно (табл. 2).

Поліпшення живлення рослин за рахунок застосування передпосівної обробки насіння комплексним біопрепаратом Аскольдія та його складовими Аверкомом і Радостимом позитивно впливало на вміст фотосинтетичних пігментів у листках пшениці (табл. 3). Так вміст хлорофілу “a”

у листках рослин пшениці збільшувався на 36%, а “b” – на 19 % відносно контролю за умови застосування біопрепарату Аскольдія, тоді як за дії його складових їх рівень був дещо нижчим.

Таблиця 2

Вплив біопрепарату Аскольдії на азотфіксувальну активність коренів ярої пшениці сорту Зимоярка (фаза колосіння)

№ п/п	Варіант	Азотфіксувальна активність, (нмоль C ₂ H ₄ /росл. добу)	% до контролю
1	Контроль (без обробки препаратами + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀)	4,7 ± 0,2	100
2	Аверком + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	5,5 ± 0,3	117
3	Радостим + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	5,1 ± 0,4	109
4	Аскольдія + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	5,9 ± 0,6	126

Таблиця 3

Вміст фотосинтетичних пігментів у листках ярої пшениці сорту Зимоярка за умов передпосівної обробки насіння (фаза колосіння)

№ п/п	Варіант	хлорофіл a	хлорофіл b
		мг/г сирої маси	
1	Контроль (без обробки препаратами + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀)	1,83 ± 0,06	0,63 ± 0,01
2	Аверком + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	1,80 ± 0,07	0,63 ± 0,02
3	Радостим + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	2,16 ± 0,09	0,70 ± 0,03
4	Аскольдія + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	2,49 ± 0,21	0,75 ± 0,08

Результати наших досліджень показали, що за обробки насіння комплексним біопрепаратом Аскольдія урожай зерна пшениці перевищував контрольний варіант на 23 %, тоді як за дії складових Аверкому та Радостиму він збільшувався лише на 11 та 18 % відповідно (табл. 4).

Таблиця 4.

Урожай зерна ярої пшениці сорту Зимоярка за умови передпосівної обробки насіння біопрепаратом Аскольдія

№ п/п	Варіант	Маса зерна, г/ посудину	Приріст урожаю		Маса 1000 зерен, г
			г/посудину	%, до контролю	
1	Контроль (без обробки препаратами + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀)	12,39 ± 0,25	–	100	33,97±0,39
2	Аверком + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	13,75 ± 0,26	1,36	111,0	33,73±0,49
3	Радостим+ N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	14,64 ± 0,47	2,25	118,2	36,17±0,64
4	Аскольдія + N ₆₀ P ₉₀ K ₉₀	15,25 ± 0,44	2,86	123,1	36,09±0,21
	НІР ₀₅	1,09			0,78

Розроблений біотехнологічний підхід створення комплексного поліфункціонального біопрепарату Аскольдія забезпечує одержання синергічного ефекту у відношенні регуляції росту рослин, біозахисної та імуномодельної дії, що дозволяє значно підвищити їх продуктивність при значному зниженні кількості використовуваного РРР.

Висновки

На основі авермектинвмісного препарату Аверком і регулятору росту рослин Радостим створений комплексний препарат Аскольдія.

Показано доцільність застосування нового комплексного авермектинвмісного препарату Аскольдія за умов передпосівної обробки насіння для підсилення росту, розвитку і продуктивності рослин ярої пшениці сорту Зимоярка.

Встановлено, що застосування біопрепарату Аскольдії за умов передпосівної обробки насіння сприяє зростанню вмісту фотосинтетичних пігментів в листках (на 31%) та підвищує азотфіксуальну активність ризосфери коренів пшениці на 26 %.

Передпосівна обробка насіння ярої пшениці сорту Зимоярка біопрепаратом Аскольдія сприяє збільшенню урожаю зерна на 23%.

Література

1. Андрійюк К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. та ін. Функціонування мікробних ценозів в умовах антропогенного навантаження. – К.: Обереги, 2001. – 240 с.
2. Биорегуляция микробно-растительных систем / [Иутинская Г.А., Пономаренко С.П., Андреев К.И. и др.] под ред. Г.А. Иутинской, С.П. Пономаренко – К.: Ничлава, 2010. – 464 с.
3. Грицаєнко З.М., Грицаєнко А.О., Карпенко В.П. Методи біологічних та агрохімічних досліджень рослин і ґрунтів. – К.: ЗАТ «НІЧЛАВА», 2003. – 320 с
4. Камінський В. Ф. Новітні технології вирощування конкурентоспроможної продукції рослинництва в системі стійкого землеробства України // Збірник наукових праць НННЦ “Інститут землеробства УААН” – К.: ВД “ЕКМО”, 2010. – Вип. 3. – С. 37-48.
5. Мікробні препарати у землеробстві. Теорія і практика / [Волкогон В.В., Надкренічна О.В., Ковалевська Т.М. та ін.] за ред. Волкогона В.В. – К.: Аграрна наука, 2007. – 312с.
6. Патент 69639 UA, МКИ¹ С 12N 1/20 С 12P 17/02, С 12P 17/18, С 12P 19/62, С 12R 1/465. Штам *Streptomyces avermitilis* – продуцент авермектинів, речовин антипаразитарної дії / Г. О. Іутинська, В. Є Козирицька, О. В. Валагурова, М. С. Мухвич, Л. О. Білявська, Т. В. Петрук // Бюл. – 2006. – № 8.
7. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. – 1968. – 43, № 8. – P. 1185–1202.
8. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b as well as total carotenoids using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Physiol. – 1994. – 144, № 3. – P. 307–323.

Резюме

Разработан новый биотехнологический продукт – комплексный полифункциональный препарат Аскольдия на базе авермектинсодержащего препарата Аверкома и регулятора роста растений Радостима. Показана целесообразность применения биопрепарата Аскольдия в условиях предпосевной обработки семян для усиления роста и развития растений яровой пшеницы сорта Зимоярка, что способствовало увеличению урожая зерна на 23%.

Розроблено новий біотехнологічний продукт – комплексний поліфункціональний препарат Аскольдія на базі авермектинвмісного препарату Аверкому і регулятору росту рослин Радостиму. Показано доцільність застосування біопрепарату Аскольдія за умов передпосівної обробки насіння для підсилення росту і розвитку рослин ярої пшениці сорту Зимоярка, що сприяло збільшенню урожаю зерна на 23%.

A new biotechnological product is developed. It's a complex multifunctional biopreparation of Askoldia on the base of avermectin containing preparation of Avercom and plant growth regulator of Radostim. Is shown the expedience application of a biological product on conditions pretreatment of seed for strengthening height and development plants of spring wheat sort Zimoyarka, which assists to increase grain yield by 23%.

БОРОДАЙ В.В.

Національний університет біоресурсів і природопольовання України,
03041, г. Киев, ул. Героев Оборони, 15, e-mail: veraboro@gmail.com

МОРФО- И КАЛЛЮСОГЕНЕЗ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одной из наиболее значимых культур в Украине и находится в числе основных продуктов потребления населения. Пищевая и кормовая ценность картофеля определяется тем, что его клубни содержат около 25 % сухих веществ. Картофель используется для продовольственных и кормовых целей, а также для перерабатывающей промышленности. Одним из факторов, влияющих на качество урожая и вырождение районированных сортов, является поражение картофеля болезнями грибной и бактериальной этиологии. Потери урожая от болезней в период вегетации и хранения составляют 25-30% [2,3]. Сочетание методов классической селекции с биотехнологическими методами, а именно с клеточной селекцией, позволяет решить проблему получения сортов, устойчивых к болезням.

Необходимым условием для успешного проведения клеточной селекции картофеля на устойчивость к возбудителям болезней является усовершенствование методологических подходов по управлению морфогенезом клеток и тканей, а также получению высокой частоты регенерации растений *in vitro* линий и сортов. Многочисленными экспериментами доказана зависимость частоты морфогенеза картофеля в каллюсных культурах от генотипических особенностей растений [1-5,7,11]. Также, отмечена связь

между интенсивностью морфогенетических процессов и раннеспелостью или позднеспелостью сортов [10]. Существуют корреляции между морфогенетическими процессами и генотипическими особенностями различных сортов и видов картофеля, поэтому актуальной задачей является изучение особенностей каллюсо- и морфогенеза в культуре *in vitro*. Целью работы было изучение морфогенетического потенциала и особенностей каллюсогенеза различных генотипов картофеля украинской селекции разных по срокам созревания.

Материалы и методы

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии Национального университета биоресурсов и природопользования Украины.

В качестве объекта были использованы клубни картофеля, любезно предоставленные Институтом картофелеводства НААН Украины: ранних сортов Серпанок и Повинь, среднеранних сортов – Обериг и Зелёный Гай, среднеспелых сортов Калиновская и Былина, среднепоздних – Червона Рута и Джерело Полесья. Исследования проводились в нескольких направлениях: 1) изучение морфогенетического потенциала сортов; 2) особенности каллюсообразования различных сортов картофеля в условиях *in vitro* с использованием классических методик [8-11]. Для получения маточных растений использовали промежуточные микрочеренки побегов пророщенных клубней длиной 1-2- см, с одной парой листьев, содержащие пазушные меристематические ткани. Стеблевые эксплантаты стерилизовали в растворе перекиси водорода в концентрации 17,5% в течении 8-10 мин. Увеличение длительности стерилизации негативно сказывалось на % получения жизнеспособных культур. В качестве базовой рабочей среды использовали питательную среду Мурасиге – Скуга (МС) [12] с различными её модификациями: для введения в культуру – безгормональную 1/2МС, побегообразования – МСП, дополненную кинетином, каллюсообразования – МСК, дополненную регуляторами роста: кинетином в концентрации 0,2 мг/л, 2,4-Д – 3 мг/л, а также глицином, мезоинозитом, фолиевой кислотой, гидролизатом казеина. Растения картофеля культивировали при температуре +24-26°C, интенсивности освещения 2 – 5 клк, влажности 70-80% и 16-часовым фотопериоде. Наблюдения за растениями проводили через каждые 7 дней. Особенности каллюсогенеза изучали путём систематических наблюдений за ростом и дифференциацией тканей, цветом и консистенцией, формированием морфогенных очагов. Интенсивность каллюсогенеза определяли по приросту сырой биомассы (%) каллюсной ткани по Л.А.Кучеренко [6]. Длительность пассажа составляла 21 день.

Результаты и обсуждение

Одной из актуальных проблем картофелеводства является получение картофеля, устойчивого к биотическим стрессам. Линии, полученные с помощью клеточной селекции могут служить исходным материалом для дальнейшей селекционной работы и вовлекаться в скрещивания в качестве

доноров соответствующих признаков. Черенкование растений в культуре *in vitro* является лучшим методом для быстрого размножения картофеля. Данный метод позволяет полностью ликвидировать повторное заражение растений при их размножении, а также получить за 2 – 3 месяца большое количество материала. На получение высокой частоты растений – регенератов влияют генотип, возраст исходного растения, сезонность изоляции. Нами была изучена морфогенетическая способность растительных эксплантатов сортов украинской селекции.

В результате оптимизации процесса стерилизации и подбора концентрации перекиси водорода и времени стерилизации было получено до 90% жизнеспособных культур. Полученные в асептических условиях побеги отделяли от первичного эксплантата и самостоятельно культивировали на питательной среде МСП. На вторую неделю растения черенковали (использовались микрочеренки длиной в 1-2 см с одной парой укороченных листьев, содержащие пазушные меристематические ткани). Из одного растения получали 5 – 8 черенков. Методом активации развития уже существующих в растении меристем при снятии апикального доминирования получили большое количество материала для дальнейших исследований.

Среди изученных нами сортов, высоким морфогенетическим потенциалом характеризовался среднеранний сорт Зелёный Гай, при этом коэффициент его размножения составлял 144 (у сортов Калиновская и Червона Рута – 130 и 122 соответственно, наименьший – у сорта Повинь – 72). После 3-4 недель культивирования у сорта Зелёный Гай наблюдалось и наилучшее развитие растений – формировались высокие побеги (до 15 см в высоту), с равномерно размещёнными листьями, большим количеством междоузлий (6-11) длиной до 1,5 см и хорошо развитой корневой системой (табл. 1).

Таблица 1

Коэффициент размножения в зависимости от сорта картофеля

Сорт	Количество междоузлий	Длина междоузлий, см	Высота растения, мм	Коэффициент размножения
Серпанок	4-6	1,12	59-62	85
Повинь	3-5	1,02	45-59	72
Обериг	6-8	1,31	77-98	110
Зелёный Гай	7-12	1,52	122- 148	145
Калиновская	8-10	1,48	92-121	130
Былина	5-7	1,29	69-84	93
Червона Рута	6-9	1,41	91-119	122
Джерело Полесья	4-7	1,26	75-84	102

Растения среднераннего сорта Обериг и среднеспелого Былина интенсивно формировали боковые побеги, растения становились букетоподобными, имели короткие междоузлия, хуже формировали корневую систему, имели укороченный неразвитый корень (рис.1). У ранних сортов Серпанок

и Повинь наблюдалось слабое побегообразование, небольшая длина растений, отсутствие корней. У растений среднепозднего сорта Червона Рута корнеобразование происходило с утолщением и интенсивным фиолетово-коричневым окрашиванием нижней части побега. Среднеранний сорт Зелёный Гай и среднепоздний сорт Джерело Полесья имели наиболее интенсивное образование корней. Сложнее всего в культуру вводился ранний сорт Повинь.

Нами были также проведены исследования по изучению особенностей каллюсогенеза представленных сортов. При изучении влияния первичного эксплантата на каллюсогенез наблюдалась незначительная разница при использовании междоузлий и листовых сегментов, интенсивность каллюсогенеза составляла 32,7-76,9% и 25,8-70,3% соответственно. У всех изучаемых сортов формировалась каллюсная ткань среднеплотной крупнозернистой структуры светло-коричневого цвета. Интенсивность процесса каллюсогенеза зависела от исследуемого генотипа. Наиболее интенсивно рост каллюсной ткани наблюдался у сорта Зелёный Гай (75,2% по сравнению с 25,4-65,4%), а в дальнейшем также и активная регенерация растений этого сорта (рис.2).

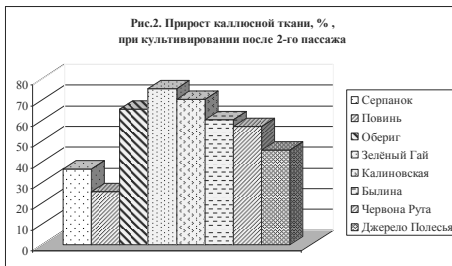
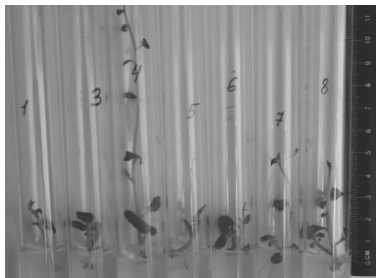


Рис. 1. Побегообразование в условиях *in vitro* сортов картофеля (1- Серпанок; 3,4 - Обериг и Зелёный Гай; 5, 6 - Калиновская и Былина; 7,8 - Червона Рута и Джерело Полесья)

У ранних сортов Серпанок и Повинь интенсивность каллюсогенеза была в 1,5- 1,8 раз ниже. Изучение и оптимизация условий индукции морфогенеза из культивируемых клеток является необходимой составной частью работы по изучению в культуре *in vitro* современных районированных и перспективных сортов картофеля. Также для плохо растущих в культуре *in vitro*, но имеющих важные хозяйственно - ценные признаки, генотипов необходимо подобрать оптимальные условия культивирования. В дальнейшем полученные каллюсные ткани будут использованы для клеточной селекции.

Выводы

1. Среднеранний сорт Зелёный Гай характеризовался высоким коэффициентом размножения – 144, интенсивным ростом побегов (до 15 см в

высоту), с равномерно размещёнными листьями, большим количеством междоузлий (6-11) до 1,5 см длиной и хорошо развитой корневой системой. По этим характеристикам к нему приближались среднеспелый сорт Калиновская и среднепоздние сорта Червона Рута и Джерело Полесья. И только ранний сорт Повинь имел невысокий морфогенетический потенциал.

2. Наиболее интенсивный прирост каллюсной ткани наблюдался у сортов Зелёный Гай (75,2%), Калиновская (70,3%) и Обериг (65,4%) по сравнению с другими сортами – 25,4 - 60,2%. При использовании междоузлий и листовых сегментов в качестве первичных эксплантатов для каллюсогенеза наблюдалась несущественная разница. Изучение особенностей культивирования *in vitro* различных сортов и линий картофеля является необходимым условием успешного проведения клеточной селекции и высокой частоты регенерации растений.

Литература

1. *Аветисов В.А., Мелик-Саркисов О.С.* Индуцированный *in vitro* морфогенез у сортов картофеля Янтарный, Львовянка и Повирец // Исследования по клеточной селекции картофеля. - М., 1984. - с. 89-94.

2. *Адамова А. И., Банадысев С. А., Бобрик А. О., Коновалова Г. И., Семенова З. А.* Технология производства исходного материала картофеля // Картофелеводство: Науч. тр. / Бел. НИК – Мн.: Мерлит, 2002. - Вып 11. - с. 187-225.

3. *Бондарчук А.А., Олійник Т.М.* Стан та перспективи розвитку біотехнологічних досліджень у картоплярстві // Картоплярство. – 2007.– Вип. 36. – с. 3-18.

4. *Глеба Ю.Ю., Зубко М.К.* Теоретические и прикладные аспекты клеточной инженерии растений // Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. - Москва, 1988. - Т. 9. - С. 3 - 72.

5. *Коновалова Г. И.* Использование биотехнологических методов и приемов в современном семеноводстве картофеля.// Актуальные проблемы науки и техники // Вопросы картофелеводства. Науч. тр. М., 2006. - с. 332-336.

6. *Кучеренко Л.А., Маддумаге Р.П., Гужов Ю.Л.* К методике определения массы каллусных тканей в процессе культивирования // Сельскохозяйственная биология. – 1991. – №3. – с. 84-85.

7. *Кучко А.А., Олійник Т.М.* Соматоклональна мініливість у картоплі. – К.: Довіра, 1998. – 191 с.

8. Методическое пособие. Семеноводство картофеля, контроль качества, сертификация. М., 2002. - с. 40-41.

9. Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею. Немішаєво: Інститут картоплярства. К.: Аграрна наука, 2002. - 32 с.

10. *Трофимец Л.Н., Анисимов Б.В., Литун Б.П., Старцева Л.И.* Организационно – методические основы семеноводства картофеля: (рекомендации). -М., Колос, 1979. 30с.

11. *Хромова Л.М.* Каллус и морфогенез в культуре тканей картофеля // Исследования по клеточной селекции картофеля,- М., 1984,- С. 81-88.

12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*– 1962.– 15.– P. 473–497.

Резюме

Вивчено морфогенетичний потенціал різних генотипів картоплі. При цьому середньоранній сорт Зелений Гай характеризувався високим коефіцієнтом розмноження-145, інтенсивним ростом пагонів, калусоутворенням (75,2%). За цими показниками до нього наближались сорти Калинівська і Червона Рута. Досліджуючи калусоутворення, в якості первинних експлантатів використовували міжвузля і листові сегменти. При цьому між експлантатами спостерігалась несуттєва різниця в калусогенезі.

Изучено морфогенетический потенциал различных генотипов картофеля. При этом среднеранний сорт Зелёный Гай характеризовался высоким коэффициентом размножения -145, интенсивным ростом побегов, каллусообразованием (75,2%). По этим показателям к нему приближались сорта Калиновская и Червона Рута. Изучая каллусообразование в качестве первичных эксплантатов использовали междоузлия и листовые сегменты. При этом между эксплантатами наблюдалась незначительная разница в каллусогенезе.

The morphogenetic potential of different varieties of potato was investigated. A medium - early ripening variety Zelenyuy Gay has high rate of reproduction – 145, plants with high shoots, intensive formation of callus (75,2%). According to these characteristics, the variety Kalinovskaya Chervona Ruta are approached. Studying callus formation as primary explants used internode and leaf segments. A minor differences between callus formation from leaves segments and internodes were observed.

ВИДРИНСЬКА О.К., ШВЕД О.М., ГУБРІЙ З.В., НОВІКОВ В.П.

Національний університет «Львівська політехніка»,

Україна, 79013, м. Львів, вул. С. Бандери 12, e-mail: vnovikov@polynet.lviv.ua

БІООЧИЩЕННЯ СТОКІВ ЗГІДНО ПРИНЦИПІВ СТАЛОГО РОЗВИТКУ

Важливе місце у вирішенні проблем охорони довкілля посідають питання пов'язані з захистом природних водойм від антропогенних забруднень. Особлива увага повинна приділятися скиданню забруднених стічних вод у природні поверхневі водні об'єкти та раціональному використанню природних водних ресурсів у всіх сферах людської діяльності. При неправильному очищенні стоки, що потрапляють в середовище, можуть містити речовини природного, синтетичного чи мікробного походження. Філософія створення нових сортів рослин, нового типу харчових продуктів та біорациональних фармацевтичних препаратів передбачає покращення результатів виробництва. Зокрема, збільшення урожайності технічних культур через застосування нових біодобрив та пестицидів і підвищення інтенсивності агровиробництва в цілому, через зміну класичних технологічних принципів та методів виробництва, із застосуванням нових методів селекції рослин, а також продуктів біосинтезу нових продуцентів тощо. Цілеспрямоване конструювання продуцентів та біокомпонентів біотехнологічної системи передбачає застосування рекомбінантної техніки генетичної та

клітинної інженерії, які є ефективними, але, що важливо, повинні бути доступними для контролю і відповідно контрольованими. Проблеми скидів, викидів та відходів існуючих виробництв стимулювали розвиток методів спостереження за довкіллям та розробку методів захисту, зокрема створення системи біомоніторингу навколишнього середовища та застосуванням біотестування для аналізу стану окремих його складових.

Експертна група українських науковців біологічного напрямку під керівництвом академіків НАН України Комісаренка С.В., Єльської Г.В., Підгорського В.С. визначила, що найбільш пріоритетним напрямом у захисті та відновленні навколишнього середовища, як у короткостроковій, так і у довгостроковій перспективі є використання методів екобіотехнології, котрі включають процеси біоконверсії, біодеструкції, біодетоксикації, біоутилізації, біомоніторингу та біотестування забруднень. Методи екобіотехнології мають місце особливо при очищенні водних та ґрунтових біотопів, а розроблення біотехнології знешкодження та повного усунення техногенних забруднень є ефективним методом відновлення довкілля та менеджменту забруднень. Промислові відходи з граничним вмістом токсикантів і ксенобіотиків поділяють за класом небезпеки, і відповідно знешкоджують, складають чи переробляють (промислові відходи 1–3 категорії можуть складуватись на полігонах разом з побутовими).

Залежно від характеру та об'єму виробництв, номенклатури продукції, особливості технології довкілля може забруднюватися також і біотехнологічними відходами, які охоплюються Директивою Ради 91/689/ЄЕС від 12.12.1991 р., і зараховуються до наступних груп: небезпечних, інертних та баластних; нестандартних за складом, високовитратних, здатних до біотрансформацій та з різним агрегатним станом. Особливо небезпечними відходами є генно-інженерні біологічні матеріали. Біологічний фактор забруднення дуже впливає на стан довкілля і визначається як сукупність біологічних компонентів, дія котрих на людину і навколишнє середовище пов'язана зі здатністю біозабруднювачів розмножуватися в природних або штучних умовах, продукувати біологічно активні речовини і впливати на довкілля та людей.

При контролі будь-якого підприємства слід враховувати типи та рівні безпечності стоків, а особливо важливим є контроль рідких відходів біотехнологічних виробництв. На біотехнологічних підприємствах потрапляння небезпечних речовин та об'єктів у стічні води може траплятися через високе розведення та неповне використання біооб'єктами компонентів живильних середовищ, накопичення не доочищених метаболітів біосинтезу, утворення неконтрольованих продуктів генетичних маніпуляцій. Наявність синтетичних хімічних низькомолекулярних сполук та полімерів чи інфікованої мікробної, рослинної (шлами, мули) та відмерлої тваринної біомаси (рештки тварин, тваринних культур, залишки курячих ембріонів чи дослідних тварин) може бути успішно усунена, а об'єкти – знешкоджені та ути-

лізовані шляхом використання біометодів (біоремедіації, біоочищення, біо-переробки і біомодифікації). Використання біометодів полягає у використанні традиційно селекціонованих чи генетично модифікованих біоагентів, але треба мати на увазі, що вони також можуть впливати на біологічну рівновагу природних екосистем, що залежить від того, наскільки враховувались закономірності інтродукції мікробних популяцій у природні екосистеми.

Відповідно велика увага повинна бути звернута до станцій очисних споруд на кожному такому підприємстві. Безумовно стоки повинні бути успішно очищеними, незараженими і переробленими, та доведеними до відповідних стандартів перед спуском у загальноміську систему каналізації чи безпосередньо у природні водойми. Окрема увага повинна приділятися функціонуванню комунальних загальноміських станцій очищення стічних вод. За свідченням фахівців, на сьогодні в Україні четверта частина каналізаційних очисних споруд і мереж у вартісному вираженні відпрацювала термін амортизації. Велика частина з них на даний час виведені з експлуатації та не функціонують. Відповідно стоки потрапляють у навколишнє природне середовище абсолютно неочищеними, що викликає серйозне занепокоєння, як потенційна загроза здоров'ю та життю населення.

При вирішенні проблем очищення стоків біотехнологічні способи обробки займають найбільш важливе місце. Методи біологічного очищення стоків набули широкого застосування, тому що вони здатні забезпечити потрібний рівень очищення, не вимагають значних економічних затрат і можуть бути застосовані у широкому масштабі. Крім того, використання деяких біотехнологічних способів очищення дає змогу утилізувати знешкоджені та трансформовані біотехнологічні відходи, і за достатньо простими технологіями отримувати корисні побічні продукти (біогаз, екобезпечні добрива тощо).

Нашими співробітниками була виконана робота присвячена дослідженням та розробці нових альтернативних методів очищення стічних вод від амонійного азоту, аналізу методів біоіндикації для визначення якості води та вивченню можливості отримання побічних цінних продуктів при очистці стічних вод. Враховано нормативні основи та законодавчу базу для регулювання використання різних мікроорганізмів і продуктів біотехнології, методів оцінки ступеня ризику потрапляння генно-інженерних штамів у довкілля, запровадження системи регламентації та маркування біопродуктів та запобіжних заходів у разі непередбаченого забруднення, що потребує наукових розробок їх трансформації або захоронення у спеціальних сховищах. Метою роботи була розробка оптимальної схеми очищення побутово-промислових стічних вод міста Львова відповідно до принципів сталого розвитку, з детальним дослідженням процесу очищення від амонійного азоту.

Для забезпечення належної очистки промислових та побутових стічних вод, що потрапляють у водні об'єкти, та встановлення комплексного контролю визначено наступний порядок проведення досліджень:

- проведення конкурентного моніторингу сучасного екологічного стану природних поверхневих водних об'єктів Львівської області;
- здійснення комплексної оцінки якості очищення стічних вод на Львівських каналізаційних очисних спорудах;
- дослідження наявності та закономірностей поширення апаттох-бактерій у технологічних об'єктах каналізаційних очисних спорудах міста Львова шляхом їх виділення з водного середовища;
- вивчення можливості отримання біогазу у процесі очистки стоків та його спалювання на когенераційних установках;
- аналіз технологій очищення стоків від органічних сполук, біогенних елементів, а також систем загального доочищення стоків з використанням фітоочищення.

В результаті проведеного моніторингу сучасного екологічного стану ряду природних поверхневих водних об'єктів північно-західної частини Львівської області визначено що найбільшим джерелом забруднень навколишнього середовища на даній території є ріка Полтва. Аналіз якості води в ріці Полтва показав високий вміст органічних забруднень та біогенних елементів (фосфору та азоту), а також присутність патогенних мікроорганізмів. В ході досліджень проведено іммобілізацію гідробіонтів на різних технологічних стадіях очищення на Львівських КОС, в результаті якого виділено асоціацію мікроорганізмів, які очевидно належать до групи апаттох-бактерій, що здатні окислювати амонійний азоту в анаеробних мезофільних умовах. Досліджено можливість отримання біогазу в процесі очищення стічних вод, та його спалювання на когенераційних установках, що може забезпечити економію у енергоресурсах до 25 %. Визначено найбільш оптимальні технології очищення стоків від органічних сполук, азоту та фосфору та запропоновано модернізовану схему очищення. За результатами якості та технологій очищення стічних вод на Львівських каналізаційних очисних спорудах визначено необхідність модернізації системи очищення шляхом встановлення додаткового обладнання для забезпечення очищення стоків з високим вмістом азоту.

Література

1. *Гвоздяк П.І., Михайловська М.В.* Порівняльний аналіз методів біологічного очищення стічних вод від сполук азоту // Наукові вісті НТУУ «КПІ». - 2007. - №2. - С.109-117.
2. *Кухар В.П., Кузьмінський Є.В., Ігнатюк О.А., Голуб Н.Б.* Екобіотехнологія та біоенергетика: Проблеми становлення і розвитку // Вісник НАН України. - 2005 - № 9. - С. 3-18.
3. *Новіков В.П., Сидоров Ю.І., Швед О.В.* Тенденції розвитку комерційної біотехнології // Вісник НАН України. - 2008 - № 2. - С.25-39.

4. Швед О.В., Миколів О.Б., Комаровська-Порохнявець О.З., Новіков В.П. Екологічна біотехнологія: Навч. посібник у 2 кн. Кн. I.– Львів: Видавництво Національного університету «Львівська політехніка», 2010. – 424 с.

5. Strous M. & Jetten M.S.M. Anaerobic oxidation of methane and ammonium // Annual Review of Microbiology 58, 99-117, 2004.

Резюме

Робота присвячена дослідженням з розробки схеми очищення промислово-побутових стічних вод з використанням біотехнологій, згідно принципів сталого розвитку.

Робота посвящена исследованию по разработке схемы очистки промышленно-бытовых сточных вод с использованием биотехнологий, согласно принципам устойчивого развития.

This work is devoted to the study of the urban-industrial wastewater treatment scheme development with using biotechnological methods, according to principles of sustainable development.

ГЕРАСИМЕНКО И.М., КАЗАНЦЕВ А.А., МАЗУР М.Г., КИЩЕНКО Е.М., ШЕЛУДЬКО Ю.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: ysheludko@ukr.net*

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

Методы генетической инженерии позволяют вводить в геном растений гетерологическую генетическую информацию как с целью изменения природных характеристик растения-хозяина, так и для получения белков, представляющих интерес для человека. Основным препятствием при использовании генетически-модифицированных растений для биотехнологического производства является часто низкий уровень накопления целевого белка, что может объясняться влиянием внутриклеточных систем регуляции на разные стадии экспрессии трансгена, а также деградацией конечного продукта под действием растительных протеаз. Для улучшения экспрессии трансгена были разработаны подходы, оптимизирующие процесс на каждой из стадий: трансформации и интеграции, транскрипции, трансляции и аккумуляции конечного продукта [1]. Важным звеном при этом является выбор регуляторных и транспортных последовательностей, обеспечивающих эффективную транскрипцию трансгена и максимальную стабильность рекомбинантного белка в данном биохимическом окружении.

Применение регуляторных элементов, обеспечивающих тканеспецифическую экспрессию трансгенов, позволяет накапливать чужеродные белки в отдельных органах растения (например, в семенах) с низким уровнем протеазной активности. Стабильность рекомбинантных белков может за-

висить также от их распределения по компартментам растительной клетки, что определяется наличием сигналов внутриклеточного транспорта. Использование индуцибельной и тканеспецифичной экспрессии может также иметь значение для накопления токсичных или физиологически-активных белков. В этом случае экспрессия осуществляется в определенных условиях или в целевых тканях-мишенях, что снижает риск нежелательного воздействия этих белков на растение, человека и окружающую среду.

Для проведения контролируемой экспрессии трансгенов и накопления рекомбинантных белков в подходящих компартментах клетки нами были подобраны различные регуляторные и транспортные генетические элементы и создана серия векторов для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений.

Материалы и методы

Для подбора регуляторных последовательностей использовали информацию об особенностях экспрессии генов растений, полученную из базы данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Промоторные участки, 5'-нетранслируемые регионы (5'-ПТР) и транспортные сигналы избранных генов были синтезированы (GenScript, США) или амплифицированы из геномной ДНК соответствующих видов растений методом ПЦР. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 1 мкг растительной ДНК, 2,5 единиц активности ДНК-полимеразы *Taq* (Helicon, Россия) и соответствующий реакционный буфер, нуклеозидтрифосфаты в концентрации 0,5 мМ (0,125 мМ каждый) и праймеры (Табл. 1) в концентрации 0,25 мкМ каждый. Амплификацию проводили в следующих условиях: 5 мин 94°C; 35 циклов (денатурация 30 сек 94°C; отжиг праймеров 45 сек при температуре, указанной в Табл. 1; синтез при 72°C в течение времени, указанного в Табл. 1); 5 мин 72°C. Продукты амплификации разделяли путём электрофореза в 1 % агарозном геле, используя 1x буфер TAE, и визуализировали с помощью бромистого этидия. Фрагменты ДНК нужного размера (Табл. 1) экстрагировали с помощью набора NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Германия). Полученные фрагменты ДНК после обработки соответствующими эндонуклеазами рестрикции (ЭР, Табл. 1) лигировали в векторные конструкции, созданные на основе pBIN19 (Рис.1). В работе использовали ЭР и Т4 ДНК лигазу New England Biolabs (США). Конструирование векторных молекул проводили с использованием штамма *E. coli* XL1Blue. Готовые генетические конструкции перенесли в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

Результаты и обсуждение

Для проведения тканеспецифической экспрессии целевых трансгенов были выбраны промоторы генов *apetala3* и *prS4A Arabidopsis thaliana*. Ген *apetala3* экспрессируется в цветочных меристемах и кодирует фактор транскрипции группы В, регулирующий развитие цветка [2]. Ген *prS4A*, кодирующий одну из субъединиц протеасомы, экспрессируется преимущественно в апикальных меристемах корня и стебля [3]. В этих тканях, чувствитель-

Таблица 1.

Регуляторные последовательности, использованные в работе

Регуляторная последовательность	Размер, п.н.	Праймеры: F-прямой, R-обратный; в скобках – ЭР, использованные для встраивания в вектор	Условия ПЦР	
			Темп. отжига	Время синтеза
Промотор <i>apetala3</i> (<i>A. thaliana</i>)	641	F gttaaaggcgaattcggg (<i>EcoRI</i>) R ttctcgagattgtgtggag (<i>XhoI</i>)	55 °С	60 сек
Промотор и 5'-НТП <i>prs4A</i> (<i>A. thaliana</i>)	1667	F ctttgaattctgcaatcg (<i>EcoRI</i>) R cttgtcccatggttcttc (<i>NcoI</i>)	60 °С	120 сек
Промотор и 5'-НТП <i>dreb1b</i> (<i>A. thaliana</i>)	1276	F ctgaagaattcctcaaacag (<i>EcoRI</i>) R tgagtccatggatcagag (<i>NcoI</i>)	55 °С	90 сек
Промотор <i>fae1</i> (<i>B. napus</i>)	462	F gcagaattcattaacttaactatcatcatg (<i>EcoRI</i>) R gatcgattgctcagtgtgtgtgctg (<i>Clal</i>)	60 °С	90 сек
Промотор <i>2ss2</i> (<i>B. napus</i>)	348	F gcagaattctctcatcccccttaaacac (<i>EcoRI</i>) R gatcgatgttttaactgtttgtattgatg (<i>Clal</i>)	60 °С	30 сек
Промотор и 5'-НТП <i>oleo3</i> (<i>B. napus</i>)	289	F atgaattcgcctgtgtgagtg (<i>EcoRI</i>) R ccgccatgggtctcttg (<i>NcoI</i>)	60 °С	30 сек
Промотор <i>2ss2</i> (<i>A. thaliana</i>)	376	Синтезирован химически (<i>EcoRI</i> , <i>Clal</i>)		
Промотор <i>oleo1</i> (<i>A. thaliana</i>)	433	F gcagaattcattttctcattgtgctagaatg (<i>EcoRI</i>) R gatcgattttttgtcttgtttactagagag (<i>Clal</i>)	60 °С	30 сек
Транзитный пептид <i>Ats1A</i> (<i>A. thaliana</i>)	168	F gaacctggcttcctc (<i>NcoI</i>) R gctcttcgcagttaactctcc (<i>SapI</i>)	45 °С	30 сек
Транзитный пептид <i>Rbs</i> (<i>N. tabacum</i>)	171	Синтезирован химически (<i>NcoI</i> , <i>Clal</i>)		
Транзитный пептид <i>Rca</i> (<i>S. oleracea</i>)	174	Синтезирован химически (<i>NcoI</i> , <i>Clal</i>)		
Сигнальная последовательность <i>Chia</i> (<i>N. tabacum</i>)	66	Синтезирована химически (<i>NcoI</i> , <i>Clal</i>)		
Сигнальная последовательность <i>Nes3</i> (<i>N. langsdorffii</i> x <i>N. sanderae</i>)	75	Синтезирована химически (<i>NcoI</i> , <i>Clal</i>)		

ных к холодовому стрессу, планируется проводить экспрессию генов ацил-липидных десатураз цианобактерий для защиты этих органов растений от повреждений при понижении температуры [4]. Под контроль промоторов *apetala3* и *prs4A* был помещен ген репортерного белка β-глюкуронидазы в генетических конструкциях для *Agrobacterium*-опосредованной трансфор-

мации растений (Рис. 1). Полученные вектора будут использованы для определения специфичности работы изучаемых промоторов в разных видах растений.

Альтернативным подходом может быть экспрессия генов десатураз, индуцируемая понижением температуры. Для проведения такой экспрессии был выбран промотор гена *drebl1b A. thaliana*, который кодирует фактор транскрипции, регулирующий экспрессию генов во время адаптации растения к низким температурам [5]. Под контроль полученного промотора *drebl1b* был помещен ген бифункционального репортерного белка C-LicBM3, который состоит из зеленого флуоресцентного белка (GFP), слитого с термостабильной лихеназой *Clostridium thermocellum* [6]. Такой репортер позволяет одновременно проводить как оценку экспрессии гена в неповрежденных тканях растения благодаря флуоресценции GFP, так и высокочувствительные и специфические измерения лихеназной активности целевого белка в экстрактах.

Для проведения семяспецифической экспрессии были выбраны регуляторные области генов β -кетоацил-CoA-синтазы (*fae1*) [7], олеозина (*oleo3*) и напина-2 (*2ss2*) [8] рапса (*Brassica napus*) и напина-2 (*2ss2*) и олеозина (*oleo1*) [9] *A. thaliana*. Под контроль данных промоторов был помещен ген репортерного зеленого флуоресцентного белка (GFP). Полученная серия векторов позволит проводить подбор наиболее эффективного семяспецифического промотора для разных видов растений. В дальнейшем под контроль семяспецифических промоторов будут помещены гены фармацевтически ценных белков для обеспечения их накопления в запасующих тканях растения. Первая созданная конструкция содержит ген интерферона $\alpha 2b$ человека, слитого с репортерным белком термостабильной лихеназой под контролем промотора гена напина рапса.

Аккумуляция рекомбинантных белков в хлоропластах или апопласте может повышать стабильность конечного продукта или обеспечивать внутриклеточную локализацию фермента. Для транспорта целевых белков в хлоропласты были выбраны транзитные пептиды малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы *A. thaliana* (*Ats1A*) и *Nicotiana tabacum* (*Rbs*) и активазы рубиско *Spinacia oleracea* (*Rca*). Для секреции целевых белков в апопласт были выбраны сигнальные последовательности кислой эндохитиназы *N. tabacum* (*Chia*) и нектарина-3 *N. langsdorffii* x *N. sanderae* (*Nec3*). Была создана генетическая конструкция, позволяющая экспрессировать в растениях ген ацил-липидной десатуразы *desC* ($\Delta 9$) цианобактерии *Synechococcus vulcanus*, слитой с термостабильной лихеназой, с транзитным пептидом рубиско табака. Эффективность созданной конструкции была подтверждена методом транзитной экспрессии в растениях *N. excelsior*.

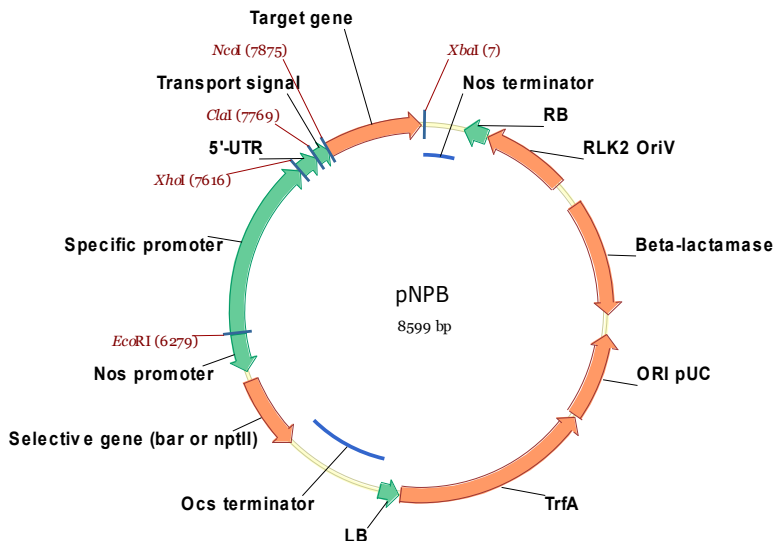


Рис. 1. Схема генетических конструкций для контролируемой транскрипции целевых генов в растениях. Specific promoter – промотор для тканеспецифичной или индуцибельной экспрессии в растениях; 5'-UTR - 5'-нетранслируемый регион, transport signal – сигнал внутриклеточного транспорта, target gene – целевой ген.

Выводы

Создана коллекция регуляторных и транспортных генетических элементов для тканеспецифической и индуцибельной экспрессии рекомбинантных белков и их внутриклеточной компартиментализации. Полученные последовательности включены в серию векторов для агробактериальной трансформации, что позволит провести подбор способа экспрессии, наиболее эффективного для требуемых видов растений и целевых белков.

Работа выполнялась при поддержке гранта НАНУ УкрИНТЭИ № 0110U006061, № 0110U006062 и ГФФИ Украины-РФФИ, грант F40.4/021

Литература

1. Streatfield S.J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants // Plant Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 5. – P. 2–15.
2. Jack T., Brockman L.L., Meyerowitz E.M. The homeotic gene *APETALA3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens // Cell – 1992. – Vol. 68. – P. 683–697.
3. Ueda M. et al. The HALTED ROOT gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems // Development – 2004. – Vol. 131. – P. 2101–2111.

4. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии. - 2001. - Т. 41. - С. 163-198.

5. Shinwari Z.K. et al. An *Arabidopsis* gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low-temperature -responsive gene expression // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1998. - Vol. 250. - P. 161-170.

6. Голденкова И.В., Мусийчук К.А., Пирузян Э.С. Репортерная система, основанная на термостабильности лихеназы *Clostridium thermocellum*, для изучения регуляции экспрессии генов в клетках про- и эукариотических организмов // Молекулярная биология. - 2002. - Т. 36., Вып. 4. - С. 868-876.

7. Han J. et al. Functional characterization of beta-ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. // Plant. Mol.Biol. - 2001. - Vol. 46. - P. 229-239.

8. Ellerstrom M., Stalberg K., Ezcurra I., Rask L. Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription // Plant. Mol.Biol. - 1996. - Vol. 32. - P. 1019-1027.

9. Parmenter D.L. et al. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning // Plant. Mol.Biol. - 1995. - Vol. 29. - P. 1167-1180.

Резюме

Создана серия векторов для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений, содержащих генетические элементы для индуцибельной и тканеспецифической экспрессии целевых генов, а также внутриклеточного транспорта целевых белков.

Створено серію векторів для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин, які містять генетичні елементи для індукованої та тканино-специфічної експресії цільових генів, а також внутрішньоклітинного транспорту цільових білків.

A series of vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation was created, that contains genetic elements allowing for inducible and tissue-specific expression of target genes as well as subcellular transport of the proteins of interest.

¹ГОНЧАР О.М., ²ТУГАЙ Т.І., ²ТУГАЙ А.В., ¹ЛОПАТЬКО К.Г.,

¹АФТАНДІЛЯНЦ Є.Г., ¹ПАТИКА М.В.

*¹Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, 03041, Київ вул.Героїв Оборони,15, e-mail: alonagonchar@mail.ru*

*²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
Україна, Д 03680, Київ МСП, вул. Академіка Заболотного,154,
e-mail: tatyanaugay2@gmail.com*

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ

В теперішній час активно проводяться дослідження різних наноматеріалів, зокрема, колоїдних розчинів біологічно активних металів, отриманих за допомогою нанотехнологій, які є антистресовими препаратами і виявляють властивість підвищувати стійкість тваринних та рослинних клітин до різноманітних несприятливих факторів [5].

Відомі методи і способи отримання наноматеріалів з ряду причин обмежують їх потенційне використання у біотехнологіях.

В наших дослідженнях використовувався метод електроіскрового диспергування струмопровідних матеріалів як найбільш перспективний для одержання біофункціональних наночастинок, оскільки даний метод найбільш повно відповідає поставленій меті – отримання біологічно спрямованих нанорозмірних матеріалів у вигляді колоїдних розчинів металів. Питання можливого використання препаратів на основі наночастинок у біотехнологіях, носієм яких є водні дисперсії металів, певним чином пов'язано з фізико-хімічними властивостями колоїдних розчинів, впливом зовнішніх факторів на їх характеристики та біологічну функціональність таких матеріалів. Ефективність застосування наночастинок обумовлена не тільки розмірним фактором, але й більш інтенсивною взаємодією частинок з оточуючим середовищем та генерацією катіонів відповідних металів.

Не зважаючи на ряд проведених досліджень, досконало не вивчено вплив нанорозчинів металів на рослини.

Мета – дослідження колоїдних розчинів металів на насіння крес-салату. Для досягнення поставленої мети слід було вирішити наступні завдання – виявити вплив обробки насіння наночастинами металів на розвиток кореневої системи та активності ферментів рослин у вегетаційному досліді.

Матеріали і методика

Об'єкт дослідження тест-культура крес-салату. Для досліді в пробірці поміщали по 25 зерен та інокулювали насіння нанорозчинами металів впродовж 12 год., пророщували в чашках Петрі протягом 5 діб.

Корені та листки розтирали в порцеляновій ступці в 50 мМ Трис-НСІ буфері (рН 7,8) при температурі 0-4°C. Гомогенат центрифугували 10 хв при 5000 об/хв. В одержаному супернатанті реєстрували каталазну та пероксидазну активність.

Каталазну активність визначали спектрометричним методом за допомогою спектрофотометра СФ-26 за здатністю перекису водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [1]. Коефіцієнт молярної екстинції каталази при 410 нм - $22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Пероксидазну активність визначали спектрофотометричним методом, за допомогою спектрофотометра СФ-26 за здатністю ферменту каталізувати окислення субстрату - АБТС (2,2-азино-біс (3 етилбензотіазолін - 6 -сульфонова кислота) пероксидом водню. Коефіцієнт молярної екстинції АБТС при 436 нм - $29,5 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [6]. Концентрацію білка у пробах визначали за методом Bradford, використовуючи як стандарт альбумін сироватки бика [2].

Використовували нанорозчини металів: Mn, Mg, Mo, Ag. Концентрації досліджуваних розчинів нанометалів: 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} М металу у водному розчині. В якості досліджуваних розчинів використовували колоїдні розчини металів з різним діапазоном концентрацій: (Патент України №38459 – Маточний колоїдний розчин металів; Патент України №38461

– Пристрій для отримання колоїдних розчинів ультрадисперсних металів). Повторність досліду трьохкратна. Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету Sigma Stat – 2.0 та представляли графічно за допомогою програми Microsoft Excel.

Результати та обговорення

Нами було проведено порівняльне вивчення впливу колоїдних розчинів наночастинок чотирьох металів на ріст тест-культури кресс-салату. Характер впливу оцінювали за двома параметрами змінами довжини кореня та стебла. Було досліджено вплив колоїдних розчинів, концентрація яких відрізнялась на 7 порядків.

Показано, що високі концентрації усіх розчинів (10^{-3} М) несуттєво (7% -14%) стимулювали ріст кореня, а і зниженням їх концентрації до наномольних (10^{-8} М - 10^{-10} М) виявлені дуже цікаві закономірності: за дії розчину Mn виявлено виражений ріст стимулюючий вплив, а за дії розчину Mo не значне пригнічення росту, за дії Ag виражене інгібування росту на 75% - 85% (табл. 1). При дії розчину Mg стимуляцію росту спостерігали при найвищій та найнижчій концентраціях, а проміжні – дещо пригнічували ріст.

Встановлено, що усі досліджувані колоїдні розчини стимулювали ріст стебла, максимальна величина складала 30%. Слід зазначити, що найбіль-

Таблиця 1.

Вплив нанорозчинів металів на довжину коріння та стебл

Тип металу	Концентрація, М	Довжина кореня		Довжина стебла	
		см	% до контролю	см	% до контролю
Контроль		9,83±0,4915	100	3,57±0,1785	100
Mn	10^{-3}	14,15±0,7075	144	4,01±0,2005	112
	10^{-6}	12,63±0,6315	128	3,85±0,1925	108
	10^{-8}	13,88±0,694	141	4,13±0,2065	116
	10^{-10}	12,8±0,64	130	4,53±0,2265	127
Mo	10^{-4}	9,6±0,48	98	3,88±0,194	109
	10^{-6}	10,28±0,514	105	4,15±0,2075	116
	10^{-8}	8,95±0,4475	91	3,68±0,184	103
	10^{-10}	9,13±0,4565	93	4,3±0,215	120
Ag	10^{-4}	10,54±0,527	107	3,97±0,1985	111
	10^{-6}	8,45±0,4225	86	4,59±0,2295	129
	10^{-8}	1,73±0,0865	16	3,48±0,174	97
	10^{-10}	2,55±0,1275	26	3,58±0,179	100
Mg	10^{-3}	11,03±0,5515	112	4,1±0,205	115
	10^{-6}	9,58±0,479	97	4,65±0,2325	130
	10^{-8}	8,45±0,4225	86	4,62±0,231	129
	10^{-10}	11,23±0,5615	114	4,23±0,2115	118

ший ефект, як і при дії на корінь, виявлено при низьких концентраціях розчинів, при 10^{-6}M для Mo та Ag, при 10^{-6}M - 10^{-8}M для Mg та навіть при 10^{-10}M для Mn.

Отримані дані свідчать, що досліджувані колоїдні розчини мають виражену фітостимулюючу дію, яка залежить від їх концентрації. Виявлені нами ріст стимулюючі ефекти спостерігали при низьких концентраціях колоїдних розчинів, що можна порівняти з концентраціями, в яких діють відомі стимулятори росту, роблять їх дуже перспективними як з економічної так і екологічної точки зору. Було досліджено у тест-культури активність каталази і пероксидази (рис. 1, а; б.)

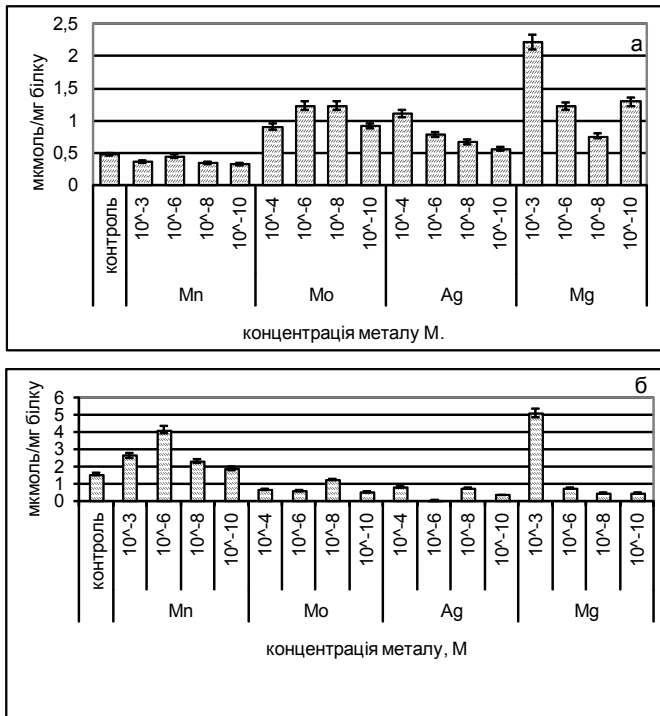


Рис. 1 Вплив нанорозчинів на активність каталази (а), пероксидази (б)

Колоїдні розчини Mo при всіх досліджених концентраціях в 2 – 2,5 рази підвищували активність каталази по відношенню до контролю (без дії нанорозчинів) (рис. 1а). При дії розчинів Ag стимуляція каталазної активності зростала з підвищенням концентрації розчинів від 10^{-10}M до 10^{-4}M .

Ріст в присутності колоїдних розчинів Mg суттєво, у кілька разів підвищував активність каталази, хоча і прямої залежності активності ферменту від концентрації розчину не було виявлено. Тільки колоїдні розчини Mn у

всьому діапазоні досліджених концентрацій пригнічували активність каталази. В той же час саме колоїдні розчини Mn при всіх досліджених концентраціях стимулювали активність пероксидази, а максимальний ефект спостерігався при 10^{-6} М (рис.16). Значна стимуляція пероксидазної активності виявлена і при дії розчину Mg у концентрації 10^{-3} М, а інші концентрації цього розчину пригнічували активність ферменту. Про дії розчинів Mo та Ag у всьому діапазоні досліджених концентрацій виявлено пригнічення пероксидазної активності.

Встановлено, що при дії трьох з чотирьох досліджених колоїдних розчинів металів являються індукторами каталазної активності, а два з них – індукторами пероксидазної активності. Слід зазначити що всі досліджувані розчини підвищували активність принаймні одного з двох антиоксидантних ферментів кресс-салату. Згідно з даними літератури ці ферменти приймають участь в підвищенні рівня морозостійкості, у стійкості рослин до несприятливих факторів, дія яких призводить до сольового стресу, окислювального стресу, зокрема при враженні фітопатогенами [3].

Висновки

Встановлено, що досліджені препарати наночастинок металів проявляють фітостимулюючу активність і є індукторами антиоксидантних ферментів, що підвищує стійкість рослин до несприятливих факторів довкілля і робить досліджувані препарати перспективними для використання. Низькі діючі концентрації досліджених розчинів роблять їх перспективними, як з екологічної так і з економічної точки зору, при використанні в біотехнологіях.

Література

1. *Корольок М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
2. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. –Р. 248–254.
3. *Fedoroff N.* Mechanisms in cellular stress responses // *Ann. Bot.* – 2006. – **98**. – P. 289–300.
4. *Nasrabadi H.* Some biochemical properties of catalase from Kohlrabi // *J. Biol. Sci.* – 2008. – **8**, N 3. – P. 649–653.
5. Пат. 38459 України на корисну модель. Маточний колоїдний розчин металів / Лопатько К.Г., Афтандіянц С.Г., Тонха О.Л., Каленська С.М.; заявник і власник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – Зареєстр. в Держ. реєстрі патентів України 12.01.2009. Отримано 16.10.2009.
6. *Ihiyagarajan A., Saravanakumar K., Kaviyarsan V.* Optimization of extracellular peroxidase production from *Coprinus* sp. // *Indian.J.Sci.Technol.* – 2008. – **1**, N 7. – P. 1 – 5.
7. *Zimmermann P., Zentgraf U.* The correlation between oxidative stress and leaf senescence during plant development // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2005. – **10**. – P. 515–534.

Резюме

Проаналізовано вплив нанорозчинів металів Mn, Mg, Mo, Ag різної концентрації на морфологічні показники та активність ферментів каталази та пероксидази рослин крес-салату. Встановлено стимуляція ростових показників та активності пероксидази та катазази в залежності від концентрації металів.

Проанализировано влияние наноразтворов металов Mn, Mg, Mo, Ag разной концентрации на морфологические показатели и активность ферментов каталазы и пероксидазы растений кресс-салата. Установлена стимуляция ростовых показателей и активность пероксидазы и катазазы в зависимости от концентрации металов.

Influence metal nanoparticles Mn, Mg, Mo, Ag different concentration on morphological indicators and activity of enzymes of a catalase and a peroxidase of plants of pepperwort-salad is analysed. Stimulation growing indicators and activity of a peroxidase and catalase depending on concentration metals is established.

ГРОМОВА О.Н.

*ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия Минздравоуразвития России,
Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А,
e-mail: olesya.gromova@pharminnotech.com*

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ БИОМАССЫ ШТАММА ЖЕНЬШЕНЯ PANAX GINSENG С. А. МЕУ (СЕМ. ARALIACEAE)

По данным ВОЗ в настоящее время в комплексной терапии и профилактике различных заболеваний актуальным остается вопрос разработки новых препаратов растительного происхождения. Наибольший интерес представляют фитопрепараты, обладающие иммуномодулирующим и адаптогенным действием.

Природные запасы лекарственных растений сокращаются вследствие часто неправильной и нерегламентированной их заготовки. Некоторые лекарственные растения на территории России не произрастают или произрастают в ограниченном количестве, что определяет потребность в импортировании сырья. Решение проблемы бесперебойного обеспечения фармацевтической промышленности растительным сырьём возможно благодаря применению метода культуры изолированных органов, тканей и клеток высших растений [1]. В настоящее время для создания рентабельного производства на основе клеточных культур цена продукта должна быть достаточно высокой. В перспективе, при увеличении продуктивности клеточных штаммов-продуцентов БАВ и создании технологий, позволяющих увеличить количество продукта и уменьшить время его наработки, так как в условиях культивирования *in vitro* идет синтез ценных БАВ (алкалоиды, гликозиды, эфирные масла и др.), синтез которых обычным химическим путем длителен и трудоемок. Культивирование растительных клеток *in vitro*

позволяет сохранить генфонд ценных и редких исчезающих видов лекарственных растений [2, 3].

Объектом исследования являлся коллекционный штамм женьшеня (*Panax ginseng* С.А.Меу) получен в СПХФА в 1965 году от шестилетнего оранжерейного корня женьшеня путем многократного селективного отбора клеток [4]. Культивирование осуществляется на стандартной питательной среде в соответствии с паспортом штамма (шифр КД).

Культивирование штаммов предполагает использование сложных многокомпонентных питательных сред, содержащих определенный набор минеральных солей, витаминов, стимуляторов роста, что значительно усложняет технологический процесс.

Поэтому перспективным направлением в области биотехнологии растительных тканей является оптимизация состава питательных сред и сокращение временного цикла культивирования штамма – продуцента БАВ.

Ранее проводились исследования по изучению возможности культивирования штамма женьшеня на видоизмененной питательной среде: только с уменьшенным количеством минеральных солей, мезоинозита и гидролизата казеина; только с исключением из состава среды нитрата аммония; только без фитогормона. Влияние состава питательной среды оценивали по росту биомассы [5].

Нами была изучена возможность получения селективной клеточной линии штамма женьшеня на питательной среде, в которой одновременно отсутствует нитрат аммония и стимулятор роста – кинетин.

Для исследований были выбраны следующие варианты питательных сред для культивирования биомассы женьшеня – *Panax ginseng* С. А. Меу (сем. Araliaceae):

Вариант 1. Контрольная среда по прописи Мурасиге-Скуга (MS) [6].

Вариант 2. Среда (MS) с исключением нитрата аммония и кинетина.

Биомассу женьшеня культивировали поверхностным способом на твердой агаризированной питательной среде. На протяжении 10-12 пассажей проводили отбор только тех клеток, рост которых на селективной среде не уступал или превосходил контроль по накоплению биомассы и содержанию основных действующих веществ (ОДВ). В результате была получена селективная клеточная линия женьшеня (СД) и дана ее характеристика.

Биомасса селективной линии женьшеня по морфологическим признакам не отличалась от коллекционного штамма.

Анатомо-морфологическое исследование полученной клеточной линии показало, что культура на 90 % состоит из тонкостенных паренхимных клеток с целлюлозными оболочками, на 3-5% из образовательных, меристематических клеток и небольшого числа, не более 1-2%, слабо лигнифицированных проводящих трахеид с характерными простыми или окаймленными порами и очень длинными тонкостенными волокнами.

Воздушно- сухая биомасса - пористое, легко рассыпающееся при растирании сырье, имеет горьковатый вкус и стойкий специфический запах, который сохраняется на протяжении длительного времени.

Одним из основных признаков стабильности штамма является сохранение показателей роста при многократной рекультивации. Исследования были выполнены на протяжении 2006, 2007 и 2008 годов в различные сезоны года. Для изучения динамики роста определяли показатели накопления сырой и сухой биомассы штамма женьшеня (КД) и селективной линии (СД) каждые 5 суток, при этом прирост биомассы не уступает контролю.

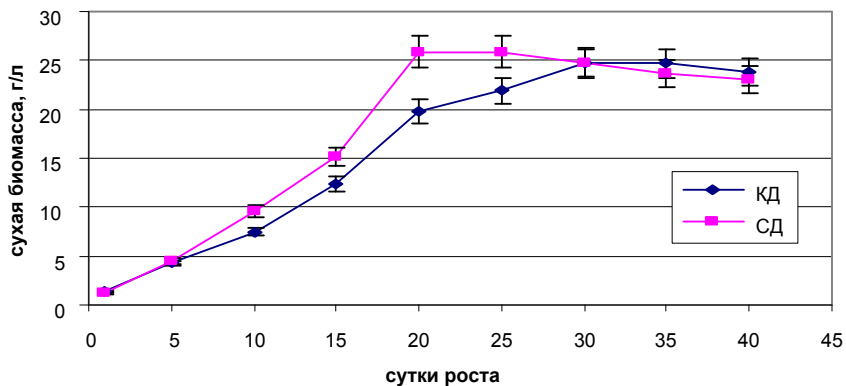


Рис. 1. Динамика накопления сухой биомассы селективной линии (СД) и контрольного штамма (КД) женьшеня

За календарный год проходит 14 пассажей селективной клеточной линии женьшеня, что повышает эффективность процесса культивирования на 40% по сравнению с контрольным вариантом, так как сокращается цикл культивирования на 10 дней.

Таким образом, в результате проведенных многолетних исследований было доказано, что селективная клеточная линия биомассы женьшеня (СД) стабильна по показателю роста при многократных рекультивациях на среде лишенной кинетина и нитрата аммония и может быть рекомендована для внедрения в производство.

В дальнейшем была проведена наработка биомассы для изучения ее физико-химических и технологических параметров для отработки получения новых фитопрепаратов. С целью определения основных товароведческих показателей, а также наличия основных групп БАВ в воздушно-сухой биомассе, был выполнен товароведческий и фитохимический анализ. Результаты товароведческого анализа биомассы селективной клеточной линии женьшеня представлены в таблице 1.

Таким образом, биомасса женьшеня СД по показателям качества соответствует требованиям НД. На селективную клеточную линию женьше-

ня составлен паспорт. Разработанная технология выращивания культуры прошла апробацию в производственных условиях в ХБО при РАН «Фирма Вита», г. Санкт-Петербург [8].

Таблица 1

Результаты товароведческого анализа биомассы СД женьшеня, культивируемой на среде без кинетина и нитрата аммония

Наименование показателя	Селективная линия женьшеня (СД)	Требования НД*
влажность, %	6,04±0,27	не более 8
зола общая, %	8,77±0,59	не более 13
экстрактивные вещества, извлекаемые: –спиртом этиловым 20 об.% –спиртом этиловым 40 об.% –спиртом этиловым 70 об.% –водой очищенной	41,17±2,06 46,50±2,61 46,87±2,34 44,74±1,98	не менее 40
водорастворимые полисахариды, %	5,72±0,62	не менее 5
суммарная гликозидная фракция, %	1,87±0,09	не менее 1,5
гликопептидный комплекс, %	2,50±0,13	-
Требования НД* - ВФС на биомассу женьшеня [7]		

Проведенные исследования по совершенствованию технологии позволили получить селективную клеточную линию женьшеня на питательной среде, лишенной нитрата аммония и стимулятора роста – кинетина, на 40% сократить время культивирования за год, удешевить производство и повысить качество биомассы по содержанию действующих веществ.

Литература

1. *Лутова, Л.А.* Биотехнология высших растений / Л.А. Лутова. - СПбУ 2003.– 223 с.
2. *Березнеговская, Л.Н.* Культура тканей и клеток алкалоидных растений / Л.Н. Березнеговская, И.Ф. Гусев, С.Е. Дмитрук и др. – Томск, 1975.– 194 с.
3. *Бутенко, Р.Г.* Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения / Р.Г. Бутенко // Культура клеток растений и биотехнология. - М: Наука , 1986.– С .3-20.
4. А. св. №1621510 от 08.09.1988, Способ получения биомассы женьшеня и других аралиевых / Л.И.Слепян, Е.Н.Батыгина и др.
5. *Шиков, А.Н.* Влияние различных факторов на выращивание биомассы женьшеня и разработка из нее малоотходной технологии лекарственных средств. // Диссерт. на соискание степени канд. фарм.н. - Спб. , СПХФА. - 1995.
6. *Бутенко, Р.Г.* Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Р.Г. Бутенко // М.: Наука, 1991. – 280 с.
7. ВФС 42-1891-89 «Биомасса женьшеня сухая».
8. *Громова, О.Н.* Совершенствование технологии культивирования штамма женьшеня, разработка капель для приема внутрь и буккальных пленок на его основе // Автореф. на соискание степени канд. фарм.н. – Спб, СПХФА. – 2011.

Резюме

Получена селективна клітинна лінія женьшеня на поживній середі з включенням нітрату амонію та стимулятора росту. На протязі п'яти років було доведено, що дана селективна клітинна лінія стабільна по накопленню біомаси та вмісту основних діючих речовин. Встановлено, що по всім показателям якості біомаса селективної лінії женьшеня задовольняє вимогам для біомаси женьшеня, вирощеної на стандартній середі. Совершенствование технології вирощування біомаси штамма женьшеня дозволило підвищити ефективність процесу культивування на 40% за календарний рік і скоротити строк культивування на 10 днів.

Selective cell line ginseng was obtained in a nutrient medium with the exception of ammonium nitrate and growth stimulator. For five years, it was shown that the selective cell line is stable for the accumulation of biomass and the content of the main ingredients. Found that all indicators of quality of ginseng biomass selective lines to satisfy the requirements for the biomass of ginseng grown in standard medium. Improvement of cultivation technology has allowed the biomass of the strain of ginseng to improve the process of cultivation by 40% for the calendar year and shorten the cultivation for 10 days.

ДЕРКАЧ К. В., АБРАІМОВА О. Є., ЧЕРНОУСОВА Н. М., СМЕТАНІН В. Т., САТАРОВА Т. М.

*ДУ Інститут сільськогосподарства степової зони НААН України,
Україна, 49600, Дніпропетровськ, вул. Держжинського, 14, e-mail: satarova2008@
uandex.ru*

*ДВНЗ «Український державний хіміко-технологічний університет»,
Україна, 49005, Дніпропетровськ, пр. Гагаріна, 8*

ОПТИМІЗАЦІЯ РЕГЕНЕРАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР

Більшість біотехнологічних досліджень для кукурудзи проводиться на модельних генотипах, для яких достатньо добре визначені оптимальні умови культивування *in vitro*. Новостворені, перспективні у селекційному відношенні генотипи також потребують пошуку оптимальних умов калусогенезу і регенерації з метою використання у генетичній трансформації, отриманні соматоклональних варіантів тощо.

Зародкова плазма кукурудзи Ланкастер має значні потенційні переваги для створення на її основі нового вихідного і елітного селекційного матеріалу для вирощування в Україні. Лінії зародкової плазми Ланкастер в основному належать до середньостиглої і середньопізньої груп стиглості [1, 2], проте вони інтенсивно використовуються для створення скоростиглих генотипів кукурудзи [2], у селекції на абіотичну стійкість [1, 3] та як донори високої комбінаційної здатності [1].

Слід відзначити, що генетична трансформація і отримання соматоклонів, які дозволяють отримувати цінні модифікації елітних ліній кукурудзи, ведуться переважно на базі калусної тканини з подальшим отриманням рослин-регенерантів [4-7]. У зв'язку з цим метою нашої роботи було визна-

чення оптимального складу середовища індукції калусогенезу за вмістом сахарози та середовища регенерації за вмістом фізіологічно-активних речовин (ФАР) для підвищення регенераційного потенціалу ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер.

Матеріали і методи

Калуси з незрілих зародків 10 ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер та ліній-стандартів Chi31, A188, ДК675 та PLS61 індуквали на середовищах з мінеральною основою N₆ з додаванням 30 або 60 г/л сахарози, 10 мг/л нітрату срібла, 690 мг/л L-проліну, 100 мг/л гідролізату казеїну, 100 мг/л мезоінозиту, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти та 0,1 мг/л абсцизової кислоти. Калуси, отримані на 30-у добу культивування на даних індукційних середовищах, перенесли на середовища регенерації з мінеральною основою MS з додаванням 20 г/л сахарози та певної ФАР (0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП), 0,1 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК) або 150 мг/л цефотаксиму (Цт)). Цефотаксим – напівсинтетичний аналог антибіотику цефалоспору, який здатен позитивно впливати на прояв регенераційної здатності у кукурудзи [8].

Для аналізу калусогенного потенціалу ліній кукурудзи визначали такі показники як загальна частота калусогенезу – процентне відношення кількості зародків, які утворили калус, до загальної кількості культивованих зародків; частота утворення морфогенних калусів – процентне відношення кількості зародків, які утворили морфогенний калус, до загальної кількості культивованих зародків; частота утворення калусів типу I (цупкий, здатний до регенерації, підтримується в культурі *in vitro* нетривалий час) та типу II (пухкий, здатний до регенерації, підтримується в культурі *in vitro* тривалий час) – процентне відношення кількості зародків з відповідним типом реакції до загальної кількості культивованих зародків.

Для аналізу регенераційного потенціалу калусів кукурудзи визначали такі показники як загальна частота регенерації – процентне відношення кількості калусів, які проявили будь-який тип регенерації (пагони, листові структури), до загальної кількості калусів, культивованих на регенераційному середовищі; частота утворення 0-5 пагонів на 1 калус, частота утворення 0-5 листових структур на 1 калус, частота утворення 0-5 пагонів та 0-5 листових структур на 1 калус одночасно, частота утворення 6-10 пагонів на 1 калус, частота утворення 6-10 листових структур на 1 калус одночасно, частота утворення 0-5 пагонів та 6-10 листових структур на 1 калус одночасно, частота утворення 6-10 пагонів та 0-5 листових структур на 1 калус одночасно – процентне відношення кількості калусів, які проявили певний тип регенерації, до загальної кількості калусів, культивованих на регенераційному середовищі. Дані в таблиці 1 представлені у вигляді $\bar{x} \pm mt_{0,05}$, де \bar{x} – середнє \bar{x} арифметичне значення показника, m – похибка середнього арифметичного, $t_{0,05}$ – критерій Ст'юдента за рівня значущості 0,05.

Результати та обговорення

Вплив концентрації сахарози (табл. 1) проявлявся у розбіжностях значень частоти утворення морфогенних калусів у п'яти з 13 досліджених ліній. У лінії ДК267 та ДК6080 вміст 30 г/л сахарози порівняно з 60 г/л у індукційному середовищі сприяв підвищенню рівня частоти утворення морфогенних калусів. У лінії ДК633/266, ДК633 та ДК3070 спостерігалася зворотна закономірність.

Концентрація сахарози у середовищі індукції впливала на співвідношення калусів типу I та типу II. Відмічено переважне утворення калусів типу I на середовищі індукції з 60 г/л сахарози і калусів типу II на середовищі індукції з 30 г/л сахарози у лінії ДК6080, ДК298, ДК3070 та ДК633/325. Дану особливість рекомендовано використовувати для отримання того чи іншого типу калусів.

Відмічено, що при субкультивуванні морфогенність калусів довше зберігалася на середовищах з 30 г/л сахарози.

Аналіз регенераційної здатності калусів проводили на 30-у добу культивування на середовищах регенерації (60 діб в культурі *in vitro*) (табл. 2). Серед досліджуваних ліній зародкової плазми Ланкастер регенераційну здатність проявили лінії ДК267, ДК6080, ДК420-1 та ДК298, лінії-стандарту характеризувалися високим регенераційним потенціалом. Регенерація ліній зародкової плазми Ланкастер характеризувалася більш вузьким колом типів прояву регенераційної здатності, ніж регенерація модельних ліній.

Серед виділених нами типів регенерації кращим для подальшого вирощування регенерантів є утворення пагонів, а не листових структур. Даний тип регенерації спостерігався у всіх ліній, які проявили свій регенераційний потенціал, хоча і не на всіх запропонованих середовищах регенерації.

Відзначено тенденцію підвищення загальної частоти регенерації калусів на середовищі з 0,1 мг/л 6-БАП. Найвищий загальний показник частоти утворення 0-5 пагонів на калус, індукований з 30 г/л сахарози, спостерігався на середовищі з 150 мг/л Цт, а на калус, індукований на середовищі з 60 г/л сахарози, – на середовищі з 0,1 мг/л 6-БАП.

Висновки

Концентрація сахарози у індуктивному середовищі впливає на частоту утворення морфогенних калусів та на співвідношення калусів типу I та типу II. Менші концентрації сахарози сприяють тривалішому збереженню морфогенності калусів. Вміст сахарози у середовищі індукції та вид фізіологічно-активної речовини регенераційного середовища впливає на прояв регенераційної здатності ліній кукурудзи. Оптимальним для морфогенного калусогенезу і регенерації лінії ДК6080 зародкової плазми Ланкастер є поєднання 30 г/л сахарози в індукційному середовищі з 0,1 мг/л ІМК, для ліній ДК420-1 та ДК298 – поєднання 30 г/л сахарози в період індукції з 0,1 мг/л 6-БАП в регенераційному середовищі, а для лінії ДК267 – поєднання 60 г/л сахарози в індукційному середовищі з 150 мг/л цефотаксиму у регенераційному середовищі.

Таблиця 1
Вплив концентрації сахарози в індукційному середовищі на калусогенну здатність ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер

Лінія	Генетична плазма, підплазма	Вміст сахарози у середовищі індукції, г/дл	Кількість культивованих зародків, шт.	Загальна частота калусогенезу, %	Частота утворення морфогенних калусів, %	Частота утворення калусів типу I, %	Частота утворення калусів типу II, %
ДК267	Ланкастер, Оh43	60 30	225 207	99,11 ± 1,25 95,17 ± 2,99	75,56 ± 5,74 88,89 ± 4,38	8,89 ± 3,80 14,49 ± 4,91	66,67 ± 6,30 74,40 ± 6,08
ДК212	Ланкастер, Оh43	60 30	120 36	100,00 ± 0,00 100,00 ± 0,00	92,50 ± 4,83 94,44 ± 7,74	0,83 ± 1,67 0	91,67 ± 5,07 94,44 ± 7,74
ДК6080	Ланкастер, Оh43	60 30	136 157	58,09 ± 8,49 88,54 ± 5,10	37,50 ± 8,33 67,52 ± 7,50	26,47 ± 7,59 5,10 ± 3,52	11,03 ± 5,39 62,42 ± 7,76
ДК420-1	Ланкастер, Оh43	60 30	208 167	72,60 ± 6,20 98,80 ± 1,69	39,42 ± 6,79 47,31 ± 7,75	12,02 ± 4,52 2,99 ± 2,65	27,40 ± 6,20 44,31 ± 7,71
ДК633/266	Ланкастер, Мо17/ Оh43	60 30	251 143	99,60 ± 0,80 97,90 ± 2,41	96,81 ± 2,22 88,81 ± 5,29	0 0	96,81 ± 2,22 88,81 ± 5,29
ДК298	Ланкастер, Мо17/ Оh43	60 30	252 175	99,21 ± 1,12 97,14 ± 2,53	87,70 ± 4,15 82,29 ± 5,79	50,79 ± 6,31 10,29 ± 4,61	36,90 ± 6,09 72,00 ± 6,81
ДК633	Ланкастер, Мо17	60 30	389 264	68,89 ± 4,70 53,41 ± 6,15	29,56 ± 4,63 14,39 ± 4,33	15,94 ± 3,72 9,85 ± 3,67	13,62 ± 3,48 4,55 ± 2,57
ДК3070	Ланкастер, Мо17/ О92	60 30	430 234	96,05 ± 1,88 99,57 ± 0,85	93,26 ± 2,42 82,05 ± 5,03	68,14 ± 4,50 13,25 ± 4,44	25,12 ± 4,19 68,80 ± 6,07
ДК236	Ланкастер, Мо17/ F2	60 30	175 97	98,29 ± 1,97 97,94 ± 2,90	61,14 ± 7,39 72,16 ± 9,15	11,43 ± 4,82 19,59 ± 8,10	49,71 ± 7,58 52,58 ± 10,19
ДК633/325	Ланкастер, Мо17/ Міндзепуста	60 30	203 50	90,15 ± 4,19 96,00 ± 5,60	48,28 ± 7,03 64,00 ± 13,71	33,50 ± 6,64 0	14,78 ± 4,99 64,00 ± 13,71
PLS61	Екзотична PLS61, PLS61	60 30	309 183	97,09 ± 1,92 97,27 ± 2,42	95,15 ± 2,45 96,17 ± 2,84	94,17 ± 2,67 48,63 ± 7,41	0,97 ± 1,12 47,54 ± 7,40
A188	Екзотична A188, A188	60 30	173 75	98,27 ± 1,99 98,67 ± 2,67	91,91 ± 4,16 92,00 ± 6,31	43,93 ± 7,57 0	47,98 ± 7,62 92,00 ± 6,31
Chi31	Екзотична Chi31, Chi31	60 30	143 117	97,90 ± 2,41 94,87 ± 4,10	90,91 ± 4,82 84,62 ± 6,70	6,29 ± 4,08 0	84,62 ± 6,06 84,62 ± 6,70

Таблиця 2

Регенераційна здатність ліній зародкової плазми Ланкастер

Лінія	Вміст сахарози у середовищі індукції, г/л	ФАР у середовище регенерації	Кількість культивованих калусів, шт.	Загальна частота регенерації, %	Частота утворення 0-5 пагонів на 1 калус, %
ДК267	30	6-БАП, 0,1 мг/л	15	46,67	6,67
		ІМК, 0,1 мг/л	15	53,33	26,67
		Цт, 150 мг/л	15	13,33	0
	60	6-БАП, 0,1 мг/л	11	27,27	18,18
		ІМК, 0,1 мг/л	11	36,36	18,18
		Цт, 150 мг/л	11	36,36	27,27
ДК6080	30	ІМК, 0,1 мг/л	6	16,67	16,67
ДК420-1	30	6-БАП, 0,1 мг/л	5	20,00	20,00
	60	Цт, 150 мг/л	6	16,67	16,67
ДК298	30	6-БАП, 0,1 мг/л	8	75,00	37,50
		ІМК, 0,1 мг/л	8	50,00	25,00
		Цт, 150 мг/л	8	25,00	12,50
	60	6-БАП, 0,1 мг/л	6	16,67	16,67
PLS61	30	6-БАП, 0,1 мг/л	8	100,00	37,50
		ІМК, 0,1 мг/л	9	77,78	11,11
		Цт, 150 мг/л	8	100,00	62,50
	60	6-БАП, 0,1 мг/л	19	78,95	36,84
		ІМК, 0,1 мг/л	19	52,63	31,58
		Цт, 150 мг/л	19	42,11	21,05
A188	30	6-БАП, 0,1 мг/л	12	33,33	8,33
		Цт, 150 мг/л	12	25,00	0
	60	6-БАП, 0,1 мг/л	14	71,43	35,71
		ІМК, 0,1 мг/л	14	50,00	35,71
		Цт, 150 мг/л	14	71,43	35,71
Chi31	30	6-БАП, 0,1 мг/л	9	33,33	0
		ІМК, 0,1 мг/л	9	55,56	22,22
		Цт, 150 мг/л	9	55,56	11,11
	60	6-БАП, 0,1 мг/л	4	75,00	0
		ІМК, 0,1 мг/л	4	100,00	0
Цт, 150 мг/л		4	100,00	0	
ДК675	30	6-БАП, 0,1 мг/л	9	33,33	0
		ІМК, 0,1 мг/л	9	55,56	44,44
	60	Цт, 150 мг/л	17	11,76	0
		6-БАП, 0,1 мг/л	18	5,56	0
		ІМК, 0,1 мг/л	17	11,76	0
Середне по генотипах	30	Цт, 150 мг/л	131	22,14	6,87
		6-БАП, 0,1 мг/л	131	21,37	7,63
		ІМК, 0,1 мг/л	131	19,08	8,40
	60	Цт, 150 мг/л	161	21,12	9,32
		6-БАП, 0,1 мг/л	166	15,66	7,83
		ІМК, 0,1 мг/л	149	19,46	8,72
Середне		6-БАП, 0,1 мг/л	292	21,58	8,22
		ІМК, 0,1 мг/л	297	18,18	7,74
		Цт, 150 мг/л	280	19,29	8,57

Література

1. *Дзюбецький Б. В., Черчель В. Ю., Воскобойник О. В., Нетреба О. О.* Варіювання тривалості періоду «сходи – цвітіння жіночих суцвіть» залежно від умов року, строку сівби та генотипів батьківських форм гібрида // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2009. – № 37. – С. 22 – 26.
2. *Олешко О. Г.* Оцінка нових самозапильних ліній кукурудзи споріднених з генетичною плазмом Ланкастер / О. Г. Олешко // Бюл. Ін-ту зерн. госп-ва. – 2003. – № 21-22. – С. 65 – 69.
3. *Боденко Н. А.* Добір та оцінка вихідного матеріалу на посухо- та жаростійкість для селекції середньостиглих гібридів кукурудзи : автореф. дис. ... канд. с.-г. наук : спец. 06.01.05 / Боденко Наталя Анатоліївна. – Дніпропетровськ, 2003. – 19 с.
4. *Долгих Ю. И.* Соматоклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования на примере кукурузы: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.12 / Долгих Юлия Ивановна; Ин-т физиологии растений РАН. – М., 2005. – 385 с.
5. *Чеченева, Т. М.* Спонтанна та індукована мінливість кукурудзи in vitro: автореф. дис. ... докт. біол. наук: 03.00.15 / Чеченева Тетяна Миколаївна; Ін-т фізіол. росл. та генетики. – К., 2003. – 43 с.
6. *D'Halluin, K., Bonne, E., Bossut M. et al.* Transgenic maize plants by tissue electroporation // *The Plant Cell*. – 1992. – vol. 4. – P. 1495 – 1505.
7. *Pescitelli, S., Sukhapinda, K.* Stable transformation via electroporation into maize Type II callus and regeneration of fertile transgenic plants // *Plant Cell Rep.* – 1995. – vol. 14. – P. 712 – 716.
8. *Данилова С. А., Долгих Ю. И.* Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима // *Физиология растений*. – 2003. – Т. 51. № 4. – С. 621 – 625.

Резюме

Відзначено вплив компонентів середовищ культивування на калусогенну і регенераційну здатність у ліній кукурудзи зародкової плазми Ланкастер. Прояв регенераційного потенціалу ліній визначається складом фізіологічно активних речовин середовища регенерації та вмістом сахарози у середовищі індукції. Визначено оптимальні концентрації сахарози в індукційному середовищі та фізіологічно активних речовин в регенераційному середовищі для окремих ліній кукурудзи плазми Ланкастер.

Отмечено влияние компонентов сред культивирования на калусогенную и регенерационную способность у линий кукурузы зародышевой плазмы Ланкастер. Проявление регенерационного потенциала линий определяется составом физиологически активных веществ в регенерационной среде и содержанием сахарозы в среде индукции. Определены оптимальные концентрации сахарозы в индукционной среде и физиологически активных веществ в регенерационной среде для отдельных линий кукурузы плазмы Ланкастер.

The influence of components of cultivation media on callusogenesis and regenerative capacity of maize lines of Lancaster germplasm is noted. The demonstration of the regeneration capacity of the lines is determined by the composition of physiologically active substances in the regeneration medium and the sucrose contents in the inductive medium. The optimal concentrations of sucrose in the inductive medium and physiological active substances in the regenerative medium for individual lines of maize Lancaster germplasm were established.

ЗАЙЦЕВА О.И., ЛЕМЕШ В.А.

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Беларусь, 220027, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: O.Zaitseva@igc.bas-net.by

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ТРИТИКАЛЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Тритикале (*x Triticosecale* Wittm.) – ценная сельскохозяйственная культура, полученная в результате объединения геномов пшеницы и ржи, имеет ряд преимуществ по сравнению с родительскими формами и характеризуется устойчивостью к ряду заболеваний (мучнистой росе, головне и др.), неблагоприятным факторам внешней среды. В странах Европы (Германия, Польша и др.) наблюдается устойчивая тенденция к расширению посевных площадей тритикале. В Беларуси за последние годы посевные площади ярового тритикале увеличились с 2,7 до 17,4 тыс. га с перспективой дальнейшего расширения до 50 тыс. га [1]. Однако наряду с преимуществами данная культура имеет ряд недостатков, таких как относительная позднеспелость, цитогенетическая нестабильность, недовыполненность эндосперма и др. Все это свидетельствует о необходимости дальнейшего улучшения существующих сортов и получение перспективных для селекции линий.

При скрещивании пшеницы и ржи наблюдается низкая завязываемость семян, а также недоразвитие эндосперма. Гибридные зародыши, как правило, abortируют на ранних стадиях развития. В связи с этим перспективным представляется использование биотехнологических подходов, с помощью которых можно разработать эффективную систему индукции каллусов и регенерации растений гексаплоидного тритикале, а также их размножения в культуре *in vitro*. Такая система будет полезна также при генетической трансформации тритикале.

В течение последних десятилетий проводились исследования в области культивирования соматических клеток и тканей *in vitro* тритикале, при этом в качестве эксплантов использовались молодые колоски, молодые листочки, пыльники, незрелые зародыши, зрелые зародыши [2, 3]. Максимальный выход каллусов и растений-регенерантов для пшеницы, ячменя, тритикале показан при использовании в качестве эксплантов незрелых зародышей [2]. Однако применение культуры незрелых зародышей имеет ряд ограничений. Необходимо использование теплиц для выращивания донорных растений, что требует дополнительных материальных затрат. Незрелые зародыши остаются морфогенно-компетентными в течение непродолжительного времени, что также затрудняет применение данного метода.

Использование в качестве эксплантов зрелых зародышей позволяет избавиться от временного ограничения, так как они могут культивироваться на протяжении всего года и при этом не требуют дополнительных площадей.

Данные об использовании метода культивирования зрелых зародышей *in vitro* для тритикале имеют отрывочный характер [3, 4]. Применение данного метода, как правило, характеризуется невысоким выходом растений-регенерантов, либо его отсутствием [5]. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния состава индукционной и регенерационной среды на морфогенетические процессы в культуре зрелых зародышей *in vitro* ярового гексаплоидного тритикале для усовершенствования технологии получения растений-регенерантов.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 5 сортов ярового гексаплоидного тритикале (Ульяна, Узор, Лотас, Мешко, Садко), отобранные по хозяйственно-ценным признакам, любезно предоставленные сотрудниками лаборатории тритикале РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

Для введения в культуру *in vitro* зерновки стерилизовали в течение 20 мин 3% гипохлоритом натрия с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой. Затем их оставляли для набухания на двое суток при температуре +4°C. Зародыши извлекали в асептических условиях и помещали в чашки Петри на индукционную питательную среду MS с различным составом гормонов и углеводов [6], затем культивировали в термостате в темноте при температуре +26°C.

Через 4 недели культивирования зародышей образовавшиеся каллусы переносили на регенерационные среды MS и MSR и выращивали на светоустановке при длине светового дня – 16 ч, интенсивность освещения – 1500-2000 Лк. После формирования растений-регенерантов для лучшего развития корневой системы их пересаживали в банки на обедненную безгормональную среду 0,5MSR.

Способность к индукции морфогенетических процессов в культуре зрелых зародышей изучаемых сортов оценивали по частоте каллусообразованая, частоте образования ризогенных каллусов, каллусов с растениями-регенерантами, недифференцированных каллусов, деградировавших каллусов, рассчитанным от числа выделенных зрелых зародышей.

Результаты и обсуждение

Одним из наиболее важных экзогенных факторов, позволяющих повысить эффективность методов культуры соматических тканей и органов *in vitro*, является использование различных питательных сред и изменения их состава. Культуральная среда как источник питательных веществ во многом определяет степень реализации морфогенетического потенциала экспланта, а также путь развития каллусов. С целью определения оптимальных условий для культивирования зрелых зародышей тритикале был проведен подбор типа индукционной и регенерационной среды.

Для индукции каллусообразования использовались четыре варианта среды, в состав которой входили соли и витамины по Murashige и

Skoog [6], углеводы сахара или мальтоза, а также гормон 2,4-Д в двух концентрациях (2,0 и 4,0 мг/л). Формирование каллуса начиналось на 3-4 день культивирования. При этом была отмечена 100% индукция плотного желтоватого каллуса. Не было выявлено отличий в способности эксплантов к каллусообразованию в зависимости от концентрации 2,4-Д, генотипа и взаимодействия между данными факторами. В свою очередь тип углевода, используемый в индукционной среде, оказывал влияние на каллусообразование в культуре зрелых зародышей тритикале. Формирование каллуса наблюдалось у всех изученных генотипов независимо от вида источника углерода, однако темпы роста каллуса значительно отличались. Показано, что в случае использования мальтозы наблюдалось замедленное развитие каллуса. При этом данное явление не было связано с концентрацией 2,4-Д, а также отсутствовали генотипические эффекты.

В дальнейшем полученные каллусы переносились на два типа регенерационных сред, в состав которой входили соли по Murashige и Skoog и сахара, при этом среды отличались по гормональному составу и содержанию витаминов и аминокислот. После пассивирования каллусов на среду для регенерации наблюдали различные типы морфогенетических ответов: одни каллусы формировали зеленые побеги с листьями, другие – корнеобразные структуры, третьи разрастались и образовывали рыхлый водянистый рассыпчатый каллус. Разнообразие морфогенетических путей в той или иной степени было характерно для всех генотипов, при этом отмечено преобладание морфогенетического ответа по типу ризогенеза (таблица 1). Побегообразование отмечено у четырех из пяти изученных сортов. Только сорт Лотос не проявил способности к регенерации растений в культуре зародышей, при этом для данного сорта отмечена наиболее высокая частота дегенерации каллусов.

Анализ полученных данных показал, что состав регенерационной среды оказывал влияние на морфогенетические процессы в культуре зародышей гексаплоидного тритикале. При этом наблюдалась генотипически специфичная реакция на вид регенерационной среды (таблица 1).

Наибольшие различия по типу морфогенетического ответа каллусов были зафиксированы по признакам «частота ризогенных каллусов» и «частота дегенерировавших каллусов». Например, у сорта Лотос 86,49% каллусов развивались по пути ризогенеза на среде MSR и 15,15% - на среде MS. Для сорта Ульяна наблюдалась противоположная ситуация: у 25,64% эксплантов индуцировалось развитие ризогенных каллусов на среде MSR и 79,49% - на среде MS. Наряду с этим, как правило, пониженная частота формирования ризогенных каллусов коррелировала с повышенной частотой дегенерировавших каллусов. В частности, у сорта Лотос на среде MSR наблюдался некроз 84,85% каллусов, в то время как на среде MS все каллусы сохраняли жизнеспособность.

Таблица 1

Морфогенетический ответ сортов тритикале в культуре зрелых зародышей в зависимости от состава регенерационной среды

Сорт	Регенерационная среда	Частота каллусов с растениями регенерантами, %	Частота ризогенных каллусов, %	Частота недифференцированных каллусов, %	Частота дегенерировавших каллусов, %
Ульяна	MSR	5,13	79,49	7,69	7,69
	MS	0	25,64	58,97	15,38
Лотас	MSR	0	15,15	0	84,85
	MS	0	86,49	13,51	0
Узор	MSR	2,94	52,94	29,41	14,71
	MS	0	71,88	28,13	0
Мешко	MSR	0	28,13	28,13	43,75
	MS	3,13	84,38	3,13	9,38
Садко	MSR	0	36,36	9,09	54,55
	MS	3,03	90,91	6,06	0

Данные отличия в морфогенетическом ответе эксплантов могут быть обусловлены различным гормональным составом использованных в исследовании регенерационных сред. Питательная среда MS была безгормональной, среда MSR дополнена ауксином ИУК в концентрации 0,5 мг/л и цитокинином кинетином в концентрации 0,5 мг/л. В классической работе Skoog и Miller установлено, что баланс цитокининов и ауксинов определяет направление морфогенеза [7], при этом близкое к равному соотношение этих фитогормонов поддерживает неорганизованный рост каллусной ткани, удаление из среды и ауксинов, и цитокининов часто приводит к образованию эмбриоидов в культуре клеток. В нашем исследовании наблюдалась генотипически зависящая реакция эксплантов на тип регенерационной среды. Возможно, пути морфогенеза в культуре зрелых зародышей тритикале зависят как от содержания эндогенных гормонов в каллусе, так и от концентраций экзогенных гормонов в составе среды для регенерации.

Выводы

Проведен подбор питательных сред для индукции каллусообразования и регенерации растений в культуре зрелых зародышей *in vitro* гексаплоидного тритикале. Показано, что использование сахарозы в качестве источника углерода в индукционной среде обеспечивает максимальные темпы прироста каллусной массы. Выявлено, что взаимодействие между генотипом и балансом гормонов в регенерационной среде определяет путь морфогенеза каллусов.

Література

1. Гриб С.И., Булавина Т.М. Основные элементы технологии возделывания ярового тритикале на почвах разного гранулометрического состава // Весці НАН Беларусь Сер. агр. навук. – 2004. – № 4. – С. 47-51.
2. Vikrant, Rashid A. Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2001. – Vol. 64. – P. 33–38.
3. Birsin M.A., Özgen M. Comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of triticale (x *Triticosecale* Wittmack) // Cell. Mol. Biol. Let. Vol. – 2004. – Vol. 9. – P. 353–361.
4. Eudes F., Acharya S. A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plant // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 2003. – Vol. 73. – P. 147–157.
5. Padmaja G., Reddy V.D. Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature embryo callus cultures of triticale // Indian J. Exp. Biol. – 1992. – Vol. 30. – P. 181–184.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
7. Skoog F., Miller C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro // In: The biological action of growth substances: Symp. Soc. Exp. Biol. Cambridge: Univ. Press. – 1957. – Vol. 11. – P. 118–131.

Резюме

Изучена отзывчивость в культуре зрелых зародышей *in vitro* пяти сортов ярового гексаплоидного тритикале. Показано, что использование сахарозы в индукционной среде обеспечивает максимальные темпы прироста каллуса. Выявлено что гормональный состав регенерационной среды и генотипические особенности обуславливают морфогенетический ответ каллусов в культуре зрелых зародышей.

Responsiveness of five cultivars of spring hexaploid triticale was studied in the *in vitro* mature embryo culture. Sucrose in induction media was shown to have a positive effect on callus induction. Morphogenetic answer of callus depends on genotype and concentration of growth regulator in regeneration media.

ЗАХАРУК О.А., АНОПРІЄНКО О.В., ВАГІНА І.М., СТРОКОВСЬКА Л.І.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Україна; 03143 Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: olenal1@mail.ru

ЛОКАЛІЗАЦІЯ БАКУЛОВІРУСНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ В РІЗНИХ ОРГАНАХ МИШІ ПРИ ВВЕДЕННІ РЕКОМБІНАНТНИХ БАКУЛОВІРУСІВ І ТРАНСДУКОВАНИХ ФЕТАЛЬНИХ ФІБРОБЛАСТІВ

Дослідження в якості векторних систем для потреб клітинної та генної терапії генно-інженерно модифікованих клітин організму – від ембріональних стовбурових до аутологічних пухлинних клітин є на цей час одним із стратегічних напрямків сучасної молекулярної медицини та молекулярної біології, [1,2]. При вивченні можливості застосування векторних клітин

для протипухлинної терапії після введення в організм такі векторні клітини в ідеалі мають мігрувати і активно включатися в строму пухлини, продукуючи протипухлинний агент локально. Особливо актуальною стратегія векторних клітин може бути для чинників, що проявляють системну токсичність при внутрішньовенному введенні в організм терапевтичних доз, таких як β -інтерферон [3].

Фетальні фібробласти характеризуються більш широким потенціалом в порівнянні з фібробластами дорослого організму і більш активним ростом в культурі *in vitro* і, можливо, можуть бути альтернативним мезенхімальним стовбуровим клітинам джерелом для отримання клітинних векторів. В зв'язку з цим в нашій лабораторії проводяться дослідження можливості використання культури фетальних фібробластів миші (C57Fb) в якості векторів для доставки цільових білків.

Серед великої кількості векторів та способів трансдукції клітин екзогенними генами бакуловірусна векторна система має значні переваги внаслідок відносно високої ефективності трансдукції генів в клітини ссавців та відсутності в них реплікації та цитопатогеної дії бакуловірусів. Клітини ссавців характеризуються надзвичайно широким спектром чутливості до рекомбінантних бакуловірусів. В попередніх роботах нами було показано, що фетальні фібробласти миші (C57Fb) трансдукуються рекомбінантними бакуловірусами з достатньо високою ефективністю, в залежності від дози вірусу до 75-85% [4]. В подальшій роботі ми плануємо застосовувати фетальні фібробласти, трансдуковані рекомбінантним бакуловірусом з геном β -інтерферону для інгібування розвитку пухлин і метастазів меланоми у мишей. Як відомо, злоякісна метастазуюча меланома є однією з найагресивніших пухлин людини. Мишина клітинна лінія MM4 є похідною від лінії клітин спонтанної меланоми B16. В попередніх дослідженнях нами було показано інгібуючу дію фетальних фібробластів, трансдукованих рекомбінантним бакуловірусом з геном β -інтерферона, на ріст злоякісних клітин меланоми миші в системі *in vitro* [5].

Метою даної роботи було виявлення бакуловірусних послідовностей в різних органах мишей при введенні внутрішньовенно препаратів рекомбінантних бакуловірусів та трансдукованих бакуловірусами фетальних фібробластів миші.

Матеріали і методи

Клітинні культури. Моношарову культуру клітин комах Sf21 вирощували в середовищі TC-100 (Sigma) з додаванням 10% FBS при 28°C. Інфікування клітин бакуловірусами проводили згідно стандартним процедурам [6].

В роботі використовували культуру клітин фетальних фібробластів миші C57Fb, отриману в нашій лабораторії [5]. Для одержання пухлин в організмі мишей використовували клітини меланоми MM4 (клітинна лінія

з меланоми В-16). Всі лінії клітин ссавців культивували, як описано раніше [7].

Рекомбінантні бакуловіруси і трансдукція клітин фетальних фібробластів. В роботі було застосовано рекомбінантний бакуловірус Ас-М-GFP, що містить репортерний ген *Gfp* під регуляцією касети СAG. Отримання, ампліфікація та концентрування та визначення титру рекомбінантних бакуловірусів проводили, як описано раніше[7]. Трансдукцію фетальних фібробластів проводили в оптимізованих нами попередніх умовах і аналізували на флуоресцентному мікроскопі (Микмед-2ЕС) [4,5]. Рекомбінантний бакуловірус додавали в концентрації 200 БУО на клітину. Клітини збирали через 48 годин після трансдукції, осаджали і суспендували в PBS.

Внутрішньовенне введення бакуловірусних препаратів і трансдукованих фетальних фібробластів в мишу. В роботі використовували мишей лінії С57BL/6j 3-4-х місячного віку. В кожному варіанті було досліджено по 10 мишей. Першій групі мишей робили ін'єкцію в хвостову вену по 200 мкл препарату вірусу Ас-М-GFP - 1×10^8 БУО на мишку. Паралельно другій групі мишей вводили пухлинні клітини меланоми ММ4 (2×10^5 клітин на мишу) в об'ємі 200 мкл підшкірно в праву задню лапу тварин. На 14 день після введення цих клітин робили ін'єкцію в хвостову вену по 200 мкл вірусного препарату в кількості 1×10^8 БУО на мишку. Для третьої групи мишей теж вводили пухлинні клітини меланоми, а на 14 день після введення клітин ММ4 робили ін'єкцію в хвостову вену фетальних фібробластів миші трансдукованих бакуловірусом Ас-М-GFP (2×10^5 клітин на мишу). Для всіх трьох груп тварин після 48 годин з моменту введення як рекомбінантного вірусу так і трансдукованих цим вірусом фетальних фібробластів, мишей забивали, тканини внутрішніх органів заморожували в рідкому азоті для подальшого виділення препаратів ДНК.

Виділення ДНК з тканин мишей. ДНК з клітин тканин (печінки, легень, серця, нирок, селезінки і пухлини) мишей лінії С57BL/6j виділяли набором реактивів GeneJETM Genomic DNA Purification Kit («Fermentas», Литва). Концентрацію тотальної ДНК визначали на приладі NanoDrop «Thermo Scientific», (США). Слід зазначити, що отримання тотальної ДНК звичайно проводили з 20 мг тканини і при цьому отримували залежно від проби та тканини ~ від 21 до 188 нг/мкл тотальної ДНК.

Полімеразна ланцюгова реакція. Полімеразну ланцюгову реакцію виконували на ампліфікаторі BIS Thermocycler (ООО «БИС-Н»). Праймери були синтезовані фірмою («Invitrogen», США). Для проведення ПЛР використовували Taq-полімеразу («Fermentas», Литва). Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом у 3%-му агарозному гелі. Для детекції бакуловірусної ДНК в тканинах мишей використовували двостадійний «nested» ПЛР. Для кожної ДНК було здійснено дві послідовні реакції «nested» ПЛР з використанням наступних специфічних до бакуловірусної ДНК праймерів (для генів *pif 1*, *pif 2*):

Зовнішня пара PiR1 – 5'-TGGTGAATAAGCGTCCCGATGTG-3',
118F – 5'-TACAACGCCACATCTATTCCTA-3'.

Внутрішня пара PiF1 – 5'-CTATAACGCCGACACCGAAACTCC-3',
PiR1 – 5'-TGGTGAATAAGCGTCCCGATGTG-3'.

Для двох етапів ПЛР об'єм реакційної суміші становив 30 мкл. При проведенні першої полімеразної ланцюгової реакції використовували зовнішню пару праймерів PiR1 і 118F в результаті чого отримували продукт розміром 1260 пар нуклеотидів. Для проведення другої реакції відбирали 1 мкл реакційної суміші, одержаної після першої реакції і отримували продукт розміром 234 пари нуклеотидів.

Умови проведення ПЛР: для пари PiR1 / 118F: денатурація – 94 °С, 30 с; гібридизація з матрицею – 50 °С, 25 с; елонгація – 72 °С, 1 хв 10 с, 35 циклів; для пари PiR1 / PiF1: денатурація – 94 °С, 30 с; гібридизація з матрицею – 60 °С, 25 с; елонгація – 72 °С, 20 с, 30 циклів.

Результати і обговорення

Для виявлення місць локалізації при внутрішньовенному введенні мишам рекомбінантних бакуловірусів і трансдукованих фетальних фібробластів було виділено з різних органів мишей препарати ДНК і методом ПЛР було детектовано вірусні послідовності ДНК. Попередньо було проведено дослідження для визначення часу, який являється оптимальним для виявлення вірусних послідовностей в препаратах ДНК, отриманих з органів мишей.

З даних літератури відомо, що бакуловірусна ДНК при внутрішньовенному введенні завжди виявляється в тканинах печінки і селезінки [8,9]. Ми виділяли ДНК з печінки мишей через 24 чи 48 годин після введення препаратів рекомбінантного бакуловірусу (рис.1.).

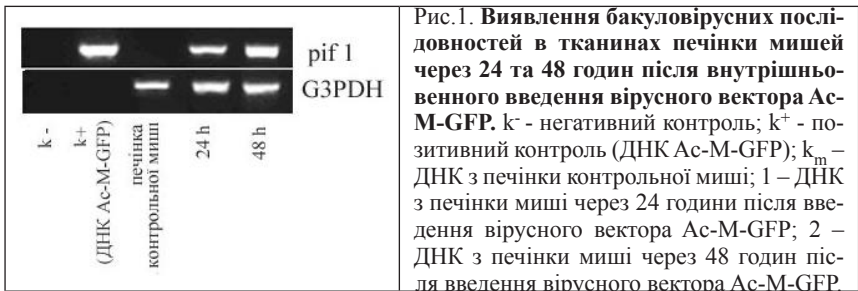


Рис.1. Виявлення бакуловірусних послідовностей в тканинах печінки мишей через 24 та 48 годин після внутрішньовенного введення вірусного вектора Ac-M-GFP. k⁻ - негативний контроль; k⁺ - позитивний контроль (ДНК Ac-M-GFP); k_m – ДНК з печінки контрольної миші; 1 – ДНК з печінки миші через 24 години після введення вірусного вектора Ac-M-GFP; 2 – ДНК з печінки миші через 48 годин після введення вірусного вектора Ac-M-GFP.

Як видно з отриманих результатів, при внутрішньовенному введенні бакуловірусні послідовності виявляються в тканинах печінки, легенів і селезінки дослідних мишей здорових і з пухлинами, що співпадає з літературними даними [8]. Крім того, ми показали наявність бакуловірусних послідовностей в нирках і в серці, що не було виявлено в інших дослідженнях [9], що ймовірно можна пояснити застосуванням нами більш чутливого

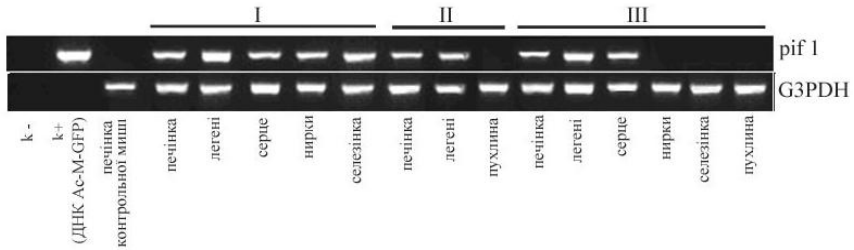


Рис.2. Виявлення бакуловірусних послідовностей в тканинах різних органів мишей через 48 годин після внутрішньовенного введення препаратів: I – рекомбінантного бакуловірусного вектора Ас-М-GFP в здорових мишей; II – рекомбінантного бакуловірусного вектора Ас-М-GFP в мишей з пухлиною; III – трансдукованих рекомбінантним бакуловірусним вектором Ас-М-GFP фетальних фіброblastів в мишей з пухлиною.

методу «nested PCR». Також було виявлено бакуловірусні послідовності в печінці, легенях і серці при введенні мишам з пухлинами фіброblastів трансдукованих рекомбінантними бакуловірусами (рис. 2.). Але не було виявлено бакуловірусних послідовностей в пухлинах ні при введенні рекомбінантних бакуловірусів, ні при введенні трансдукованих фіброblastів, хоча ми вважали, що трансдуковані фетальні ембріональні клітини будуть мігрувати до пухлин. Можливо, що кількість трансдукованих фетальних фіброblastів, які ми ін'єкуємо миші, недостатня для детекції в пухлині, яка утворюється на лапці. Але оскільки ці трансдуковані фіброblastи виявляються в клітинах легень, цілком ймовірно, що вони придатні для інгібування пухлин і метастазів меланоми, які утворюються в легенях.

Висновки

Рекомбінантні бакуловіруси з цільовими генами та ембріональні фіброblastи миші, трансдуковані бакуловірусом з екзогенним геном (наприклад, з геном бета-інтерферона), можуть бути застосовані, як засіб для доставки цільових білків до місць утворення пухлин і метастазів пухлин в системі *in vivo*.

Література

1. *Ostman A., Augsten M.* Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2009. – 19. – p. 67-73.
2. *Glick RP, Lichtor T, Panchal R, Mahendra A, Cohen EP.* Treatment with allogeneic interleukin-2 secreting fibroblasts protects against the development of malignant brain tumors // *J Neurooncol.* – 2003. – Aug-Sep. 64(1-2). – p. 139-46.
3. *Kidd S, Caldwell L, Dietrich M, Samudio I, Spaeth EL, Watson K, Shi Y, Abbruzzese J, Konopleva M, Andreeff M, Marini FC.* Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors *in vivo*, an effect countered by anti-inflammatory treatment // *Cytotherapy*, - Sep 2010 - 12(5): p. 615-625.

4. Вагина И.Н., Аноприенко О.В., Захарук Е. А., Строковская Л.И., Соломоко А.П. Эффективность доставки генов бакуловirusами в клетки млекопитающих in vitro // Biopolymers and cell – 2008. – т. 24, №6 – С. 508-512.

5. Вагина И.Н., Аноприенко О.В., Захарук Е. А., Храновская Н.Н., Скачко-ва О.В., Строковская Л.И. Влияние фетальных фибробластов, трансдуцированных рекомбинантным бакуловirusом с геном Irf- β , на пролиферацию клеток меланомы мыши in vitro // Фактори експериментальної еволюції організмів – 2011 – т.11 – с. 228 – 233.

6. King L.A., Possee R.D. The baculovirus expression system. A laboratory guide // London: Chapman and Hall, 1992. – p220.

7. Вагина И.Н., Аноприенко О.В., Захарук Е.А., Строковская Л.И., Соломоко А.П. Бакуловirusи как векторы для доставки генов в клетки млекопитающих // Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. – 2010 – випуск 2 (70) – с. 67-71.

8. Kitajama M., Abe T., Miyano-Kurosaki N., Taniguchi M., Nakayama T., Takaku H. Induction of natural killer cell-dependent antitumor immunity by the Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus // Mol. Therapy -2008.-V.16 no2,- p.261-268

9. Kim You-Kyoung, Jiang Hu-Lin, Je Yeon-Ho, Cho Myung-Haing Modification of Baculovirus for Gene Therapy // Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A. Méndez-Vilas (Ed.) – 2007 – p.875-884.

Резюме

При введенні мишам внутрішньовенно рекомбінантних бакуловirusів та трансдукованих бакуловirusами фетальних фібробластів вирусні послідовності виявляються в тканинах легенів, печінки, селезінці, серця та нирок, але не виявляються в клітинах пухлин, які утворились внаслідок підшкірного введення пухлинних клітин меланоми.

При введении мышам внутривенно рекомбинантных бакуловirusов и трансдуцированных бакуловirusами фетальных фибробластов вирусные последовательности обнаруживаются в тканях легких, печени, сердца, селезенки и почек, но не обнаруживаются в клетках опухолей, которые образовались вследствие подкожного введения клеток опухоли меланомы.

It was demonstrated that after intravenous injection of both the recombinant baculovirus and murine fetal fibroblasts transduced with a baculovirus vector, virus sequences could be detected in lung, liver, heart, spleen and kidney but could not be revealed in tumor, developed after subcutaneous injection of murine melanoma cells.

ЗІНЧЕНКО М.О., ДУБРОВНА О.В., БАВОЛ А.В.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

Вивчення закономірностей і особливостей структурно-функціональної мінливості геному рослин за дії стресових чинників вносить суттєвий

вклад у встановлення механізмів їх стійкості до несприятливих факторів довкілля. Застосування культури *in vitro* дозволяє розглядати дію стресорів на клітину в строго контрольованих умовах вирощування та надає можливість виключити складні корелятивні взаємовідносини між різними органами і тканинами й тим самим полегшити дослідження самого процесу дії стресового фактора на клітинний метаболізм.

Встановлено, що абіотичні стресори індукують мінливість та нестабільність геному в культурі *in vitro*, яка виявляються на різних рівнях досліджень – цитологічному, біохімічному, молекулярному [1-6]. На цитологічному рівні показано, що в умовах дії осмотичних речовин відбувається зниження мітотичної активності, що супроводжується значними морфологічними та цитохімічними змінами ядер та ядерець в клітинах меристеми кореня деяких видів рослин [1,7-9]. Ці зміни проявлялися в деструктуризації, гомогенізації, вакуолізації, зменшенні середніх розмірів та появі поліморфних ядер. За осмотичного стресу спостерігається значна конденсація ядер та фрагментація ДНК [10]. Крім того, гіперосмолярність також створює вторинний окислювальний стрес, який викликає надмірна кількість активних форм кисню (АФК). АФК можуть мати пошкоджуючий вплив на клітинні структури і макромолекули, особливо на ДНК, викликаючи численні ушкодження, внаслідок чого виникають делеції, мутації та інші генетичні ефекти [11-13]. Значний цитотоксичний ефект осмотиків, зокрема маніту, було встановлено при дослідженні клітин меристеми кореня рослин *Centaurea ragusina* L., які культивувалися *in vitro* [14]. Виявлено як хромосомні аберації, так і аномалії мітозу, пов'язані з порушеннями веретена поділу.

Особливості цитогенетичної мінливості калюсних культур пшениці в процесі отримання форм, стійких до абіотичних стресових чинників, досліджені не достатньо. Однак цитогенетична нестабільність при культивуванні *in vitro* може призводити як до втрати стійкості до стресорів, так і до зниження морфогенетичного потенціалу [16-18]. У зв'язку з цим, метою нашої роботи було вивчення дії різних концентрацій маніту на цитогенетичну структуру клітинних популяцій калюсних ліній м'якої пшениці.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були калюсні лінії, отримані із експлантів верхівки пагона 3-добових стерильних проростків рослин м'якої пшениці сорту Зимоярка та рослин R₂ соматональних ліній цього ж сорту, стійких до збудника офіобольозної кореневої гнилі. Для індукції калюсу використовували середовище МС [19], доповнене 2,4-Д у концентрації 2,0 мг/л. Калюси культивували при 26 °С, освітленні 3-4 клк, відносній вологості повітря 70% і 16-годинному фотоперіоді. В якості стресового чинника використовували маніт, який додавали у живильне середовище у концентраціях: 0; 0,4, 0,6, 0,8 та 1,0 М. Для того, щоб всі клітини підлягали осмотичному впливу використовували маленькі мікрокалюси (не більше 5-10 мг). Летальні та

сублетальні концентрації маніту в культурі тканин пшениці були встановлені в попередніх дослідженнях [20]. В дослідях використовували сформовані лінії 5 пасажу, які вирощували на селективних середовищах протягом пасажу.

Цитологічний аналіз проводився, виключаючи предфіксаційний вплив на мітоз, з використанням стандартної методики фіксації (етиловий спирт: оцтова кислота 3:1). Калюсні культури забарвлювали 2% оцетоорсеїном та готували тимчасові препарати за стандартною методикою [21]. Цитологічне дослідження калюсів проводили в експоненціальну фазу росту, в період найбільшої мітотичної активності, яка спостерігалася на 6-7 добу культивування. Цитогенетичний ефект дії маніту на культуру тканин пшениці визначали за зміною співвідношення клітин різного рівня плоідності та частотою структурних перебудов хромосом і аномалій мітозу. Достовірність отриманих даних визначали за критерієм Ст'юдента.

Результати і обговорення

Треба відмітити, що клітинні культури пшениці виявили схожу реакцію на осмотичний стрес, тому аналіз впливу різних концентрацій маніту на генетичну структуру клітинних популяцій приведено на прикладі калюсних ліній №7 (сорт Зимоярка) та №11 (сомаклональна лінія № 2 сорту Зимоярка). Калюсні лінії (контроль) характеризуються стабільно-гетерогенною структурою клітинної популяції, де близько 60-70% складають гексаплоїдні клітини, при наявності певного пулу (~ 12-16 %) поліплоїдних та (~ 12%) анеуплоїдних клітин і незначної кількості клітин іншого рівня плоідності (табл. 1).

Таблиця 1

Частота клітин з різним числом хромосом у калюсів на середовищах з різною концентрацією маніту

Калюсна лінія	Досліджено метафаз, шт.	Кількість клітин з числом хромосом, %			
		< 6x	6x	> 6x	анеуплоїдні
<i>0,4M маніту</i>					
№7	127	4,7±1,9	68,5±4,1	9,4±2,6	17,4±3,4
№11	134	3,7±1,6	70,9±3,9	10,4±2,6	15,0±3,1
<i>0,8M маніту</i>					
№7	86	-	51,2±5,4	17,4±4,1	31,4±5,0*
№11	98	-	61,2±4,9	19,4±4,0	19,4±4,0
<i>1,0 M маніту</i>					
№7	24	-	66,7±9,6	12,5±6,8	20,8±8,3
№11	57	-	54,3±6,6	19,4±5,2	26,3±5,8*
<i>Контроль</i>					
№7	145	4,8± 1,8	70,3±3,8	12,4±2,7	12,4±2,7
№11	137	7,9±2,3	63,5±4,1	16,8±3,2	11,8±2,8

*різниця між контролем та дослідом достовірна при $p \leq 0,05$

При перенесенні калюсів на живильні середовища з низькою концентрацією осмотика яка слабо інгібує ріст культури - 0,4М, достовірних відмінностей за числом наборів хромосом та частотою їх аберацій в клітинах контрольних та дослідних калюсних ліній не виявлено (табл. 1 та 2). Це свідчить про те, що маніт у низьких концентраціях не має вираженого цитогенетичного ефекту на калюсні культури пшениці.

Підвищення концентрації маніту до 0,8 М призводило до певних змін в генетичній структурі клітинних популяцій. У лінії №7 визначається статистично достовірне збільшення кількості анеуплоїдних клітин та частоти хромосомних аберацій, в той час як у лінії №11, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі, достовірне збільшення числа таких клітин відбулося лише за концентрації 1М, проте достовірних змін частоти структурних перебудов хромосом не виявлено. Структурні перебудови хромосом були представлені хромосомними і хроматидними мостами та фрагментами. Переважаюча більшість аберацій (80 %) виявляється в клітинах у вигляді хроматидних мостів, що свідчить про збереження в клітинних поколіннях дицентричних хромосом в результаті циклу “розрив-злиття-міст” [22]. Слід зазначити, що за частотою таких порушень між калюсами, які культивувалися на середовищах з сублетальною концентрацією маніту і контролем достовірні відмінності виявлено лише у лінії №7 (табл. 2), тоді як у лінії №11 спостерігається тенденція до її підвищення. Тобто високі концентрації маніту мають виражений кластогенний ефект лише на нестійкі клітинні лінії пшениці, в той час як у стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі клітинних ліній його не виявлено.

Таблиця 2

Частота аберацій хромосом у калюсних культур пшениці на середовищах з різною концентрацією маніту

Калюсна лінія	Кількість досліджених анафаз, шт	Кількість анафаз з порушеннями, шт.	Частота, %
<i>0,4 М маніту</i>			
№7	124	9	7,3±2,3
№11	117	7	6,0±2,2
<i>0,8М маніту</i>			
№7	93	13	14,0±3,6*
№11	88	7	8,0±2,9
<i>1,0 М маніту</i>			
№11	63	8	12,7±4,2
<i>Контроль</i>			
№7	152	7	4,6±1,7
№11	136	6	4,4±1,8

*різниця між контролем та дослідом достовірна при $p \leq 0,05$

За сублетальної концентрації маніту достовірно зростала і частота аномалій мітозу, пов'язана з порушеннями веретена поділу - від 4-5 % в контролі до 14 -19 % у досліді (табл.3). Виявлені відсталі хромосоми, багатополіусні мітози, мікроядра та злипання хромосом.

Таблиця 3

Частота виникнення турбагенних ефектів та аномалій хроматину в мітотичних клітинах калюсних культур пшениці на середовищах з різним вмістом маніту*

Лінія	Концентрація маніту, %	Кількість клітин з аномалією мітозу, (в % від мітотичних клітин)	З них, % :			
			Відставання хромосом	Мультиполлярні мітози	Злипання хромосом	Мікроядра
№7	0	4,5±1,5	1,0 ±0,7	1,5 ±0,9	1,0 ±0,7	1,0 ±0,7
	0,4М	8,5±1,9	1,5 ±0,9	2,0±1,0	3,0±1,2	2,0±1,0
	0,8М	19,5±2,8**	2,5±1,1	7,0±1,8**	6,5 ±1,7 **	3,5±1,3
№11	0	5,0±1,5	1,5 ±0,9	1,0±0,7	1,0±0,7	1,5 ±0,9
	0,4М	7,0±1,8	1,0±1,0	2,5±1,1	2,5±1,1	1,0±1,0
	0,8М	14,5±2,5	3,0±1,5	4,0±1,4	5,0±1,5**	2,5±1,1

*Кількість досліджених мітотичних клітин складала 200 на варіант; ** Різниця між контролем та дослідом достовірна при $p \leq 0,05$

Треба відмітити, що на середовищах з високою концентрацією осмотика спостерігалось достовірно збільшення числа багатополіусних мітозів у лінії №7, в той час як у лінії №11 суттєвих відмінностей не виявлено. Відомо, що така аномалія клітинного поділу є проявом сильної антимиототрибочкової дії токсичних сполук [23]. Отримані результати свідчать, що сублетальна концентрація маніту викликає турбагенні порушення в клітинах нестійких калюсних культур пшениці.

На стадії інтерфази з частотою 2,5-3,5 % зустрічалися клітини з мікроядрами. Вони можуть утворюватися внаслідок виходу з мітозу клітин з відставанням хромосом, що наряду з багатополіусними мітозами обумовлює можливість розвитку анеуплоїдії. Крім того, наявність мікроядер служить індикатором початку патологічних процесів і нестабільності геному [24].

Поряд з мікроядрами, за сублетальної концентрації осмотика, у стійких та нестійких калюсних ліній пшениці відзначено достовірно підвищення частоти злипання хромосом. Кількість таких порушень була більша в 5-6 разів порівняно з контролем, тобто ця аномальність хроматину була найбільш виражена цитогенетичним ефектом дії маніту. Виявлено як злипання хромосом аж до повної аглютинації хроматину, так і множинне злипання у вигляді комків, тобто клампінг хромосом. Слід зазначити, що підвищена липкість хромосом також може індукувати липкі мости в анафазі, що робить неможливим нормальний цитокінез. Дана аномалія розглядається як загальна ознака токсичного впливу на хромосоми, яка несумісна з життєздатністю клітин та призводить до їх загибелі [23].

В присутності летальної для калюсних культур пшениці концентрації маніту 1М не виявлено мутагенного ефекту. Це може бути пов'язане з тим, що мітози спостерігалися тільки на перших днях пасажу і ділилися лише ті клітини, які у вихідній тканині пройшли стадії G₁ та S і вже були підготовлені до поділу. На середовищах з летальною дозою осмотика починаючи з третьої - п'ятої доби росту спостерігається поява клітин із лопатевими ядрами, злипанням хромосом та мікроядрами. При подальшому культивуванні калюси чорніли та відмирили. Треба відмітити, що такі аномалії мітозу та зони некрозу виявлялися і у калюсних культур на середовищах з сублетальною дозою маніту, проте вони спостерігалися значно пізніше, в основному, починаючи з 10-15 доби пасажу.

Підсумовуючи, слід зазначити, що нами виявлений цитогенетичний ефект дії маніту в культурі тканин м'якої пшениці. Сублетальні концентрації осмотика викликають зміни рівня плоідності клітин калюсних ліній, що виявляється достовірним збільшенням числа анеуплоїдних клітин. Показано, що високі концентрації маніту мають виражений кластогенний ефект лише на нестійкі клітинні лінії пшениці. Злипання хромосом було найбільш вираженим цитогенетичним ефектом дії цього стресового чинника на калюсні культури пшениці. Встановлено, що сублетальна концентрація маніту викликає турбагенні порушення в клітинах нестійких калюсів.

Робота була виконана в рамках наукового проекту цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України „Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”.

Література

1. *Yumurtaci A., Aydin Y., Uncuoglu A.* Cytological changes in Turkish durum and bread wheat genotypes in response to salt stress // *Acta Biologica Hungarica* .– 2009.– V. 60, N 2 .– P.221-232.
2. *Badawi G., Yamauchi Y., Shimada E., Sasaki R., Kawano N., Tanaka K.* Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxidizedismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts.// *Plant Science*.– 2004.– v. 166.– P. 919-928.
3. *Errabii T., Bernard C., Gandonou C., Essalmani H., Abrini J., Idaomar M., Skali-Senhaji N.* Effects of NaCl and mannitol induced stress on sugarcane (*Saccharum* sp.) callus cultures // *Acta Physiologiae Plantarum* .– 2007.– v.29.– P. 95-102.
4. *Zhang J., Kirkham M.* Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species// *Plant Cell Physiology*.– 1994.– v. 35.– P. 785-791.
5. *Garcia A, Dalton S., Humphreys M.* Reproductive disturbances and phosphoglucosyltransferase instability in *Festuca arundinacea* (tall fescue) plants regenerated from callus and cell suspension cultures// *Heredity* .–1994.– v.75.– P. 355-362.
6. *Тищенко Е.Н. Михальская С.И., Сергеева Л.Е.* Нестабильность RAPD-ампликонов сои при клеточной селекции на устойчивость к оксианиону вольфрама и ванадия // *Зб. наук. праць “Фактори експериментальної еволюції організмів”*. – К.: Логос.– 2008. - Том 4. - С. 205 – 210.
7. *Echenique G.V., Curvetto N.R.* Effect of water stress upon cell division in root tips of *Eragrostis carvula* // *Biologia Plantarum*.–1990.– v. 32, N 2, - P.153-160

8. Hasegawa P., Bressan R., Handa S., Handa A. Cellular mechanisms of tolerance to water stress // Hort Science. – 1984. – v.19. – P.371-377.

9. Munns R. Comparative physiology of salt and water stress // Plant Cell Environ.– 2002. – v. 25. – P. 239–250.

10. Xiong L., Zhu J.–K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress // Plant Cell Environ.– 2002. – v. 25. – P. 131–139.

11. Imlay J.A., Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity // Science.– 1986.– v.240.– P. 1302–1309.

12. Dat J., Vandenabeele S., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses // Cell. Mol. Life Sci. - 2000. v. 57.– P. 779–795.

13. Kultz D., Chakravarty D. Hyperosmolarity in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells // Proc. Natl. Acad. Sci.– 2001.– v. 98.– P.1999–2004.

14. Radic S., Prolic M., Pavlica M., Pevalek-Kozlina B. Cytogenetic effects of osmotic stress on the root meristem cells of *Centaurea ragusina* L.// Environmental and Experimental Botany. – 2005.– v. 54.– P. 213–218

15. Fiskesj O. Allium test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. In: Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), Plants for Environmental Studies. Lewis Publishers, New York.– 1997. – P. 308–333.

16. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чугункова Т.В. Отбор и сравнительный анализ устойчивых к солевому стрессу каллусных культур кормовой свеклы, полученных из эксплантов различной плоидности // Физиология и биохимия культ. растений.–2000.–32, №5.–С. 362-368.

17. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чугункова Т.В. Клеточная селекция кормовой свеклы на устойчивость к нескольким стрессовым факторам // Биополимеры и клетка. –2002.– Т.18, № 3. – С. 565-571.

18. Михальская С.И., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Цитогенетический анализ клеточной линии сои, устойчивой к оксианионам вольфрама // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т.42. № 2. – С. 125-131.

19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Planta. – 1962. – 15. – P.473-497.

20. Дубровна О.В., Бавол А. В., Зінченко М.О., Лялько І.І., Круглова Н.М. Вплив осмотичних речовин на калюсні лінії м'якої пшениці, стійкі до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici* // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2011, Т.9, №1.– С.10-16.

21. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений.– М.: Колос, 1980.– С.168-170.

22. Кунах В.А. Особенности структурного мутагенеза в популяциях культивируемых клеток растений // Успехи соврем. генетики.– М.: Наука, 1984.– Вып.12.– С.30-62.

23. Fiskesjo G. In vitro toxicity testing protokol. – Humana Press, Totowa, NJ.–1995.– P.119-127.

24. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Бочаров Е.А. Иммуниет и цитогенетическая нестабильность. – Томск.: Изд-во Томского университета, 1986. – 223 с.

Резюме

Досліджені цитогенетичні особливості стійких та нестійких до метаболітів збудника офіобользної кореневої гнилі калюсних культур пшениці за дії осмотич-

ного стресу. Показано, що сублетальні концентрації маніту викликають достовірне збільшення числа анеуплоїдних клітин. Найбільш вираженим цитогенетичним ефектом дії осмотика на калюсні культури пшениці є злипання хромосом. Встановлено, що високі концентрації стресового чинника мають виражений кластогенний ефект та викликають турбагенні порушення в клітинах нестійких калюсів.

Исследованы цитогенетические особенности устойчивых и неустойчивых к метаболитам возбудителя офиоболлезной гнили каллусных культур пшеницы при действии осмотического стресса. Показано, что сублетальные концентрации маннита вызывают достоверное увеличение числа анеуплоидных клеток. Наиболее выраженным цитогенетическим эффектом действия осмотика на каллусные культуры пшеницы является слипание хромосом. Установлено, что высокие концентрации стрессового фактора имеют выраженный кластогенный эффект и вызывают турбагенные нарушения в клетках неустойчивых каллусов.

The cytogenetic characteristics of resistant and unresistant to metabolites of take-all root rot pathogen callus cultures of wheat under the influence of osmotic stress has been investigated. It is shown that sublethal concentrations of mannitol causing a significant increase in the number of aneuploid cells. The most pronounced cytogenetic effect of the osmotic agent on the callus culture of wheat is sticking chromosomes. It is established that high concentrations of stress factors have a significant clastogene effect and cause turbagene disorders in cells of unresistant calluses.

КАМЕНЧУК О.П., БОБИК Л.В., КУРЧІЙ Б.О.

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
вул. Васильківська 31/17, 03022 Київ, Україна*

СИНТЕЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ГРИБАМИ РОДУ *ACREMONIUM SPP.*

Серед стероїдних сполук рослинного походження брасиностероїди являються важливим класом природних регуляторів росту у вищих і нижчих рослинах. Брасиностероїди – стероїдні гормони, які впливають на ростові процеси вегетативних органів рослин, фотосинтетичну активність, старіння, проростання насіння, фотоморфогенез, цвітіння і захисні реакції за дії біотичних і абіотичних факторів. Як для брасиноїд-дефіцитних, так і нечутливих мутантних рослин також характерний широкий спектр фенотипічних реакцій: карликовість, зміна форми листка, затримка цвітіння, порушення фертильності і фотоморфогенезу тощо [3].

Брасиностероїди присутні в рослинах в дуже малих концентраціях. Кількісний вміст цих біорегуляторів визначається типом тканини і ступенем її диференціації. Тканини з активним ростом містять значно більші кількості брасиностероїдів в порівнянні із диференційованими [6].

Отримання і використання в практиці рослинництва природних гормональних сполук являється актуальною задачею, особливо в зв'язку із абіотичними стресами, котрі відбуваються періодично в останні десятиліття (вітряні бурі, паводки, посухи та інші кліматичні аномалії). Брасиностерої-

ди набувають також широкого практичного застосування в рослинництві і біотехнологічних процесах. Так, зокрема, препарат «Епин» (основна діюча речовина 24-епібрасинолід) являється ефективним імунomodулятором, підвищує стійкість рослин до стресів і фітопатогенів [2, 3].

Серед природних джерел гормональних сполук особливе місце належить нижчим грибам. Наприклад, широка біологічна активність женьшеню зумовлена не тільки сполуками, синтезованими самою рослиною, а також специфічною асоціацією мікроорганізмів кореневої системи, серед яких виявлено і гриби роду *Acremonium spp.* [7].

В задачу наших досліджень входило дослідити вміст брасиностероїдів, а також інших природних фітогормонів в культуральному середовищі вирощування і міцелії гриба *Acremonium spp.*, який входить в склад асоціації мікроорганізмів ризосфери женьшеня.

Матеріал і методи

Гриб *Acremonium spp.* вирощували протягом 21 доби при кімнатній температурі в рідкому органічному (натуральному) і мінеральному (синтетичному) культуральних середовищах в скляних флаконах (матрацах) при 12-ти годинному світловому режимі (4 люмінесцентні лампи по 40 вт).

В склад органічного середовища для культивування грибів включено (г/л води, рН 6,8-7,0): глюкоза -20,0, соєве борошно -12,0, дріжджовий автолізат -3,0, кукурудзяний екстракт -3,0, CaCO_3 -4,5, K_2HPO_4 -0,3.

В склад синтетичного середовища включено (мг/л води, рН 6,8-7,0): K_2HPO_4 -600, KH_2PO_4 -1800, MgSO_4 -400, K_2SO_4 -200, FeSO_4 -4, MnSO_4 -4, аспарагін -0,02, КJ -0,02, вітамін B_1 -1, вітамін B_6 -2, вітамін PP -2, MES 2260 -4520, D-інозитол -100, D-глюкоза -16, пектин -2000, гіберелова кислота -0,003, КОН, 5M -3 краплі.

Екстракцію речовин із міцелію гриба проводили 80%-ним метанолом, культуральну рідину випаровували під вакуумом при +45°C.

Очищення фітогормонів для рідинної хроматографії високого тиску (HPLC) проводили хроматографією на пластинках [1]. Кількісне і якісне визначення брасиностероїдів, абсцизової, гіберелінової і індолілоцтової кислот здійснили методом ефективної рідинної хроматографії високого тиску на хроматографі Agilent 2000, порівнюючи речовини із стандартами (Sigma). Колонка C18, рухома фаза метанол:вода (80:20).

Результати і обговорення

Нами досліджено вміст речовин в міцелії гриба при екстракції різними екстрагентами: етанол, хлороформ, етилацетат, етиловий ефір, пропаном, бутанол, метанол і ацетонітрил. Виявлено, що найменша кількість речовин була в варіанті при екстракції 80%-ним етанолом, а найбільша – 80%-ним метанолом (рисунок). В інших розчинниках було по декілька речовин невідомої природи, тому в подальшій роботі цими розчинниками ми не користувались. Таким чином, встановлено, що стероїдні сполуки найменше розчинні в етанолі. Це було підтверджено також і при розчиненні стандарт-

інших брасиностероїдів. Попередниками у синтезі брасиностероїдів є ряд сполук, серед яких кампестерол є найближчим попередником [5]. В міцелії гриба містилось майже на порядок більше речовин стероїдного класу. В абсолютних значеннях більша кількість регуляторів росту була при вирощуванні гриба на органічному середовищі. Вирощування гриба на мінеральному середовищі також супроводжувалось накопиченням значної кількості стероїдних сполук. Треба зазначити, що при тривалому (1,5-2 роки) культивуванні гриба його здатність синтезувати регулятори росту різко зменшується, що потребує нового виділення грибу із ризосфери женьшеня для введення в культуру.

Зроблено також важливий висновок із хроматографічних аналізів: при розчиненні в метанолі (100%) і в 80%-них водних розчинах етанолу, чи метанолу 24-епібрасинолід через 4 дні (навіть при зберіганні в холодильнику при -20°C) окислювався з утворення нових двох сполук невідомої природи. Таким чином, є сумніви в тому, що в розчинах препаратів, розрекламованих для застосування в сільському господарстві і біотехнологічних процесах, знаходиться 24-епібрасинолід. Стероїдні (брасиностероїдні) сполуки з фізіологічної точки зору являються ефективними антиоксидантами [4], тому легко окисляються і це значить, що в розчинах уже знаходяться не вихідні сполуки, а їх похідні, а отже і біологічна дія цих сполук буде іншою.

Вміст фітогормонів, що продукуються грибом роду *Acremonium spp.* представлено в таблиці 2. Як і в досліді із визначенням стероїдів в міцелії гриба містилось значно більше гіберелової, абсцизової і індолілоцтової кислот. Інші природні регулятори були в дуже малих кількостях (дані в таблиці не наведені).

Таблиця 2.

Вміст речовин в культуральному середовищі і міцелії гриба *Acremonium spp.*

Варіанти		Вміст в культуральній рідині, нг в 1 мл	Вміст в міцелії гриба, нг в 1 мг сирової речовини
Культуральне середовище (органічне)	Гіберелова кислота (ГК ₃)	0,082±0,0052	0,41±0,025
	Абсцизова кислота	0,00041±0,000041	0,0063±0,00025
	Індолілоцтова кислота	0,0043±0,00011	0,073±0,0051
Культуральне середовище (мінеральне)	Гіберелова кислота (ГК ₃)	0,025±0,0072	0,52±0,017
	Абсцизова кислота	0,00015±0,000022	0,0021±0,00019
	Індолілоцтова кислота	0,0013±0,00011	0,071±0,0043

Як видно із рисунка в екстрактах із міцелія гриба виявлено більше 20 речовин. Проте за відсутності стандартних зразків ми не змогли їх визначити. Крім того, культуральні рідини і міцелії грибів різних сезонних періодів культивування (дані не наведені) відрізняються як за наявністю біологічно активних речовин, так і за їх кількісним вмістом, що потребує постійного хроматографічного моніторингу.

Висновки

Біологічна активність гриба *Acremonium spp* в значній мірі може бути зумовлена, синтезованими ним стероїдними сполуками (24-епібрасинолід, ергостеролу і холестеролу), а також гіберелінової, абсцизової і індолілоцтової кислот. В етаноло-водних розчинах дані сполуки не розчинні, повністю розчинні тільки в метаноло-водних розчинах. В спиртово-водних розчинах 24-епібрасинолід розкладається, тому зберігати його можна тільки в сухому порошкоподібному стані.

Література

1. Савинский С.В., Драгозов И.В., Педченко В.К. Определение содержания зетина, индоллил-3-уксусной и абсцизової кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений. – 1991. – **23**, №6. – С. 606–614.
2. Khripach V. A., Zhabinskii, V. N., Khripach N. B. // Brassinosteroids / S.Hayat; A.Ahmad Eds. – Kluwer Academic Publishers, 2003. – P.189–230.
3. Khripach V.A., Zhabinskii V.N., Malevannaya N.N. Recent advances in brassinosteroids study and application // Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America. – 1997. – **24**. – P.101–106.
4. Kurchii B.A. (2008) What happens to plants during oxidative stress? // Матеріали міжнародної наукової конференції “Регуляція росту і розвитку рослин; фізіолого-біохімічні і генетичні аспекти”, жовтень 13-15, 2008, Харків (Україна). – С.90-92.
5. Sakurai A. Brassinosteroid biosynthesis // Plant Physiol. Biochem. – 1999. – **37**. – P.351-361.
6. Takasuto S. Brassinosteroids: distribution in plants, bioassay and microanalysis by gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. – 1994. – **658**. – P.3-15.
7. Yoo S-H., Kim B-Y., Weon H-Y. et al. Burkholderia soli sp. nov., isolated from soil cultivated with Korean ginseng // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – **7**. – P.122-125.

Резюме

In this report it is presented evidence on the presence of steroid substances (24-epibrassinolide, ergosterol and cholesterol) and also gibberellic, indolylacetic and abscisic acids in the milieu of cultivation and in mycelia of *Acremonium sp. fungi*. It is found, that 24-epibrassinolide in methanol and its aqueous solution after 4 days stored was destructed with formation of two unknown substances.

В этом сообщении представлены данные о наличии стероидных соединений (24-эпібрасинолида, ергостерола и холестерола), а также гібереллової, індолілукусної і абсцизової кислот в среде культивирования и мицелии гриба *Acremonium spp*. Установлено, что 24-эпібрасинолід в метаноле и его водном растворе через 4 дня распался с образованием двух неизвестных соединений.

В цьому повідомленні представлено дані про наявність стероїдних сполук (24-епібрасинолід, ергостеролу і холестеролу), а також гіберелінової, індолілоцтової і абсцизової кислот в середовищі культивування і мицелії гриба *Acremonium spp*. Встановлено, що 24-епібрасинолід в метанолі і його водному розчині через 4 дні розкладався з утворенням двох невідомих сполук.

**КАРПЕЧЕНКО К.А., ВЕПРИНЦЕВ В.Н., КОНДРАТЬЕВА А.М.,
КАРПЕЧЕНКО И.Ю., ЗЕМЛЯНУХИНА О.А., КАРПЕЧЕНКО Н.А.**

ФГУП «НИИ лесной генетики и селекции» (НИИЛГиС),

Россия, 394087, Воронеж, ул.Ломоносова, 105, e-mail: leo-silva@rambler.ru

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* КИЗИЛЬНИКА ДАММЕРА (*COTONEASTER DAMMERII* С.К. SCHNEID).



Рисунок 1. Кизильник Даммера

Кизильник Даммера (*Cotoneaster Dammerii*) – высокодекоративное растение, относится к семейству розоцветных (*Rosaceae*). Образует невысокие, 10 - 20 см, стелющиеся кусты до 1,5 м, цветущие в весенний период не крупными, но довольно красивыми беловато-розовыми цветками, являющимися кроме того, хорошим медоносом, к осени на побегах образуются красные ягоды (рис. 1). В природе растет в горах Центрального Китая. В культуре известен с 1900 г. [4].

Материалы и методы

Материал для введения в культуру *in vitro*, ветви кизильника, брали в осенний период в Ботаническом саду ВГУ им. проф. Б. М. Козо-Полянского. Типом первичного экспланта был выбран стеблевой сегмент, содержащий пазушную или апикальную почку (рис. 2).

Стерилизацию исходного материала проводили следующим образом: побеги тщательно мыли под проточной водой мягкой губкой с бытовым моющим средством для посуды, затем с кизильника, так как он – вечнозеленое растение, срезали листья на половину длины. После этого ветви нарезали на сегменты, удобные для следующих стадий. Полученные таким образом участки стебля с междоузлиями помещали в стеклянную емкость, заливали водопроводной водой, добавляли каплю бытового моющего средства, накрывали марлей и качали на качалке 10 мин. После этого материал на 20 мин ставили под проточную воду, не снимая марли. По истечении этого времени в емкость с побегами заливали дистиллированную воду и снова качали 10 мин. Следующие этапы проводили в стерильных условиях: материал обрабатывали стерилизующими растворами, после чего по 5 мин троекратно отмы-



Рисунок 2. Первичный эксплант с регенерантом из почки

вали в стерильной дистиллированной воде на качалке. Поскольку кизильник Даммера – вечнозеленое растение, осенний материал сильно инфицирован. Для обеззараживания первичных эксплантов поверхностную стерилизацию проводили двумя способами. В первом случае материал помещали на 15 мин в раствор отбеливателя «Белизна» в стерильной дистиллированной воде в соотношении 1 : 3, соответственно. Второй способ отличается тем, что использовали 4% раствор «Белизны», содержащий 0,04% мертиолята и стерилизовали 20 мин.

После завершения этапа обеззараживания побеги в ламинаре нарезали на стеблевые сегменты с одной пазушной почкой и помещали в пенициллиновые пузырьки на питательную среду WPM, половинную по макросолевному составу (1/2 WPM) с добавлением 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л гибберелловой кислоты (ГАЗ₃).

Для поддержания и мультипликации кизильника в пробирочной культуре использовали среду 1/2 WPM с добавлением 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГАЗ₃ или половинную по макросолевному составу среду Мурасиге и Скуга (1/2 MS) [5]. Для корнеобразования экспланты помещали на среду 1/2 WPM, дополненную а) 3 мг/л ИУК, б) 5 мг/л ИУК.

У многих эксплантов на базальной части побега развивалась эндогенная инфекция, от которой в некоторых случаях невозможно полностью избавиться при первичной стерилизации. Для сохранения материала срезали верхнюю часть растущего побега и сажали на среду прежнего состава. Это позволяло выращивать растения из стерильной области меристемы экспланта.

Результаты и обсуждение

Материал для введения кизильника Даммера в стерильную пробирочную культуру *in vitro* брали в осенний период, что отчасти объясняет трудности с избавлением от инфекции при стерилизации. Исходные растения растут на территории ботанического сада ВГУ в открытом грунте.

Были испробованы два варианта обеззараживания первичных эксплантов. Результаты показали, что 7% растений, обработанных стерилизующим раствором, содержащим только «Белизну» в высокой концентрации (30%), сохранились в культуре после двух недель культивирования. Во втором случае (4%) процент оставшихся незараженных эксплантов составил 69%. Таким образом, меньшая концентрация хлорсодержащего агента и мертиолята в обеззараживающем растворе способствуют лучшему избавлению от инфекции.

В качестве первичного экспланта использовали узловой сегмент с одной или двумя почками. На начальном этапе нужно было добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Для образования регенерантов все экспланты при введении помещали на половинную по макросолевному составу среду WPM с добавлением 0,2 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л гибберелловой кислоты. Для избавления от эндогенной инфекции, проявлявшейся в ба-

зальной части многих первичных эксплантов срезали регенерант, выросший из меристемы почки, и переносили на питательную среду того же состава. Чтобы не допустить высыхания среды и из-за накопления продуктов жизнедеятельности вокруг погруженной части, экспланты каждую неделю пересаживали на свежие среды.

Было замечено, что при помещении побегов на 1/2 WPM с добавлением 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГА₃, шло развитие адвентивных медленнорастущих побегов, а на 1/2 MS без гормонов происходил активный рост апикальной меристемы одного из побегов экспланта, что приводило к образованию довольно высокого растения с хорошо развитыми листьями и слабым ветвлением (рис. 3).

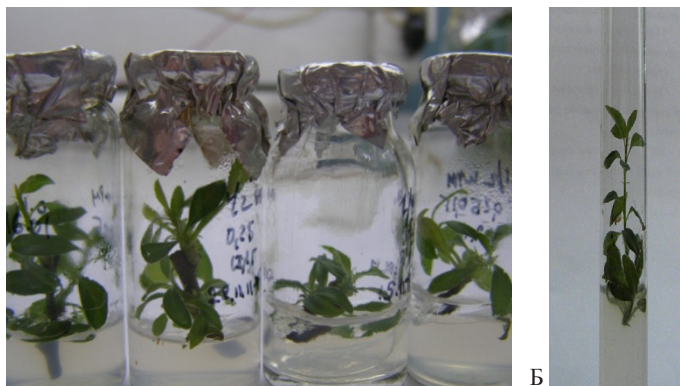


Рисунок 3. Экспланты кизильника Даммера: А – образование множественных побегов, Б – рост единичного побега

После трех недель депонирования на описанных средах мы получили достаточное количество эксплантов для отработки следующего этапа. Часть растений была пересажена на среды, отличающиеся от исходных гормональным составом: 1/2 WPM + 3 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) и 1/2 WPM + 5 ИУК. Через две недели у 5% побегов первого и 30% второго варианта образовались и развились корни (рис. 4).

Укоренившиеся растения *in vitro* были переведены в условия *in vivo*, культуры закрытого грунта: посажены в прозрачные пластиковые контейнеры с песком, прогретым в микроволновой печи 30 мин (рис. 4).

На этом этапе происходят многие изменения: переход растений с гетеротрофного на автотрофное питание, развитие устьичного аппарата, адаптация к более сухому воздуху, перепаду температур, утолщение кутикулы и т.п. Это необходимо для пробирочных растений перед использованием их в условиях открытого грунта.

После того, как растения адаптировались к почвенным условиям, их пересаживали в почвосмесь следующего состава: 1 объемная часть чер-

нозема, 4 части песка, 4 части нейтрализованного верхового торфа. Готовность растения для перевода из песка в грунт определяли по росту темно-зеленых листьев, изменению цвета побега на более темный с красноватым и развитию крепкой корневой системы, они закаляются (рис. 5).



А

Б

В

Рисунок 4. Перевод растений кизильника Даммера из культуры *in vitro* в условия закрытого грунта: А – корнеобразование у эксплантов на среде с ИУК, Б – растение перед посадкой в песок, В – адаптация к тепличным условиям



А

Б

В

Рисунок 5. Перевод адаптированного растения кизильника Даммера в горшечную культуру: А – растение, адаптированное в песке, Б – общий вид адаптированного растения, В – растение в горшке с почвенной смесью

Выводы

Кизильник Даммера – декоративное вечнозеленое растение, эндемик гор центрального Китая, имеет широкое применение в декоративном озеленении. Нами была подобрана методика стерилизации исходного растительного материала, получены растения *in vitro* и выяснены среды, наиболее подходящие для поддержания, множественной мультипликации и корнеобразования в стерильной пробирочной культуре. Выяснено, что для индукции корнеобразования необходимо довольно высокое содержание ауксина β -индолилуксусной кислоты - фитогормона (5 мг/л), стимулятора роста

растений. Укоренившиеся *in vitro* растения успешно адаптированы в закрытом грунте, переведены в горшечную культуру и могут быть использованы для высадки в питомники, на открытые земельные участки.

Литература

1. Гревцова А.Т., Н.А. Казанская. Кизильники в Украине. - Киев: «Нива», 1997. 192 с.
2. Курбанов М.Р. Качество семян кизильников, интродуцированных на Апшероне // Биология семян, интродуцированных растений - Наука, 1985. - С. 45-49.
3. Пояркова А.И. *Cotoneaster Medic.* // Флора Узбекистана. – Ташкент: Изд-во АН УзССР, 1955. - Т.3. - С.265-267.
4. Пояркова А.И. Новые виды кизильника для флоры Советского Союза и Китая // Ботанические материалы Гербария Ботанического института им. В.Л.Комарова АН СССР.– Л., 1961. - Т. 21. - С.161-205.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. // *Physiol. Plant.* 1962. - V.15. - P. 473-497.
6. Sayed, S. *Sawsan and El-Karim, G. Seham* . Propagation of *Cotoneaster horizontalis*, Decne through *in vitro* culture. // *Annals of Aric. Sc.*, Moshtohor. - 2007. V.45, N 2. - P.761-772.

Резюме

Подобраны условия введения в культуру *in vitro* кизильника Даммера. Разработана методика депонирования и мультипликации растений в стерильной пробирочной культуре, а также корнеобразование и их адаптация к почвенным условиям. Полученные растения нормально растут, имеют хорошо развитые побеги с листьями, корневую часть и могут быть использованы в открытом грунте.

Підібрані умови введення в культуру *in vitro* кизильника Даммера. Розроблена методика депонування та мультиплікації рослин у стерильній пробірочній культурі, а також коренеутворення і їх адаптації до ґрунтових умов. Одержані рослини нормально ростуть, мають добре розвинені пагони з листями, кореневу систему і можуть бути використані у відкритому ґрунті.

КВАСКО Е. Ю., МАТВЕЕВА Н. А., ШАХОВСКИЙ А. М.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Украина, 03680, ул. Заболотного, 148, e-mail: kvasko.olena@gmail.com

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНДИВИИ *CICHORIUM ENDIVIA* L. ВЕКТОРАМИ С ГЕНОМ ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2B$ ЧЕЛОВЕКА

Эндивий (*Cichorium endivia* L.) – растение семейства Compositae, встречающееся в Европе, Восточной Азии, Северной Америке [1]. Это лекарственное растение, обладающее гепатопротекторными [2], антидиабетическими [3] свойствами, имеет высокое содержание антиоксидантов [4], а также является ценным пищевым продуктом с высоким содержанием диетических волокон, калия, витамина С [5]. Растения этого вида могут быть

объектами генетической трансформации, поскольку перенесение в геном эндивия генов, кодирующих синтез биологически активных соединений, дает возможность расширить спектр его лекарственных свойств.

Актуальным направлением современной биотехнологии является создание трансгенных растений с генами фармацевтически ценных белков, в том числе с иммуномодулирующими свойствами. Одним из таких белков является интерферон – цитокин, который синтезируется клетками иммунной системы в ответ на вирусную инфекцию. α -интерферон повышает фагоцитарную активность макрофагов и функцию цитотоксических Т-лимфоцитов, способствует лизису инфицированных клеток, замедляет развитие вирусных инфекций, угнетает пролиферацию клеток, потенциально являясь противоопухолевым средством [6].

Бактерии рода *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*) способны инфицировать двудольные растения и при этом переносить часть своей генетической информации в их геном. На этом основан один из методов получения растений с трансформированным геномом – *Agrobacterium*-опосредованная трансформация [7]. С помощью этого метода при использовании векторных конструкций с генами, кодирующими представляющие интерес для сельского хозяйства и фармакологии признаки, можно получить трансгенные растения с новыми свойствами.

Целью данной работы было получение растений эндивия с геном интерферона- $\alpha 2b$ с использованием *A. tumefaciens*.

Материалы и методы

Для трансформации использовали семядольные экспланты асептических растений *C. endivia* L var *latifolium* Lam, полученных путем поверхностной стерилизации семян [8]. Экспланты с предварительно сделанными насечками кокультивировали с суспензией *A. tumefaciens* (штамм GV3101) с векторными конструкциями pCB124 (гены интерферона- $\alpha 2b$ *inf- $\alpha 2b$* и неомизинфосотрансферазы II *npt II*) и pCB125 (ген *inf- $\alpha 2b$* и ген устойчивости к бифосфосодержащим гербицидам *bar*) [9] в течение 30 мин. После этого экспланты переносили на среду Мурасиге и Скуга [10] с 2,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты без антибиотиков для регенерации растений. После культивирования на этой среде в течение 2 суток к среде для регенерации добавляли 600 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерии. Через 15 суток экспланты переносили на среду с 2 мг/л гербицида Баста или 10 мг/л антибиотика канамицина (при трансформации векторами pCB125 и pCB124 соответственно). Частоту трансформации определяли как отношение количества эксплантов, на которых образовались зеленые побеги на селективной среде, к общему количеству эксплантов в процентах. Эффективность регенерации подсчитывали как среднее количество зеленых растений на эксплант.

Геномную ДНК выделяли из зеленых листьев стерильных растений ЦТАБ методом [11]. ПЦР-амплификацию геномной ДНК проводили

на амплификаторе Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) с термостатированной крышкой в пробирках с ультратонкими стенками. Реакционная смесь (20 мкл) содержала однократный ПЦР-буфер с сульфатом аммония, 0,2 мкМ соответствующих праймеров (табл.), 200 мкМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 0,5 ед. Taq-полимеразы, 10-50 нг ДНК-пробы. Условия амплификации: первичная денатурация – 94 °С, 3 мин, 30 циклов амплификации (94°С, 30 сек.– 60°С, 30 сек.– 72°С), окончательная полимеризация - 72°С, 5 мин.

Таблица.

Праймеры, используемые для подтверждения присутствия генов *bar*, *nptII* и *ifn-a2b*

Ген	Праймеры	Размер амплифицированного фрагмента, п.н.
<i>bar</i>	5'- ggaattcatgagcggagaattaaggag-3' 5'-cagatctcggtgacgggcaggac-3'	910
<i>nptII</i>	5'- cctgaatgaactccaggacaggca-3' 5'- gctctagatccagagtcctcagaag-3'	622
<i>ifn-a2b</i>	5'-ctctctgctgaaggacag-3' 5'-ggagtcctcctcatcag-3'	264

Результаты и обсуждения

При использовании вектора pCB125 через 5 дней после трансформации в местах надразов на экплантах эндивия формировалась каллусная ткань. После перенесения экплантов на селективную среду (Баста, 2 мг/л) регенерации растений не наблюдалось. Для получения побегов зеленые участки каллусной ткани переносили на среду того же состава, но без селективного агента. При таких условиях через 56 суток после трансформации наблюдалась регенерация зеленых побегов, которые дальше культивировали на селективной среде для отбора устойчивых к гербициду Баста растений. При таких условиях частота регенерации зеленых растений составила 20 %, эффективность – 5 растений на экплант.

Полученные зеленые растения проанализированы с помощью ПЦР на наличие генов *bar* и *inf-a2b*. Во всех отобранных на селективной среде зеленых растениях показано присутствие как селективного, так и целевого генов (рис. 1).

Выбранные условия селекции трансгенных растений, устойчивых к Баста, оказались эффективными и могут быть использованы для получения эндивия с геном *bar*.

При использовании векторной конструкции pCB124 (селективный ген *nptII*) растений получить не удалось. При перенесении экплантов эндивия на среду, содержащую селективный антибиотик канамицин, наблюдалась 100 % гибель экплантов. Возможно, причиной неудачи может быть высокая чувствительность растений эндивия к канамицину, что делает невозмож-

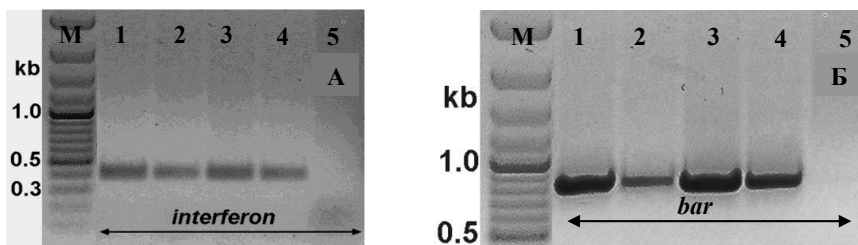


Рис. 1. Результаты ПЦР-анализа зеленых растений эндивия на наличие генов *ifn- a2b* и *bar*: А- ген *ifn- a2b*: М – маркер; 1-3 – линии трансгенных растений; 4 – плазмидная ДНК; 5 – ДНК нетрансформированного растения цикория Б – *bar* ген: М – маркер; 1-3 – линии трансгенных растений; 4 – плазмидная ДНК; 5 – ДНК нетрансформированного растения цикория

ным отбор растений с использованием этого антибиотика в качестве селективного агента.

Выводы

Проведенные эксперименты по генетической трансформации эндивия с помощью *Agrobacterium tumefaciens* конструкциями с геном интерферона показали, что использование вектора с селективным геном *nptII* при данных условиях трансформации является невозможным для получения трансформированных растений. Для получения трансгенных растений эндивия с геном *bar* необходимым этапом является культивирование эксплантов вначале без селективного давления с перенесением их в условия селекции только после начала регенерации растений. При этом частота трансформации растений составила 20 %, а эффективность – 5 растений на эксплант.

Литература

1. Fernald M.L., Gray's Manual of Botany. 8th ed. - American Book Co., New York. - 1950. - 216 p.
2. Chen Ch.-J., Deng A.-J., Liu Ch., Shi R., Qin H.-L., Wang A.-P., Chen Ch.-J., Deng A.-J., Liu Ch., Shi R., Qin H.-L., Wang A.-P. Hepatoprotective Activity of *Cichorium endivia* L. Extract and Its Chemical Constituents // Molecules. – 2011. - vol. 16, № 11. - P. 9049-9066.
3. Kamel Z. H., Daw I. Marzouk M. Effect of *Cichorium endivia* Leaves on Some Biochemical Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats // Australian Journal of Basic and Applied Sciences. – 2011. – vol. 5, № 7. – P. 387-396.
4. Chen C.J., Qin H.L., Deng A.J., Wang A.P. Antioxidant activity of extract from *Cichorium endivia* L. // Food Drug. – 2011. - № 13 - P. 93-96.
5. Kopeck K., Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny. - Praha, ÚZPI. -1998. – 72 p.
6. Роут А., Бростовф Дж., Мейл Д. Иммунология. - М.: Мир. - 2000. – 582 с.
7. Gelvin S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene joking” tool // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2003. – vol. 67, № 1. – P. 16-37.

8. Матвеева Н. А., Шаховский А. М., Герасименко І. М. [та ін.] Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$ в рослини цикорію (*Cichorium intibus* L.) методом агробактеріальної трансформації // Біополімери та клітина – 2009. – Т. 25, №2. – С. 120-125.

9. Gerasymenko I. M., Lyrova N. M., Sakhno L. A., Shcherbak N. L., Sindarovska Y. R., Bannikova M. A., Sheludko Y. V., Kuchuk N. V. Obtaining and analysis of tobacco, lettuce and rape plants transformed with human interferon alfa 2b gene // Фактори експериментальної еволюції організмів. - Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. - Київ: Логос. - 2009. - Т. 7. - С. 274- 279.

10. Murashige T. Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – vol.15, №3. – P. 473 – 497.

11. Дрейнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений. В кн. Генная инженерия растений. - М: Мир. - 1991. – С.241-245.

Резюме

Оптимизированы условия трансформации и отбора трансгенных растений *Cichorium endivia* L., а также получены растения с генами *ifn- $\alpha 2b$* и *bar* с частотой 20 % и эффективностью 5 растений на эксплант.

Оптимізовано умови трансформації та відбору трансгенних рослин *Cichorium endivia* L., а також отримано рослини з генами *ifn- $\alpha 2b$* і *bar* з частотою 20 % та ефективністю 5 рослин на експлант.

The conditions of transformation and selection of transgenic endive plants were optimized. The plants with both *ifn- $\alpha 2b$* and *bar* genes were obtained. The frequency of plant transformation was 20 %, efficiency – 5 plants per explant.

КЛЯЧЕНКО О.Л., КРИЛОВСЬКА С.А.

Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: krylovskaya.sv@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ КАЛЮСОГЕНЕЗУ РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ (BETA VULGARIS L.): ПЕРЕДУМОВИ СЕЛЕКЦІЇ З ПІДВИЩЕННЯ АДАПТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.) – унікальна високопродуктивна і високоприбуткова сільськогосподарська культура, чудовий попередник у сівозміні для наступних культур, яка спроможна підвищувати врожайність, наприклад ячменю, на 40%. Цукрові буряки впливають на екологію, вдвічі-вчетверо ефективніше використовують вологу в порівнянні з зерновими культурами, овочами та люцерною – лише 200 л на 1 кг сухої речовини, вчетверо більше виділяють в атмосферу кисню, ніж 1 га змішаного лісу, і у стільки ж разів більше поглинають вуглекислого газу, можуть давати високі врожаї за мінімальної дози внесення азотних добрив.

Цукровий буряк (*Beta vulgaris* L.), дворічна рослина, є однією з найбільш важливих технічних культур. Близько 35-40% всесвітнього цукрового виробництва здійснюється з цукрового буряку [6]. Площа посівів цукрового буряку в Україні на 2011 рік склала приблизно 526,9 тис. га, що

на 65 тис. га більше у порівнянні з 2010 роком. Середня врожайність склала 370 ц/га, це додаткових 71 ц/га порівняно з 2010 роком.

В теперішній час для вирішення прикладних завдань селекції цінних сільськогосподарських рослин [1] і, зокрема, цукрових буряків [2] – широко використовуються біотехнологічні методи. Одним з таких методів є регенерація рослин в морфогенних калюсних культурах *in vitro*.

Основною проблемою при масовому отриманні фертильних рослин-регенерантів цукрових буряків є низький вихід фертильних рослин. Вирішення цієї проблеми пов'язане з виявленням шляхів морфогенезу *in vitro* калюсів на живильному середовищі для регенерації і можливістю регуляції цих шляхів [3].

Цукрові буряки належать до групи гормонозалежних об'єктів культивування *in vitro*. Підбір оптимальної концентрації регуляторів росту у живильному середовищі є одним з ключових етапів у роботі при культивуванні цукрових буряків *in vitro*.

Метою нашої роботи було отримання морфогенного калюсу та рослин-регенерантів різних високопродуктивних генотипів цукрових буряків, що буде слугувати підґрунтям для подальших досліджень з підвищення адаптивних властивостей та продуктивності цукрових буряків.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були калюсні тканини цукрових буряків сортів Ялтушківський однонасінний 64 і Білоцерківський однонасінний 45 та гібриди: Ялтушківський ЧС 72, Білоцерківський ЧС 57, Іванівський ЧС 33, Уладово-Верхняцький ЧС 37, Атаманша, Ворскла і Катюша. Для одержання первинного калюсу як експлантат використовували стебла та листові експлантати.

Для індукції калюсогенезу простерилізоване насіння висаджували на модифіковані середовища Мурасіге-Скуга (МС) [5], які містили 1) МС + 1 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП), 0,5 мг/л α -нафтилоцтової кислоти (НОК), 0,1 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК), 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д); 2) МС + 100 мг/л мезоінозиту, 0,5 мг/л V_1 , 0,5 мг/л гідролізату казеїну, 1 мг/л 6-БАП, 0,5 мг/л НОК, 0,1 мг/л ІОК. При використанні стеблових та листових експлантатів вирощували асептичні проростки на безгормональному середовищі МС протягом 5-7 днів. Калюси культивували в абсолютній темряві (у термостаті) при температурі 25°C протягом 3 тижнів [4]. Частоту індукції калюсогенезу визначали як відношення числа експлантатів, що утворили калюс, до початкової кількості експлантатів.

Для індукції морфогенезу калюс переносили на регенераційне середовище МС доповнене 1 мг/л тіаміну, 10 мг/л глютаміну, 0,1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л ІОК, 2 мг/л ГК, 30 мг/л сахарози.

Результати і обговорення

У досліджах ми використовували різні типи експлантатів для отримання первинного калюсу: стебла та листкові пластини. На всіх типах формувалася калюс, але з різною частотою – від 15 до 100%. Листкові пластини виявилися кращими експлантатами для отримання первинного калюсу (табл. 1).

Таблиця 1

Ефективність калюсогенезу різних генотипів цукрових буряків в залежності від модифікації середовища МС

Склад живильного середовища	Сорт, гібрид	Кількість експлантатів, шт.	Частота індукції калюсогенезу у листкових пластин, %	Сер. маса калюсу, г.
МС + 1 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НОК + 0,1 мг/л ІОК + 2 мг/л 2,4-Д	Ялтушківський 64	50	100	0,52
	Білоцерківський 45	50	100	0,70
	Ялтушківський ЧС 72	50	100	0,58
	Білоцерківський ЧС 57	50	100	0,72
	Іванівський ЧС 33	50	94	0,54
	Уладово-Верхняцький ЧС 37	50	96	0,64
	Атаманша	50	100	1,12
	Ворскла	50	100	0,98
	Катюша	50	100	1,03
МС + 100 мг/л мезо-інозиту + 0,5 мг/л В ₁ + 0,5 мг/л гідролізату казеїну + 1 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НОК + 0,1 мг/л ІОК	Ялтушківський 64	50	78	0,46
	Білоцерківський 45	50	62	0,62
	Ялтушківський ЧС 72	50	70	0,52
	Білоцерківський ЧС 57	50	70	0,70
	Іванівський ЧС 33	50	36	0,42
	Уладово-Верхняцький ЧС 37	50	38	0,48
	Атаманша	50	56	0,90
	Ворскла	50	40	0,86
	Катюша	50	68	0,90

Калюс, який утворився на сегментах листка був рихлим світлого кольору, на стеблі – мав менші розміри, був значно твердішим. Частота індукції калюсоутворення при використанні листкових експлантатів була максимальною і становила 36-100%. При цьому найвищий відсоток калюсоутворення спостерігали на середовищі МС1.

У всіх обраних для експерименту сортів та гібридів цукрових буряків, крім гібридів Іванівський ЧС 33 та Уладово-Верхняцький ЧС 37, калюсні тканини мали щільну структуру та біло-жовте забарвлення. У гібридів Іванівський ЧС 33 та Уладово-Верхняцький ЧС 37 калюсні тканини мали пухку консистенцію, були водянистими, мали сіруватий відтінок (рис. 1).

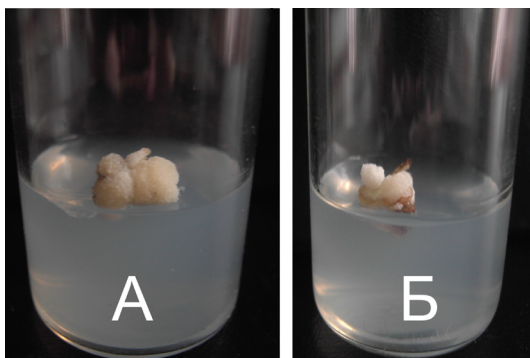


Рис. 1. Калюсні тканини різного типу: А – пухка консистенція, водянисті, сіруваті (Іванівський ЧС 33); Б – щільні, біло-жовті (Атаманша).

У подальших дослідженнях при перенесенні калюсних тканин на регенераційне живильне середовище для індукції морфогенезу були встановлені відмінності у морфогенетичному потенціалі різних типів калюсних тканин різних генотипів цукрових буряків. Щільний біло-жовтий калюс (Ялтушківський 64, Білоцерківський 45, Ялтушківський ЧС 72, Білоцерківський ЧС 57, Атаманша, Ворскла, Катюша) характеризувався регенераційною здатністю. На 7-12 добу культивування було відмічено формування проростків і розеток (кількість розеток варіювала від 1 до 5 в залежності від генотипу). Частота регенерації становила 75-80%. Морфогенез рихлого обводненого калюсу (Іванівський ЧС 33, Уладово-Верхняцький ЧС 37) був слабо вираженим і частота регенерації становила 25-30%.

Висновки

Вид обраного експлантату визначає частоту індукції калюсогенезу. При використанні листкових пластинок різних генотипів цукрових буряків для отримання первинного калюсу спостерігалась більша частота калюсотворення, ніж при використанні стебел.

Тип калюсної тканини визначає частоту регенерації та морфогенетичну активність калюсних тканин різних генотипів цукрових буряків.

Література

1. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургск. ун-та, 2003. – 227 с.
2. Поїк М.В. Буряки. – К.: XXI Вік «РІТА» - «ТРУД» - «КІЇВ». – 2001. – 320 с.
3. Gürel S., Gürel E., Kaya Z. Callus development and indirect shoot regeneration from seedling explants of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured in vitro // Turkish Journal of Botany. – 2001. – Vol. 25. – № 1. – P. 25-33.
4. Mishutkina Ya.V., Gaponenko A.K. Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) morphogenesis in vitro: effects of phytohormone type and concentration in the culture medium, type of explants, and plant genotype on shoot regeneration frequency // Russian Journal of Genetics. – 2006. – Vol. 42. – №2. – P. 150-157.

5. *Murasige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

6. *Winner C.* History of the crop – London, UK. – 1993. – pp. 1–35.

Резюме

Вивчено каллюсогенез генотипів цукрових буряків з різних експлантатів. Встановлена залежність частоти індукції каллюсогенезу від виду експлантату. Тип каллюсної тканини визначає частоту регенерації та морфогенетичну активність каллюсних тканин цукрових буряків.

Изучен каллюсогенез генотипов сахарной свеклы из разных эксплантатов. Установлена зависимость частоты индукции каллюсогенеза от вида эксплантата. Тип каллюсной ткани определяет частоту регенерации та морфогенетическую активность каллюсных тканей сахарной свеклы.

Callusogenesis of different sugar beets genotypes was studied. The correlation between callusogenesis induction frequency and type of explant was discovered. Was investigated that type of the callus tissue determine the frequency of regeneration and morphogenetic callus tissues activity of sugar beets tissue.

КОВАЛЕВА Л.В., ВОРОНКОВ А.С., ТИМОФЕЕВА Г.В., РАКИТИН В.Ю.

Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН,

Россия, 127276, Москва, ул. Ботаническая,35, e-mail: kovaleva_l@mail.ru

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОРАСТАЮЩЕГО *IN VITRO* МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ: УЧАСТИЕ ЭТИЛЕНА

В настоящее время накапливается все больше данных об участии этилена в регуляции репродуктивного процесса растений [1]. Показано, что трансгенные растения петунии со сниженной экспрессией гена *PhEIN2* проявляли низкую чувствительность к этилену при старении цветков и созревании плодов, а сверхэкспрессия в трансгенных растениях табака гена *St-ETR1/H69A* или *St-ERS1/H70A* индуцировала стерильность пыльцы или снижала ее фертильность [2].

LM-array (laser microdissection technique) анализ профиля глобальной экспрессии генов в развивающемся пыльнике риса выявил наличие синтеза и сигналинга этилена в микроспорах, пыльцевых зернах и тапетуме [3]. Исследования, проведенные на орхидее, гвоздике, табаке и петунии, предполагают, что индуцированное опылением образование и выделение этилена тканями пестика необходимо для роста пыльцевых трубок и успешного оплодотворения [4]. Однако вопрос о физиологической роли этилена в прогамной фазе оплодотворения как при нормальном развитии репродуктивного процесса, так и при наличии генетически детерминированных барьеров самооплодотворения еще далек от своего решения.

Цель данной работы составило изучение образования и действия этилена в развивающихся пыльниках самосовместимого и стерильного клонов

петунии, а также в *in vitro* прорастающем мужском гаметофите (на среде культивирования).

Материалы и методы

Растительный материал. Вегетативно размноженные растения двух клонов петунии (*Petunia hybrida* L.): фертильного (самосовместимого) и стерильного (микроспорогенез останавливается на стадии мейоза [5]) выращивали в почвенной культуре при естественном освещении в оранжерее.

Стадии развития микроспор и пыльцевых зерен в развивающихся пыльниках определяли в соответствии с общепринятой классификацией [6] по методике Матвеевой и др. [7] с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33258 (“Serva” Германия). Препараты анализировали под микроскопом Axio Imedger D1 (Carl Zeiss, Германия).

Питательная среда для культивирования пыльцы включала 0.4 М сахарозу и 1.6 мМ борную кислоту. О степени прорастания судили по количеству проросших пыльцевых зерен, произвольно отобранных и наблюдаемых в четырех полях микроскопа (n=200). Длину пыльцевых трубок определяли с помощью микроскопа Axio Imedger D1 с камерой Axio Cam MRc. Измерения выполняли в программе Axio Vizion 4.5 (Carl Zeiss, Германия).

Выделение этилена определяли газохроматографическим методом [8]. Образцы инкубировали в темноте при 26°C в термостате TCH 100 (Laboratorní Prístole, Praha) не более 30 мин до начала анализа. Весь воздух из флакона использовали для определения содержания этилена на газовом хроматографе Цвет 106 (Россия) с пламенно ионизационным детектором и концентрирующей системой для углеводородов, позволяющей в десятки раз повышать чувствительность прибора, которая необходима для максимального сокращения времени инкубации и проведения анализа до начала выделения “раневого” этилена.

Результаты и обсуждение

Развитие мужской гаметофитной генерации – пыльцы полностью зависит от спорофитных тканей стенки пыльника. У петунии разрушение тапетума происходит по мере созревания микроспор и завершается к моменту образования двуядерной пыльцы, полное разрушение тапетума происходит перед стадией ранних пыльцевых зерен [5]. Результаты настоящей работы показали, что этилен необходим для ранних стадий микроспорогенеза. Структурные изменения в стенке развивающегося пыльника сопровождаются повышением выделения этилена на стадиях формирования микроспор и созревания пыльцевых зерен. Развитие мужского гаметофита у фертильного клона сопровождалось двумя периодами повышения образования этилена в тканях пыльника: первый происходил во время развития микроспор, второй – при созревании пыльцевых зерен. Трехкратное повышение выделения этилена пыльниками, сопровождавшее развитие микроспор на стадии тетрад, как полагаем, и было причиной разрушения тапетума и средних слоев стенки пыльника. Для подтверждения этого предполо-

жения исследовали влияние различных концентраций ингибитора действия этилена NBD (500, 2000, 6000 мкл/л) на состояние пыльников в бутонах самосовместимого клона. Обработка NBD (во всех концентрациях) бутонов длиной до 5 мм уже на 2-ой день приводила к полной остановке развития пыльника и мужского гаметофита.

Финальным этапом созревания пыльцы, без которого она практически утрачивает способность к прорастанию, является дегидратация пыльцы, которая начинается после разрушения тапетума, и к моменту растрескивания пыльника пыльцевые зерна были частично дегидратированы. Созревание и дегидратация пыльцевых зерен петунии сопровождалось значительным повышением содержания АЦК и выделения этилена пыльниками. Повышение содержания АЦК в пыльниках на последней стадии созревания сопряжено с ее накоплением в созревающих пыльцевых зернах. Следует отметить, что выделение этилена пыльниками на стадии позднего двуядерного пыльцевого зерна возрастало приблизительно в 10 раз, а содержание АЦК в 100 раз. Содержание АЦК в зрелой пыльце составляло 300 нмоль/г сырого веса.

Значительное увеличение образования и, следовательно, содержания этилена запускает в стенке пыльника механизмы программируемой клеточной смерти (ПКС), которая является частью нормального развития флоральных органов, включая завершающие стадии развития пыльника, приводящие к его растрескиванию и высвобождению пыльцы [9]. Семидневная обработка бутонов (длина 10-15 мм) петунии самосовместимого клона ингибитором действия этилена NBD в концентрации 6000 мкл/л предотвращала растрескивание пыльников и прорастание полученной из них пыльцы.

У стерильного клона, разрушение тканей тапетума наблюдали очень рано, уже в профазе Me, одновременно с нарушениями в развитии спорогенной ткани [5]. Гибель микроспороцитов сопровождалась плазмолизом тапетальных клеток. Гибель микроспороцитов и дегенерация клеток тапетума сопровождалась высоким уровнем выделения этилена на стадии материнских клеток пыльцы. Следует отметить, что образование этилена пыльниками стерильного клона, сопровождающее плазмолиз тапетума и гибель микроспороцитов было в 10 раз выше, чем у фертильного во время разрушения тапетума и средних слоев стенки пыльника.

Результат воздействия экзогенного этилена на развивающийся мужской гаметофит петунии самосовместимого клона зависел от концентрации гормона и стадии развития генеративных клеток. Высокие концентрации этилена (1-100 мкл/л) вызывали деградацию и гибель мужских генеративных клеток, находящихся в момент обработки на ранних стадиях развития, от начала мейоза до выхода микроспор из тетрад.

Прорастающая *in vitro* пыльца практически сразу же после начала культивирования интенсивно выделяла этилен, как полагаем, за счет акку-

мулированной в пыльцевых зернах АЦК. Основным фактором, обеспечивающим многообразие ответов этилена, как полагают, является взаимодействие сигнального пути этилена с сигнальными путями других фитогормонов. Как мы показали ранее, в регуляции прогамной фазы оплодотворения, наряду с этиленом, участвуют ИУК, АБК, гиббереллины [4].

Экзогенные этилен (этрел), ИУК, АБК и ГК₃ увеличивали процент прорастания и скорость роста пыльцевых трубок (рис. 1). Нарушение функционирования этилена ингибиторами его действия (1-МСП) или его синтеза (АОА) приводило к торможению прорастания и роста пыльцевых трубок. В течение первого часа культивирования в большей степени стимулировала рост пыльцевых трубок ГК₃, а совместное действие этрела с ГК₃ вызвало резкое увеличение длины пыльцевых трубок на 185 %. Ингибитор действия этилена 1-МСП полностью тормозил рост пыльцевых трубок, в то время как фитогормоны, при совместном внесении их в среду, снимали его эффект. Ингибитор синтеза этилена АОА тормозила рост пыльцевых трубок на 20 %. При совместном применении АОА и ИУК наблюдали почти полное снятие эффекта АОА, а при совместном действии АОА и АБК длина пыльцевых трубок увеличивалась на 25 % (по сравнению с контролем).

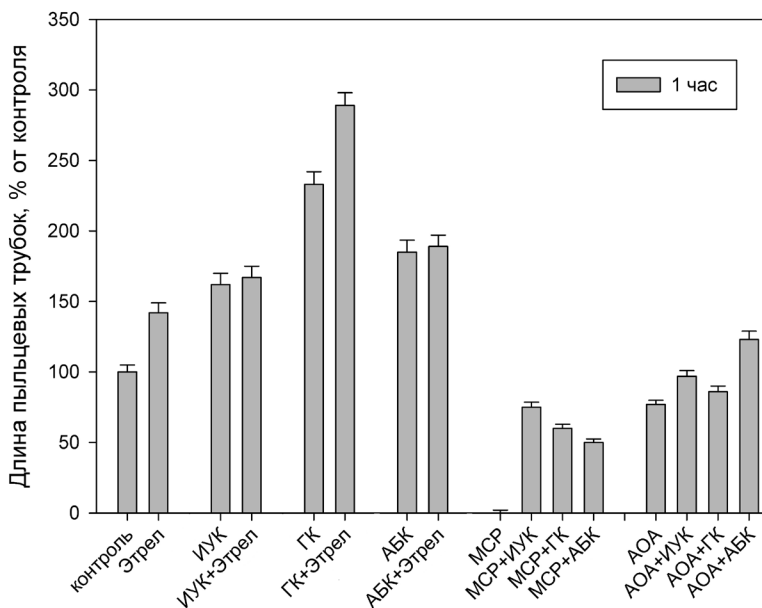


Рис. 1. Влияние этрела, ИУК, АБК, ГК₃, 1-МСП, АОА на рост пыльцевых трубок петунии. 1 час культивирования на среде: 0,4 сахараза и 1,6 мМ Н₃ВО₃

Выводы

Таким образом, полученные результаты дают основание заключить, что этилен участвует в регуляции развития, прорастания и роста мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения, взаимодействуя, как полагаем, с сигнальными путями ИУК, АБК и ГК.

Работа выполнялась при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 10-04-00356).

Литература

1. Lin Z., Zhon S., Grierson D. Recent advances in ethylene research // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 3311-3336.
2. Ishimaru K., Takada K., Watanabe S. et al. Stable male sterility induced by the expression of mutated melon ethylene receptor genes in *Nicotiana tabacum* // Plant Sci. 2006. V. 3. P. 355-359.
3. Hirano K., Aya K., Hobo T. et al. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice // Plant Cell Physiol. 2008. V. 49. P. 1429-1450.
4. Kovaleva L., Zakharova E. Hormonal status of the pollen-pistil system at the progamic phase of fertilization after compatible and incompatible pollination in *Petunia hybrida* L. // Sex. Plant Reprod. 2003. V. 16. P. 191-196.
5. Добровольская А.А., Родионова Г.Б., Воронков А.С., Ковалева Л.В. Спорофитно-гаметофитные взаимодействия в системе пыльник-мужской гаметофит у петунии // Физиология растений. 2009. Т. 56. С. 437- 444.
6. Koltunow A.M., Truettner J., Cox K.H. et al. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development // Plant Cell. 1990. V. 2. P. 1201-1224.
7. Матвеева Н.П., Старостенко Н.В., Тулеева М.И. и др. Изменение пути развития микроспор табака под влиянием внеклеточных факторов, выделяемых *in vitro* // Физиология растений. 1998. Т.45. С.730-734.
8. Ракитин В.Ю., Ракитин Л.В. Определение газообмена и содержание этилена, двуокиси и кислорода в тканях растений//Физиология растений. 1986. Т. 33. С. 403-413.
9. Rogers H.J. Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? //Ann. Botany. 2006. V. 97. P. 309-315.

Резюме

Показано участие этилена в регуляции развития, прорастания и роста мужского гаметофита петунии в прогамной фазе оплодотворения.

Показано участие этилену в регуляції розвитку, проростання і зростання чоловічого гаметофіта петунії в прогамній фазі запліднення.

These results suggest that ethylene is an important factor of male gametophyte development, germination, and growth at the progamic phase of fertilization.

КОВБАСЕНКО Р.В.¹, ОЛІЙНИК Т.М.², ДУЛЬНЄВ П.Г.³, ДМИТРІЄВ О.П.¹.

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, 03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 148;

²Інститут картоплярства НААН України, 07853, Київська область, смт. Немішаєво, вул. Чкалова, 22;

³Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, 02160, Київ, Харківське шосе, 50. e-mail: kovbasenko@yandex.ru

ОПТИМІЗАЦІЯ ЖИВИЛЬНИХ СУМІШЕЙ ДЛЯ ІНТРОДУКЦІЇ ПАСЛЬОНОВИХ КУЛЬТУР *IN VITRO* ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ НАНОЧАСТИНОК

При роботі з культурою *in vitro* рослин картоплі (*Solanum tuberosum*) і томату (*Lycopersicon esculentum*) для калусогенезу та морфогенезу майже завжди із незначними модифікаціями використовують живильне агаризоване середовище за прописом Мурашіге і Скуга [1]. Однак в останні десятиріччя з появою нанотехнологій з'явилися нові можливості створення ефективних біотехнологій. Під нанотехнологіями розуміють фундаментальні технології, що базуються на маніпуляціях із наноструктурами (наночастинками). Наноструктури – це не просто найменше з того, що створили люди, вони є також найменшими твердими матеріалами, які можна створити. Відомо, що фізичні та навіть хімічні властивості різних речовин відрізняються в залежності від розмірів їх складових частинок. Виявилось, що в нанометровому діапазоні ці частинки набувають раніше їм не належні нові важливі каталітичні, адсорбційні, енергетичні та інші властивості. Переходячи до наномасштабу дослідники отримують можливість маніпулювати атомами та молекулами, що входять до складу будь-якої речовини. В нанотехнологіях використовують частинки розміром від кластера атомів (близько 1 нм) до колоїдних (порядку 100 нм) [2].

Однак лише розмірами не вичерпується суть нанонауки. Це хоча й важлива, але не головна ознака наносистем. Визначальним є структурний чинник, тобто спосіб упакування „атом за атомом” або архітектура наносистеми. Застосування до нанорозмірних об'єктів поняття „система” означає, що їх властивості формуються не адитивно з властивостей компонентів, а є чимось якісно новим і тільки цій системі притаманним [3]. Характерною рисою розвитку нанонауки є зближення органічного світу, світу живої природи, з неорганічним. Саме на цьому шляху ближчим часом за рахунок використання наноматеріалів може бути досягнуто значний прогрес у створенні нових нанобіотехнологій, коли вивчають дію неорганічних наночастинок на живі системи та розробляють способи їх ефективного використання [4, 5].

Дослідження в сфері практичного застосування нанотехнологій проводять у багатьох країнах. Зараз в світі функціонують більше 2 тис. нанотехнологічних центрів.

Раніше нами на основі аква-хелатних наночастинок біогенних елементів в композиції з похідними піридину було розроблений новий індуктор стійкості овочевих культур до найбільш шкочочинних хвороб [6]. Цей індуктор показав високу ефективність в польових умовах. Метою цієї роботи було вивчення аква-хелатних комплексів наночастинок біогенних елементів та їх цитратних форм як компонентів агаризованих живильних середовищ для вирощування *in vitro* основних пасльонових культур — картоплі (*S. tuberosum*) і томату (*L. esculentum*).

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сорти картоплі Лугівська і Слов'янка та сорти томату Лагідний і Бобрлицький. Роботу із рослинами в культурі *in vitro* проводили із загальноприйнятими стандартизованими методиками [7-9].

Результати та обговорення

Оптимізацію мінерального живлення можна досягти тільки при збалансованому наборі макро- і мікроелементів. Особливої актуальності це питання набуває при дослідженнях з культурою *in vitro*. Мікроелементи характеризуються високою специфічністю та незамінністю. Поряд з участю в ферментативних реакціях доведено їх вплив на обмін речовин у рослинних організмах та прискорення розвитку. А при вдалому підборі концентрацій та співвідношення фітогормонів можна значно скоротити терміни отримання культури клітин і тканин та досягти регенерації рослин. Основною метою наших досліджень було здійснення порівняльного аналізу ефективності стандартизованого пропису живильного середовища для картоплі і томату із запропонованими нами прописами, де ряд важливих макро- та мікроелементів (магній, марганець, кобальт, мідь, цинк, залізо) було замінено на наночастинки цих же елементів, які перебувають у цитратній або у аква-хелатній формі.

Первинні калуси отримували із сегментів листків асептично вирощених рослин. Оцінку інтенсивності калусоутворення проводили визначенням сирової маси первинного калусу в динаміці росту. Відомо, що успіх в отриманні калусу залежить переважно від вдалого підбору концентрації і співвідношення фітогормонів та біогенних елементів. Причому норми цих біогенних елементів в аква-хелатних (С-№2) і цитратних (С-№3) формах були значно нижчими від їх вмісту в класичному варіанті (С-№1). Результати досліджень по аналізу динаміки калусоутворення в культурі *in vitro* представлені в таблицях 1 і 2.

Інтенсивність росту калусу картоплі і консистенція утвореної тканини залежала як від сорту картоплі, так і від складу живильних середовищ (табл. 1). Із експлантів листка розвивались два типи калусів: крихкі гладенькі на середовищах С-№1 та С-№3 та з щільною зернистою структурою – на С-№2. В цілому калусна культура сорту Лугівська характеризувалась світлозеленим забарвленням, а сорту Слов'янка – темнозеленим, іноді з антоціановим відтінком. Найбільший приріст калусної маси на початко-

вих етапах був відмічений з експлантів листка у сорту Слов'янка. Це можна пояснити високою адаптивною здатністю даного генотипу до живильних середовищ, проте максимальний приріст калусних агрегатів отримано на середовищі С-№2. Така ж тенденція відмічалась і з сортом Лугівська, проте приріст калусної маси у нього виявився майже вдвічі нижчий. Проте слід зазначити, що по мірі збільшення пасажів відмінності між генотипами за даним показником стають менш вираженими. Тому з 21-го дня культивування доцільно проводити пересадку калусної тканини на свіжі живильні середовища С-№2 та С-№3.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика живильних середовищ із аква-хелатними та цитратними формами складових на картоплі

Час культивування, доба	Живильні середовища:		
	С-№1	С-№2	С-№3
	Маса калусної тканини на добу культивування, мг:		
Сорт Слов'янка			
3	14,8	20,5	20,5
6	19,3	30,4	40,3
9	28,1	60,0	64,5
12	42,4	79,2	70,1
15	45,0	90,0	73,2
18	48,5	92,4	73,2
21	52,2	95,2	73,2
Сорт Лугівська			
3	5,8	10,0	14,2
6	10,0	35,3	23,4
9	16,0	40,9	33,0
12	20,0	46,0	36,1
15	26,0	53,1	39,2
18	28,3	56,0	38,7
21	31,2	55,2	37,3
24	33,0	52,1	35,2
27	33,0	45,8	32,5

Подібні результати було отримано нами і при роботі з калусними агрегатами на двох сортах томату (табл. 2). Причому аналогія спостерігалась між сортом картоплі Слов'янка та сортом томату Лагідний, а також, відповідно, між сортом картоплі Лугівська та томату Бобрицький.

Таким чином, отримані дані свідчать про генотипову обумовленість процесів росту і розвитку в культурі *in vitro* рослин картоплі і томату. Оптимізуючи живильні середовища, можна виявити потенційні особливості генотипу до калусо- та морфогенезу.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика живильних середовищ із аква-хелатними та цитратними формами складових на томаті

Час культивування, доба	Живильні середовища:		
	С-№1	С-№2	С-№3
Маса калусної тканини на добу культивування, мг:			
Сорт Лагідний			
3	13,5	18,8	18,6
6	17,4	26,4	33,1
9	24,1	50,0	54,5
12	36,5	68,4	60,0
15	40,0	79,2	58,2
18	43,4	81,6	58,2
21	45,2	85,2	58,2
Сорт Бобрицький			
3	6,0	9,8	13,8
6	9,4	32,4	21,7
9	14,0	37,6	30,0
12	18,3	42,0	33,3
15	22,4	49,0	36,4
18	23,0	53,2	36,0
21	25,6	53,0	35,4
24	26,3	50,2	33,0
27	25,8	43,0	31,1

Висновки

В результаті проведених досліджень запропоновано в живильних середовищах за прописом Мурашіге і Скуга замість солей магнію, марганцю, цинку, молібдену, міді, кобальту та заліза використовувати оптимізовані норми аква-хелатних комплексів наночастинок біогенних елементів або їх цитратні форми в менших кількостях із значно більшою ефективністю.

Робота виконана при підтримці гранту Національної академії наук України П-8-12 міждисциплінарної програми “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”.

Література

1. *Murashige T., Skoog F.A.* A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
2. *Волков С.В., Ковальчук Є.П., Огенко В.М., Решетняк О.В.* Нанохімія, наносистеми, наноматеріали. – Київ: Наук. думка. – 2008. – 423 с.
3. *Сергеев Г.Б.* Размерные эффекты в нанохимии // *Рос. хим. журн.* – 2002. – 46. - 5. – С. 22-29.

4. Asha M., Jose R., Koshy J. Synthesis and rapid densification of nanoparticles of praseodim hafnium oxide: a new complex perovskite // Journal of nanoparticle research. – 2001. - 3. - P. 413-417.

5. Сыч В.Ф., Дрожжина Е.П., Курносова Н.А. и др. Введение в нанотехнологии. Ульяновск: УГУ. – 2008. – 101 с.

6. Ковбасенко Р.В., Дульнев П.Г., Дмитрієв О.П., Ковбасенко В.М. Застосування нанотехнологій при індукції резистентності овочевих культур до хвороб // Збірник тез міжнародної науково-практичної конференції: „Актуальні проблеми підвищення ефективності виробництва овочевої продукції та насінництва”. Харків. – 2011. – С. 121-123.

7. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – Київ: Наук. думка. – 2005. – 271 с.

8. Внучкова В.А. Методические указания по культуре тканей томатов. – М. - 1985. – 16 с.

9. Кучко А.А., Олійник Т.М. Соматоклональна мінливість у картоплі. – Київ: Довіра. – 1988. – 191 с.

Резюме

Оптимізовано живильне середовище за прописом Мурашіге і Скуга для інтродукції картоплі і томату із застосуванням аква-хелатного комплексу металів та цитратних форм біогенних мікроелементів із значно нижчими нормами їх витрат.

Оптимизирована питательная среда по прописи Мурашиге и Скуга для интродукции картофеля и томата с применением аква-хелатного комплекса металлов и цитратных форм биогенных микроэлементов со значительно меньшими нормами их применения.

Nutrient Murashige and Skoog growth medium for the introduction of potato and tomato was optimized with aqua-metal chelates and citrate forms of biogenic microelements with much lower standard amounts of their application.

КОВТУН С.І., ЩЕРБАК О.В., ЗЮЗЮН А.Б., ТРОЦЬКИЙ П.А., ГАЛИЦЬКА Т.В.

Інститут розведення і генетики тварин НААН,

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,

e-mail: ov19792006@yandex.ru

ВИКОРИСТАННЯ НАНОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ ЕФЕКТИВНОГО ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ *IN VITRO*

Нині інтенсивно розробляються та удосконалюються ембріогенетичні методи для відтворення сільськогосподарських тварин у системі біотехнологічної селекції. Але ефективність одержання біологічно повноцінних зародків сільськогосподарських тварин в умовах *in vitro*, порівняно з одержаними *in vivo* ембріонами, має не завжди високі та стабільні результати. Тому, наразі оптимізації середовищ для культивування репродуктивних клітин приділяється значна увага спеціалістів галузі біотехнології. Сучасні нанотехнології інтенсивно використовують в різних галузях науки та техні-

ки, зокрема біотехнології, сільському господарстві, медицині та ін. В Україні інтенсивно ведеться робота щодо удосконалення біотехнологічних методів відтворення сільськогосподарських тварин з використанням наноматеріалів [5, 6, 7].

Сформовані поза організмом доімплантаційні ембріони, є джерелом дешевого біоматеріалу для експериментальних робіт [3, 4]. Крім того методи отримання *in vitro* зародків ссавців дають змогу вивчати морфологічні, цитогенетичні і молекулярно-генетичні особливості раннього ембріогенезу. Оскільки ембріональний розвиток є результатом взаємозв'язку зародків з статевими шляхами самки у зародків, які культивують поза організмом, існує «блок» розвитку [8]. У свиней це 4-клітинна стадія, яка пов'язана з початком синтезу РНК [13]. Вирішальним чинником для успішного культивування ембріонів поза організмом є склад середовища який повинен задовольняти потреби клітини в поживних речовинах і відповідати особливостям метаболізму клітин *in vitro* [12]. Для вирішення даних проблем важливим є оптимізація середовища для культивування гамет та ембріонів за допомогою наноматеріалів, зокрема високодисперсних речовин [9].

Для удосконалення середовищ культивування поза організмом ембріонів свиней заслугоує уваги високодисперсний кремнезем (ВДК), який застосовують як складову різних лікарських засобів. Наявність на поверхні ВДК певної кількості хімічно активних гідроксильних груп обумовлює модифікацію поверхні різними функціональними групами, що дає змогу використовувати ВДК як матрицю для синтезу матеріалів з певними фізико-хімічними та біологічними властивостями.

Науковцями України доведено, що додавання ВДК до суспензії різних клітин (дріжджі, мікроорганізми, еритроцити, сперматозоїди та ін.) у малих концентраціях сприяє стимуляції їх життєздатності. Імобілізація на поверхні ВДК ряду біомолекул дозволяє створювати біологічно активні наноматеріали, які здатні підсилювати подібний ефект [1, 2, 9, 11].

Метою наших досліджень було вивчення впливу ВДК на ефективність формування зигот свиней в умовах *in vitro* та подальший розвиток ембріонів поза організмом.

Матеріал і методи

Дослідження були виконані в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин НААН. В експериментах використано яєчники свиней на стадії фолікулярного росту без патологічних ознак. Яєчники відбирали в СВАТ «Агрокомбінат «Калита» від забитих статевозрілих свинок. Ооцит-кумулясні комплекси (ОКК) дозрівали *in vitro* в середовищі 199 (Sigma) з додаванням 20 % еструсної сироватки крові корів (ЕС) і $3\text{-}5 \times 10^6$ клітин гранулози/мл. Для культивування поза організмом відбирали ооцити із щільним та розпушеним кумулюсом. Гамети культивували поза організмом упродовж 46 годин при $+38,8$ °C і 4 % CO_2 у повітрі. Кри-

терієм морфологічної оцінки дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільца.

Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок використовували криоконсервовані нами еякульовані сперматозоїди кнуря. Співкультивування дозрілих *in vitro* яйцеклітин свиной та відібраних методом swim-up сперматозоїдів кнуря проводили у модифікованому середовищі Тіроде (TALP) упродовж 18 годин. Після співкультивування зиготи переносили в середовище NCSU-37 (North Carolina State University-37). В дослідній групі середовище NCSU-37 містило 0,001 % ВДК t°C 200 високодисперсного кремнезему вітчизняного виробництва (м. Калуш Івано-Франківської обл.) з S пит = 300 м²/г, поверхня якого перед експериментом була оброблена упродовж 2 годин при температурі 200 °С.

Рівень дозрівання ооцитів *in vitro*, запліднення та аналіз стану хроматину ядер ембріонів вивчали шляхом оцінки сухоповітряних препаратів, які готували за допомогою модифікованого методу А. Тарковського [14]. Аналіз препаратів проводили під світловим мікроскопом при 120 – 1000 кратному збільшенні.

Результати та обговорення

Вивчено вплив ВДК t°C 200 на ефективність формування зигот свиной та подальший розвиток ембріонів в умовах *in vitro*. За морфологічною оцінкою та даними цитогенетичного аналізу встановлено, що через 46 годин культивування *in vitro* в підібраних нами умовах 98,4 % (244/248) ооцитів, відновили мейотичне дозрівання і досягли стадії – метафази II мейозу.

Після запліднення та культивування упродовж 18 годин ооцитів свиной та сперматозоїдів кнуря поза організмом зиготи свиной розділяли на контрольну та дослідну групи. Дослідні зиготи культивували в середовищі, яке містило 0,001 % ВДК t°C 200.

За результатами морфологічного аналізу встановлено, що рівень формування ембріонів із додаванням до середовища для культивування зародків свиной *in vitro* 0,001 % ВДК t°C 200 є досить високим і цей рівень становив 40,2 % (табл. 1). Показник дроблення ембріонів *in vitro* був на 3,8 % нижче у контрольній групі порівняно із середовищем яке містило 0,001 % ВДК t°C 200.

Вплив ВДК t°C 200 на рівень формування *in vitro* ембріонів свиной

Група	Кількість зигот, шт.	Рівень дроблення ембріонів <i>in vitro</i> , n (%)	ранніх морул, n
Дослідна	127	51 ^a (40,2 ± 4,4)	35 ^c (27,6 ± 4,0)
Контрольна	121	44 ^b (36,4 ± 4,4)	14 ^d (11,6 ± 2,9)

a:b – $p < 0,05$, c:d – $p < 0,01$, критерій χ^2 . Різні суперскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

Результати морфологічного аналізу одержання ембріонів *in vitro* слід доповнювати цитогенетичним аналізом яйцеклітин, з яких не відбулося формування зародків [10]. Тобто після 24 годин культивування передбачуваних зигот поза організмом певний відсоток запліднених яйцеклітин не долає блоку дроблення для переходу до розвитку ембріонів. Але показник формування у запліднених яйцеклітинах пронуклеусів вказує на забезпечення активізуючих умов середовища для одержання ембріонів поза організмом.

За результатами цитогенетичного аналізу встановлено, що у нероздроблених зигот суттєво вищу заплідненість спостерігали у дослідній групі з 0,001 % ВДК t °C 200. Додавання 0,001 % ВДК t °C 200 призводить до збільшення на 14,1 % рівня запліднення яйцеклітин *in vitro* порівняно з контролем (44,2 %, 61 із 138).

Також цитогенетичним аналізом препаратів отриманих з ембріонів свиней на різних стадіях розвитку (від двох бластомерів до ранньої морули) підтверджено, що ембріони які за візуальною оцінкою були визначені як морфологічно нормальні містили повноцінні ядра із ядерцями, кількість яких відповідала кількості бластомерів ембріонів, хроматин цих ядер також відповідав стадії розвитку зародка.

Встановлено, що відсоток ранніх морул в дослідній групі з додаванням 0,001 % ВДК t °C 200 у середовище для культивування ембріонів свиней вищий на 16 % (таб.1) порівняно із контрольною групою (11,6 %, 14 із 121). Отже, додавання ВДК t °C 200 в даній концентрації не тільки немає негативного впливу на формування зигот свиней та дроблення ембріонів, а ще й сприяє отриманню більшої кількості ембріонів розвинутих *in vitro* до стадії ранньої морули.

Таким чином, встановлено, що додавання наноматеріалів, які синтезовано на основі високодисперсного кремнезему, забезпечує оптимізацію середовища для культивування *in vitro* ембріонів свиней і сприяє розвитку ембріонів до доімплантаційних стадій розвитку поза організмом (рис. 1).

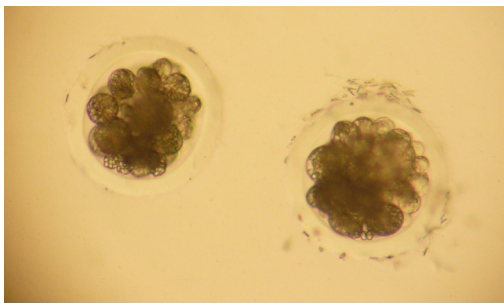


Рис. 1. Зажиттєве фото сформованих *in vitro* ембріонів свиней на стадії ранньої морули. Збільшення в 100 раз.

Висновки

Розроблено елементи біотехнологічної моделі застосування наноматеріалів у технології формування *in vitro* ембріонів свиней.

Доведено, що додавання ВДК $t^{\circ}\text{C}200$ в $\text{C} = 0,001\%$ сприяє отриманню більшої кількості ембріонів розвинутих *in vitro* до стадії ранньої морули.

Для стабільного та результативного рівня одержання та розвитку *in vitro* ембріонів свиней можна успішно застосовувати високодисперсний кремнезем у складі середовища для культивування зародків поза організмом, оскільки кремнезем, контактуючи із біологічними системами на різних етапах природних процесів, бере пряму участь у життєвих процесах.

Література

1. *Биофункциональные* наноматериалы на основе высокодисперсного кремнезема, белка и аминокислот / Н.П. Галаган, Н.Ю. Клименко, И.Л. Орел [и др.] // *Biopolymers and Cell.* – 2010. – Vol. 26 №3. – P. 205–213.

2. *Буркат В. П.* Нанобиотехнологические методы для сохранения генофонда / В. П. Буркат, С. И. Ковтун, Н. П. Галаган // *Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных»* – Дубровицы – Быково, 2007. – С. 450 – 452.

3. *Буркат В. П.* Науково–технічна програма «Збереження генофонду сільськогосподарських тварин» / В. П. Буркат, М. Я. Єфіменко, Б. Є. Подооба [та ін.] // *Тваринництво України.* – 2007. – № 2. – С. 6–9.

4. *Буркат В. П.* Сучасна біотехнологія у тваринництві / В. П. Буркат, С. І. Ковтун // *Біотехнологія.* – 2008. – № 3. – С. 7–12.

5. *Галаган Н. П.* Вплив нанокompозиту з білком на життєздатність кріоконсервованих гамет кнурів / Н. П. Галаган, С. І. Ковтун, І. В. Грищенко // *Матеріали ІХ Укр. біохімічного з'їзду.* – 2006. – Т. 2 – С. 144–145.

6. *Ковтун С. И.* Влияние наноматериалов на получение эмбрионов свиней вне организма / С. И. Ковтун, Н. П. Галаган // *Материалы II Всерос. науч. конф. с международным участием «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья».* – М. – Белгород, 2006. – С. 106–109.

7. *Ковтун С. И.* Застосування наноматеріалів у біотехнологічних дослідженнях / С. І. Ковтун // *Матеріали ІV конф. молодих вчених та аспірантів / Ін-т розведення і генетики тварин УААН.* – с. Чубинське, 2006. – С.41–42.

8. *Культиви́рование* созревших и оплодотворенных *in vitro* ооцитов в средах с клетками воспроизводительного тракта / Н. И. Смыслова, Н. И. Сергеев, Т. Е. Тарадайкин [и др.] // *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук.* – 1999. – №2. – С. 47–49.

9. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния* / под ред. А. А.Чуйко. – К. : Наукова думка, 2003. – 415 с.

10. *Формування ембріонів in vitro* як спосіб оцінки запліднювальної здатності сперматозоїдів бугаїв / А. Б. Зюжон, С. І. Ковтун, О. В. Щербак [та ін.] // *Фактори експериментальної еволюції організмів: 36. наук. пр.* – 2009. Т.7. – С. 218–222.

11. *Effect of nanocomposites based of ultrafine silica on reproductive cells* / N. P. Galagan, S. I. Kovtun, V. L. Osaulenko, N. M. Moshkivska // *Ukrainian–German Symposium on Nanobiotechnology, December 14–16, 2006.* – К., 2006. – P. 62.

12. *Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different system / P. Coy, S. Ruiz, R. Romar [et. al.] // Theriogenology. – 1999. – Vol. 51. – P. 799–812.*

13. *Prather R. S. Nuclear control of early embryonic development in domestic pigs / R. S. Prather // J. Reprod. Fertil. – 1993. – Vol. 48. – P. 17–29.*

14. *Tarkowski A. K. An air – drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. - 1966. - № 5, 3. - P. 394–400.*

Резюме

У статті наведено результати експериментальних досліджень впливу наноматеріалу ВДК t°C200 на розвиток ембріонів свиней поза організмом у середовищі для культивування. Встановлено, що рівень формування *in vitro* ембріонів свиней при використанні 0,001%-ї концентрації наноматеріалу у середовищі їх культивування становить 40,2 %, а рівень розвитку ембріонів в групі з доданим нанокмпозитом - 27,5 %.

В статье приведены результаты экспериментальных исследований влияния наноматериала ВДК t°C200 на развитие эмбрионов свиней вне организма в среде для культивирования. Установлено, что уровень формирования *in vitro* эмбрионов свиней при использовании 0,001%-й концентрации наноматериала в среде их культивирования составляет 40,2 %, а уровень развития эмбрионов в группе с добавленным нанокмпозитом - 27,5 %.

In the article the results of experimental researches of influence of nanobiomaterial of VDK of t°C200 are resulted on development of embryos of pigs out of organism in an environment for maturation. It is set that level of forming *in vitro* embryos of pigs at the use of 0,001%-й concentration of nanobiomaterial in the environment of their maturation is 40,2 %, and level of development of embryos in a group with the added nanobiomaterial - 27,5 %.

**КОМІСАРЕНКО А.Г., БРОННІКОВА Л.І., СЕРГЄЄВА Л.Є.,
МИХАЛЬСЬКА С.І., ТИЩЕНКО О.М.**

*Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17*

РІВЕНЬ ПРОЛІНУ ТА ТОЛЕРАНТНІСТЬ ДО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ РЕГЕНЕРАНТІВ СОНЯШНИКА, ТРАНСФОРМОВАНИХ З ВИКОРИСТАННЯМ ШТАМУ LBA4404(pVi2E)

Незважаючи на багаторічні дослідження та досягнуті успіхи, проблема стресу/стійкості рослин до абіотичних чинників не втрачає своєї гостроти. Не в останню чергу цей факт є наслідком відсутності однозначних маркерів стійкості.

Серед біохімічних показників, які досліджуються під час різноманітних стресів, провідне місце займає вільний пролін з огляду на його різноспрямовану дію на рослинний організм. Як амінокислота, він є структурною складовою протеїнів. Вільний пролін у значних кількостях є сумісною сполукою при абіотичних стресах [1, 2]. Вважається, що як сигнальна і ре-

гуляторна молекула він бере участь у подіях, пов'язаних з ростом і розвитком [3]. При цьому пролін єдина амінокислота, що безпосередньо впливає на активність ферментів свого синтезу/деградації, - які є просторово розділеними. Тому зрозуміло, що одночасне поєднання тотожно або протилежно діючих факторів може суттєво змінювати очікуваний результат. Звідси неузгодженість фактів і суб'єктивність трактувань про акумуляцію вільного проліну.

Перспективним підходом у вивченні ролі проліну та отриманню біотехнологічних рослин із підвищеним рівнем стійкості є генетична інженерія. Раніше повідомлялось про одержання трансгенних рослин тютюну з супресором гена проліндегідрогенази (ПДГ) – ферменту деградації проліну [4, 5]. Такі рослини відзначались підвищеним рівнем даної амінокислоти, який корелював із стійкістю рослин до засолення, водного стресу, токсичної дії деяких іонів важких металів. В наших експериментах з генетичної трансформації соняшника (*Helianthus annuus L.*) з використанням агробактеріального штаму *LB4404*, що несе плазмиду *pBi2E* з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази, отримані регенеранти, які оцінювали за рівнем стійкості та вмістом вільного проліну.

Матеріали і методи

Agrobacterium-опосередковану трансформацію соняшника сорту Прометей проводили згідно протоколу, описаному нами раніше [6, 7]. Обеззброєний штам *LB4404* (*pBi2E*) люб'язно наданий к.б.н. Кочетовим О.В. (Інститут цитології і генетики Сибірського відділення Російської академії наук, Новосибірськ). Плазміда *pBi2E* одночасно з цільовим геном - супресором проліндегідрогенази (*erd5*) арабідопсіса містила селективний ген неоміцинфосфотрансферази (*nptII*) *E. coli*, який визначає стійкість до канаміцину. Первинний відбір імовірних трансформантів вели на середовищі з селективною концентрацією канаміцину (100 мг/л).

Рівень вільного проліну аналізували у регенерантів, які пройшли селективний відбір та контрольних варіантів за нормальних і стресових умов *in vitro*. Пролін вимірювався за методикою Чинарда із модифікаціями [8], суть якої полягає в тому, що при взаємодії проліну з нінгідринним реактивом, утворюється хромофор, який можна визначити колориметрично при $\lambda=520\text{nm}$. Наважку рослинної тканини гомогенізували в 10мл 3,0%-ного водного розчину сульфосаліцилової кислоти для осадження білків. Гомогенат відфільтровували через щільний фільтр з хромографічного паперу марки "М". До 2мл фільтрату додавали 2мл нінгідринного реактиву, приготовленого без нагрівання (1,25 нінгідрину, 30мл льодяної оцтової кислоти, 20мл 6М-ного розчину H_3PO_4) і 2мл льодяної оцтової кислоти. Реакційну суміш прогрівали протягом 1 години на водяній бані при температурі 100 °С, після чого реакційну суміш швидко охолоджували на льоду і переносили в діляльну воронку з 4,0мл толуолу. Струшували протягом 20 секунд. Нижній водний шар відкидали, а верхній – прозорий, забарвлений у рожево-малиновий ко-

лір, колориметрували у видимій області спектру ($\lambda=520\text{nm}$). Як контроль при колориметруванні використовували толуол. Стандартну криву будували по кристалічному проліну.

Водний стрес створювали додаванням до культурального середовища 0,4М маніта та за таких умов оцінювали вміст проліну в регенерантах, які витримували стресове навантаження.

Результати та обговорення

Оскільки рівень вільного проліну є динамічним показником, на початковому етапі роботи проводили порівняльний аналіз його вмісту в регенерантах соняшника одного й того ж віку, отриманих від експлантів, які піддавалися та не піддавалися *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації.

В таблиці 1 наведені дані, з яких видно, що регенеранти обох варіантів відзначалися помітною варіабельністю вмісту вільного проліну. При цьому різниця між максимальним і мінімальним абсолютними значеннями в контрольній групі (регенеранти без трансформації) складала близько 1,8 разів, а для регенерантів, отриманих після генетичної трансформації - 2,3 раза. Така різниця між варіантами була недостовірною. Очевидно, що коливання вмісту проліну не перевищували діапазону норми реакції. Це може свідчити про те, що процес *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації не є стресовим для соняшника або він пов'язаний з іншими механізмами адаптації. Крім того, відсутність достовірної різниці в рівні проліну між контрольними та дослідними варіантами, може бути пов'язана, по-перше, з різним рівнем експресії цільового гену, по-друге, – варіювання вмісту проліну може бути виразним лише у стресових умовах, по-третє, з огляду на динамічний характер рівня проліну в клітинах, імовірно неспівпадання періодів зростання/ зниження рівня амінокислоти у окремих регенерантів. Для встановлення останнього необхідний добовий моніторинг вмісту проліну.

Таблиця 1

Вміст вільного проліну в регенерантах соняшника, культивованих за нормальних умов (мг%/ г сирої маси)

№	Контроль	Регенеранти, отримані після трансформації
1	27, 79	35,26
2	22,36	29,49
3	42,31	18,92
4	37,15	33,58
5	33,91	44,38
6	23,65	32,62

Для визначення рівня вільного проліну в умовах стресу та перевірки стійкості до водного дефіциту регенеранти, які пройшли селективний відбір на канаміцині та регенеранти дикого типу відбирались довільно. Різниця між досліджуваними варіантами за вмістом проліну проявлялась впро-

довж розвитку водного стресу (Рис.). Регенеранти контрольної групи не витримували 14 добового осмотичного стресу. Це проявлялось у прогресуючому зниженні тургору листків з подальшим їх повним засиханням. Рівень проліну в їх листках був досить низький як на 6-ту, так і на 14-ту добу культивування. Імовірно пролін, який визначався в ході досліджу, був наслідком деградації пролін - містких протеїнів [9].

Регенеранти, отримані після генетичної трансформації, відзначались різним ступенем стійкості. Чутливі рослини аналогічно контролю гинули впродовж культивування. Стійкі організми, які витримали водний стрес *in vitro*, переносились на культуральне середовище без маніту для відновлення. Рівень проліну у таких рослин за стресових умов перевищував показники контрольного варіанту в 3 і більше разів.

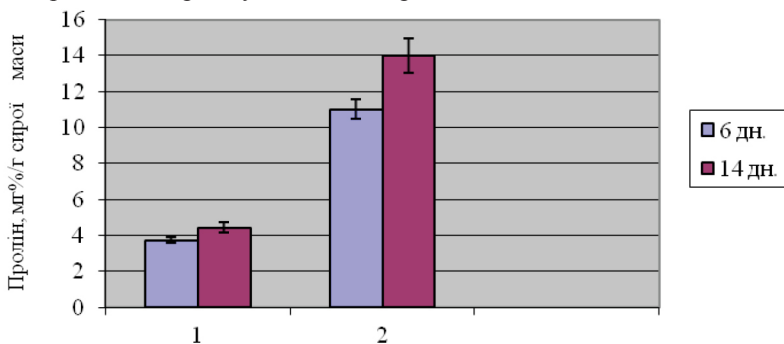


Рис. Вміст вільного проліну в регенерантах соняшника, культивованих за умов водного стресу. 1 – контроль; 2 – регенеранти, стійкі до селективної концентрації канаміцину.

Зростання проліну за стресових умов подія очікувана, а в нашому випадку адекватна, оскільки експресія дволанцюгового РНК-супресора гена проліндегідрогенази *erd5* арабідопсису може приводити до зниження рівня мРНК проліндегідрогенази в тканинах соняшника. Попередні наші дослідження показали, що з довільної вибірки стійких до канаміцину регенерантів соняшника сорту „Прометей” інтеграція цільового гена в його геном здійснювалася у близько 20%. Це пояснює факт того, що не усі регенеранти, які пройшли первинну селекцію, були стійкими до водного дефіциту.

Таким чином, методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації з використанням штаму *LBA4404*, що містить рВі2Е з дволанцюговим РНК-супресором гена проліндегідрогенази, отримано регенеранти соняшника, стійкі до водного дефіциту. Рівень вільного проліну в таких регенерантах в умовах стресу суттєво перевищував показники контролю, тоді як за нормальних умов культивування вміст цієї амінокислоти не відрізнявся у контрольних та трансформованих регенерантів.

Література

1. *Lehmann S., Funck D., Szabados L., Rentsch D.* Proline metabolism and transport development // *Amino Acid.* – 2010. – 4. – P.949-962.
2. *Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N. et al.* Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // *Current Sci.* – 2005. - V.88, № 3. – P.424-438.
3. *Szabados L.O., Savoure A.* Proline: a multifunctional amino acid // *Trends in plant science.* – 2009. – V.15, N2. - P.89 – 97.
4. *Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифанова Е.А., Шумный В.К.* Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // *Генетика.* – 2004. – т.40, №2. – С.282-285.
5. *Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В., Комарова М.Л., Романова А.В., Коваль В.С., Шумный В.К.* Оценка солеустойчивости растений табака *Nicotiana tabacum*, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // *Генетика.* 2006. Т. 42. С. 278-281
6. *Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н.* Индукция регенерации *in vitro* при *Agrobacterium* – опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // *Біотехнологія.* – 2010. – т.3, №4. – С.67-74.
7. *Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Морзун Б.В., Мужановская О.В., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н.* Оптимизация условий *Agrobacterium* – опосредованной трансформации инбредных линий подсолнечника // “Фактори експериментальної еволюції організмів”. - К.: ЛЮГОС.– 2010. - Том 9. - С. 274 – 280
8. *Андрющенко В.К., Саянова В.В., Жученко А.А. и др.* Модификация метода определения пролина для выявления засухоустойчивых форм *Lycopersicon Tomn.* // *Изв. АН МССР.* – 1981. – № 4. - С.55-60.
9. *Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y. et al.* Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed antisense transgenic *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* – 1999. – 18. – P.185-193.

Резюме

З використанням штаму *LBA4404* (pBi2E), що містить супресор гена проліндегидрогенази, отримані регенеранти соняшника, стійкі до водного дефіциту. Вміст вільного проліну цих регенерантів при стресі перевищував показник контролю більш ніж в 3 рази.

С использованием штамма *LBA4404* (pBi2E), содержащего супрессор гена пролиндегидрогенази, получены регенеранты подсолнечника, устойчивые к водному дефициту. Содержание свободного пролина у этих регенерантов при стрессе превышало показатель контроля более чем в 3 раза.

Using *LBA4404* (pBi2E) with gene suppressor of prolinedehydrogenase, the sunflower regenerates tolerant to water deficit were obtained. Under stress conditions the free proline levels of these plants exceeded those parameters of wild type at 3 and more times.

КОНВАЛЮК І.І.¹, ДРОБИК Н.М.², МЕЛЬНИК В.М.¹, ТВАРДОВСЬКА М.О.¹,
КРАВЕЦЬ Н.Б.², КУНАХ В.А.¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

² Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2

e-mail: drobyk.n@gmail.com

RAPD- ТА ISSR- АНАЛІЗ КУЛЬТУРИ ТКАНИН І ОРГАНІВ *GENTIANA LUTEA* L. У РІЗНИХ УМОВАХ ВИРОЩУВАННЯ

Під впливом умов вирощування *in vitro* в клітинах рослин виникають різноманітні структурно-функціональні перебудови геному. Найбільш значні зміни спостерігаються внаслідок дедиференціювання клітин і виявляються як на цитогенетичному, так і молекулярно-генетичному рівнях. Поряд із цим, геном культури органів, яка отримана без проходження клітинами стадії неорганізованого росту *in vitro*, є більш стійким. Також показано, що із збільшенням тривалості культивування масштабність перебудов зростає. Проте такі закономірності спостерігаються не завжди, і залежать від особливостей генотипу та умов вирощування [1]. Раніше нами досліджено мінливість генів 18S-25S рРНК у культурі тканин рідкісного лікарського високогірного виду *G. lutea* і показано, що змінюється довжина одного з повторів рДНК. Такі перебудови виникали на ранніх етапах культивування і потім лише підтримувалися у калюсі [2]. Метою даної роботи було дослідити особливості мінливості культури тканин і органів цього виду за допомогою RAPD- та ISSR-маркерів.

Матеріали і методи

Для досліджень взяли рослину *G. lutea* з пол. Лемська (хребет Чорногора Українських Карпат), яку розклонували на 5 культур: регенерант, одержаний шляхом прямого органогенезу *in vitro*; первинний калюс стеблового походження; шестимісячні морфогенний і неморфогенний та однорічний неморфогенний калюси кореневого походження; швидкоростучу культуру ізольованих коренів (рис. 1).

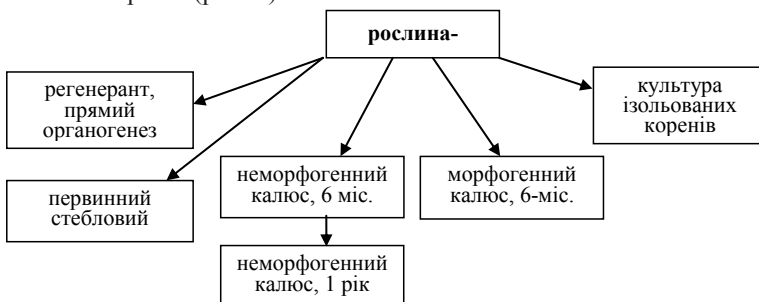


Рис. 1. Схема отримання досліджених культур тканин і органів *G. lutea*

Отримання і вирощування культури тканин та органів описано в роботах [3-5].

Виділення ДНК, гель-електрофорез продуктів ампліфікації, умови проведення полімеразної ланцюгової реакції з праймерами довільної послідовності (RAPD-ПЛІР) та ділянок геному, фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів (ISSR-ПЛІР), нуклеотидні послідовності використаних праймерів наведено у роботі [6].

Продукти ампліфікації ДНК культур тканин і органів порівнювали з такими вихідної двомісячної рослини-донора. Враховували чітко розрізнені відтворювані амплікони. На основі отриманих даних було розраховано генетичні відстані Жакарда (D_j) [7] та методом UPGMA побудовано дендрограму генетичної подібності досліджених зразків.

Результати та обговорення

Із використаних 27 RAPD- і 13 ISSR-праймерів 15 та 9 відповідно давали чіткі відтворювані спектри ПЛІР-продуктів і були відібрані для подальших досліджень. Загальна кількість ампліконів у випадку RAPD-аналізу складала 118 (7,9 на праймер), з яких 61 (51,7 %) виявилися мономорфними для усіх об'єктів; для ISSR-аналізу – 118 (13,1 на праймер), з яких 65 (55,1 %) – спільні. RAPD-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 258–1970 п.н., ISSR-праймери – 209-2075 п.н.

Загалом, електрофоретичні профілі культивованих тканин та органів, а також рослин-регенерантів були подібними між собою і з такими рослини-донора. Поряд із цим, у досліджених зразках наявні амплікони, що за розміром відрізнялися від фрагментів вихідного генотипу.

Розраховані генетичні відстані між зразками *G. lutea* представлено у таблиці.

На дендрограмі (рис. 2) зразки культури *in vitro* розподілились на два кластери: перший формували рослина-донор, первинний калюс та регенерант, отриманий шляхом прямого органогенезу, другий – морфогенний і неморфогенні калюси та культура ізольованих коренів.

Нами встановлено наступні особливості соматональної мінливості *G. lutea*.

Залежність від тривалості культивування. Генетичні зміни у калюсних тканинах виникали на ранніх етапах культивування і накопичувалися із збільшенням його тривалості. Зокрема, при порівнянні вихідного генотипу *G. lutea* та отриманих від нього калюсів різного віку виявлено, що вже на ранніх етапах (до шести місяців) у культурах відбуваються порівняно значні зміни, про що свідчать генетичні відстані за результатами обох аналізів. Суттєві зміни на ранніх етапах культивування виявлено у калюсах *G. lutea* і при використанні у якості генетичного маркера генів рРНК. Проте, рівень таких перебудов у подальшому залишався без змін [2]. Для двох генотипів іншого виду – *Gentiana pneumonanthe* – було показано, що із збільшенням тривалості культивування неморфогенних калюсів до 1-1,5 та 2-4 років змі-

Генетичні відстані за Жакардом між зразками культур *in vitro* *G. lutea*: RAPD-аналіз

№*	1	2	3	4	5	6	7
1	–						
2	0,071	–					
3	0,105	0,117	–				
4	0,308	0,255	0,295	–			
5	0,330	0,280	0,302	0,153	–		
6	0,269	0,214	0,223	0,140	0,191	–	
7	0,287	0,252	0,306	0,245	0,323	0,293	–
ISSR-аналіз							
№*	1	2	3	4	5	6	7
1	–						
2	0,050	–					
3	0,087	0,077	–				
4	0,262	0,236	0,231	–			
5	0,297	0,288	0,283	0,172	–		
6	0,255	0,212	0,224	0,137	0,252	–	
7	0,290	0,264	0,243	0,214	0,272	0,206	–

Примітка. * 1 – рослина-донор, з якої отримано: 2 – регенерант, одержаний шляхом прямого органогенезу, 3 – первинний стебловий калюс, 4, 5 – шестимісячний та однорічний неморфогенні калюси відповідно, 6 – шестимісячний морфогенний калюс, 7 – культура ізольованих коренів.

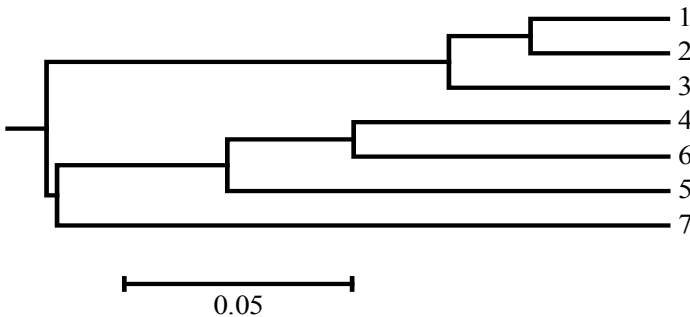


Рис. 2. Дендрограма генетичної подібності зразків культури тканин і органів *G. lutea* за результатами RAPD- та ISSR-аналізів. Нумерація зразків така ж як у табл.

ни накопичувалися, але меншими темпами у порівнянні із *G. lutea* [6]. У цілому, отримані нами результати узгоджуються із наявними літературними даними, за якими більшість перебудов геному відбуваються у процесі дедиференціації та на ранніх етапах культивування під час формування клітинних популяцій [1]. Збільшення кількості пасажів та їхньої тривалості підвищує швидкість виникнення та рівень соматональних змін у калюсних культурах [8].

Залежність від типу росту культури. Виявлено невеликі генетичні дистанції між морфогенними і неморфогенними культурами тканин за однакової тривалості вирощування. Рослина-регенерант, отримана шляхом прямого органогенезу, за генетичними відстанями була найближчою до вихідного генотипу, ці зразки на дендрограмі розподілились в одну групу. У той же час, культура ізольованих коренів була генетично віддаленою як від вихідного генотипу, так і від калюсів та регенеранта. У випадку *G. pneumonanthe* зміни, що відбувалися в ізольованих коренях за 4-6 тижнів вирощування, за своїм розмахом співрозмірні зі змінами у 2-3-річних неморфогенних калюсах [6]. Очевидно, такі значні зміни у цій культурі обох видів можна пояснити інтенсивним темпом поділу її клітин, що підтверджується літературними даними [8].

Результати RAPD- та ISSR-аналізу показали, що рівень соматональної мінливості *G. lutea* за середніми значеннями D_j був приблизно у 1,5 раза меншим за внутрішньопопуляційну варіабельність (неопубліковані дані). Подібні результати отримані для *G. pneumonanthe*, мінливість у культурі *in vitro* якої також була меншою (у 1,5-2 рази) за внутрішньопопуляційну [6]. Рівень соматональної мінливості (за результатами RAPD-аналізу) у культурі тканин трьох інших видів тирличів – *G. acaulis*, *G. cruciata* і *G. punctata*, був подібним до генетичних дистанцій між рослинами цих видів всередині популяцій [9].

Висновки

RAPD- та ISSR-аналіз культури тканин і органів *G. lutea* показав, що рівень мінливості був найменшим у рослини-регенеранта, а найбільшим – в 1-річній неморфогенній культурі та культурі ізольованих коренів, проте не виходив за межі внутрішньопопуляційного поліморфізму. Соматональні зміни у калюсних тканинах виникали на ранніх етапах культивування і накопичувалися із збільшенням його тривалості. Генетична дистанція між морфогенним і неморфогенним калюсами одного віку була значно меншою, ніж їхні відстані до рослини-донора, що свідчить про більший вплив на геном процесів дедиференціації, ніж морфогенезу.

Література

1. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 724 с.

2. Мельник В.М., Спірідінова К.В., Андрєєв І.О., Страшнюк Н.М., Кунах В.А. Варіабельність ядерної 18S-25S рДНК *Gentiana lutea* L. в природі та в культурі тканин *in vitro* // Цитологія і генетика. – 2004. – Т.38, №3. – С. 16-21.

3. Конвалюк І.І., Грицак Л.Р., Мельник В.М., Дробик Н.М., Кунах В.А. Отримання та характеристика культури ізольованих коренів рослин роду Тирлич (*Gentiana* L.) // Біотехнологія – 2011. – Т.4, №3. – С. 29-35.

4. Конвалюк І.І., Кравець Н.Б., Дробик Н.М., Мельник В.М., Кунах В.А. Прямий органогенез *in vitro* тирличу жовтого (*Gentiana lutea* L.) // Біотехнологія – 2010. – Т.3, №5. – С. 66-72.

5. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т.36, №4. – С. 327-334.

6. Конвалюк І.І., Мельник В.М., Дробик Н.М., Кравець Н.Б., Твардовська М.О., Кунах В.А. RAPD- та ISSR-аналіз генетичної мінливості у культурі тканин та органів тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т.9, № 1. – С. 22-31.

7. Schluter P. M., Harris S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // Molecular Ecology Notes. – 2006. – №6. – P. 569-572.

8. Bairu M. W., Aremu A. O., Staden J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // Plant Growth Regul. – 2011. – Vol. 63. – P. 147-173.

9. Твардовська М.О., Дробик Н.М., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Кунах В.А. Геномна мінливість деяких видів роду *Gentiana* L. У природі та в культурі *in vitro*: RAPD-аналіз // Biopolym. Cell. – 2010. – Vol. 26, №6. – P. 499-507.

Резюме

Досліджено особливості соматоклональної мінливості у культурі тканин і органів тирличу жовтого (*Gentiana lutea* L.) з використанням RAPD- та ISSR-маркерів. Показано залежність змін геному від типу росту культури; у випадку калюсних тканин – від тривалості вирощування, морфогенних культур – від швидкості їхнього росту.

Изучены особенности соматоклональной изменчивости в культуре тканей и органов горечавки желтой (*Gentiana lutea* L.) с использованием RAPD- и ISSR-маркеров. Показана зависимость изменений генома от типа роста культуры; в случае каллусных тканей – от длительности выращивания, морфогенных культур – от скорости их роста.

Details of somaclonal variability in yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) tissue and organ culture using RAPD- and ISSR-markers have been studied. Dependence of the genome changes on the type of culture growth was demonstrated; in case of callus tissues former depended on duration of culturing, in case of morphogenic cultures – on the rate of their growth.

КОРНЯ Т.М., ЗАМБРИБОРЩ И.С., ЛОБАНОВА Е.И., ШЕСТОПАЛ О.Л., ДОБРОВА А.А.

*Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины
Украина, 65036, Одесса, ул. Овидиопольская дор., 3
e-mail: IZambriborsh@gmail.com*

ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *EUSTOMA GRANDIFLORUM* SHINN.

Эустома (*Eustoma grandiflorum*) или лизиантус – один из декоративных видов растений, представляющий на сегодняшний день коммерческую ценность [5, 6, 9]. Особенность данного растения заключается не только в красоте цветка, но и в способе его получения. Как правило, сорта *E. grandiflorum* представляют собой гибриды первого поколения F_1 , обладающие гибридной силой, которая проявляется в размере цветоноса. Размножение естественным путём – семенами у данного вида весьма трудоемкий процесс, имеющий свои недостатки. Семена F_1 *E. grandiflorum* – дорогостоящие, имеют микроскопические размеры, их прорастание требует особых климатических условий и может длиться до двух месяцев, к тому же, не всегда проходит успешно. Соответственно, получение взрослых цветущих растений требует значительных материальных затрат. Поэтому на практике цветоводам предпочтительнее использовать готовую рассаду лизиантуса и доращивать её до фазы цветка, минуя этап прорастания.

Исходя из вышеизложенного, с целью закрепления гетерозиса растений эустомы F_1 целесообразно применять методы вегетативного размножения. В условиях *in vivo* размножение растений *E. grandiflorum* F_1 делением побегов или черенкованием является малоэффективным. Поэтому метод клонального микроразмножения *in vitro* – единственный рациональный путь массового получения идентичных материнскому организму клонов F_1 в короткие сроки [8]. С этой целью в данной работе были изучены особенности клонального микроразмножения *in vitro* и получения посадочного материала у представителя *E. grandiflorum*.

Материалы и методы

В качестве эксплантов использовали чашеложу цветка, междуузлия и стеблевые сегменты *E. grandiflorum*, взятые в период цветения. Экспланты стерилизовали в несколько этапов. Первичное очищение растительной поверхности проводили с помощью хозяйственного мыла. Далее завернутые в марлю экспланты помещали в стерильные чашки Петри и выдерживали 40 минут в 50 % растворе гипохлорита натрия («Белизна»), а затем 10 минут в стерильном растворе 0,05 Н гидрохлорида (HCl). На последнем этапе экспланты промывали стерильной дистиллированной водой 4 раза.

Эксплантацию проводили на питательную среду по прописи Murashige и Skoog [7, 8] с добавлением 2 мг/л БАП. Экспланты культивировали в темноте при 24 °С в течение 1,5-2 месяцев до появления хорошо сформирован-

ного каллуса на поверхности срезов эксплантов, после чего их помещали на свет с фотопериодом 16 часов/сутки до появления регенерантов. Сформировавшиеся микрорастения высаживали на подобранную для растений эустомы питательную среду без фитогормонов для естественного корнеобразования и адаптации. В опытных вариантах с целью изучения морфогенеза микрорастения высажены на варианты сред с добавлением 0,1; 0,5 и 1 мг/л гибберелловой кислоты (ГК), отдельно цитокинина БАП – 0,5 мг/л и ауксина НУК – 0,1 - 0,5 мг/л.

Результаты и обсуждение

По результатам стерилизации эксплантов *E. grandiflorum* показано, что в среднем от 20 до 50 % эксплантов способны выдерживать используемый нами метод стерилизации и формировать каллус. Более щадящая стерилизация с использованием раствора гипохлорита натрия в концентрации менее 50 % и экспозицией менее 40 минут не может обеспечить стерильность культуры. Поэтому проблема введения в культуру и подбора способов стерилизации остаётся актуальной.

На срезах выживших после стерилизации эксплантов уже через 3-4 недели формируется каллус, из которого в среднем регенерирует от 7 до 20 микрорастений (на один эксплант) за период культивирования 60-100 дней в присутствии 2 мг/л БАП. В культуре *in vitro* лизиантуса наблюдается регенерация микрорастений из каллуса еще на первичной питательной среде при перемещении эксплантов из темноты на свет. Формирование каллуса и затем микрорастений, в большей мере, наблюдали из стеблевых фрагментов эустомы, в сравнении с чашеლოжем и междоузлиями.

Пассажи сформированных микрорастений на среды MS и ½ MS показали, что компонентный состав данных сред является неэффективным. На среде MS с полным набором минеральных солей наблюдали остановку в росте, неспособность к формированию корневой системы даже с применением ауксина НУК. Также наблюдали формирование большого количества мелких нежизнеспособных растений, имеющих укороченные междоузлия и мелкие загибающиеся к низу плотные либо обводненные листья. Данный факт свидетельствует о слишком высокой для данного растения концентрации минеральных солей в питательной среде [1, 3]. Уменьшение солей в два раза приводило к незначительному улучшению состояния растений. Улучшенными стали листовые пластинки, однако культивируемые растения оставались с укороченными междоузлиями, а листья сильно вытягивались, что говорит о неправильном балансе N : P : K [1, 3, 4]. Дальнейшие модификации питательной среды по макроэлементам позволили найти необходимый баланс питательных веществ для микрорастений лизиантуса. Подобранный состав среды привел к значительному улучшению качества микрорастений эустомы, а также к улучшению самой технологии размножения в целом.

Благодаря новому составу питательной среды со сбалансированным соотношением N : P : K после соматического эмбриогенеза на этапе адаптации и ризогенеза микрорастения *E. grandiflorum* способны непрерывно расти, что технологически является удобным для дальнейшего микрочеренкования и постоянного получения растительной продукции. Также данный способ применим для длительного поддержания и одновременного размножения культуры лизиантуса в течение необходимого периода с целью сбыта продукции в конкретный сезон (рис.1).

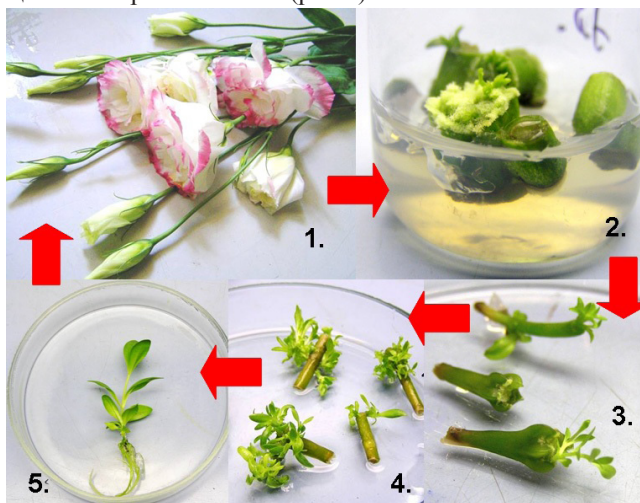


Рис. 1. Особенности морфогенеза *E. grandiflorum* в культуре *in vitro*: 1 - *E. grandiflorum*; 2 - введение в культуру *in vitro*, индукция каллуса; 3 - начало регенерации; 4 - формирование микрорастений; 5 - адаптация и укоренение микрорастений

Используя новую питательную среду со сбалансированными минеральными солями, тестирование чувствительности сформированных микрорастений лизиантуса к таким фитогормонам как БАП, НУК и ГК [2] показало, что использование БАП и НУК в питательной среде даже в низких концентрациях отрицательно влияет на рост, развитие и дальнейшую адаптацию растений к условиям почвы. Однако использование ГК в качестве стимулятора роста растений показало наиболее хороший результат. Так, при добавлении гибберелловой кислоты (0,05-0,1 мг/л) наблюдается формирование корневой системы уже на 10-14 сутки культивирования микрорастений. Заметно ускоряется рост и улучшается процесс адаптации к почвенным условиям, в сравнении с контрольными образцами, выращиваемыми без ГК (рис.2).

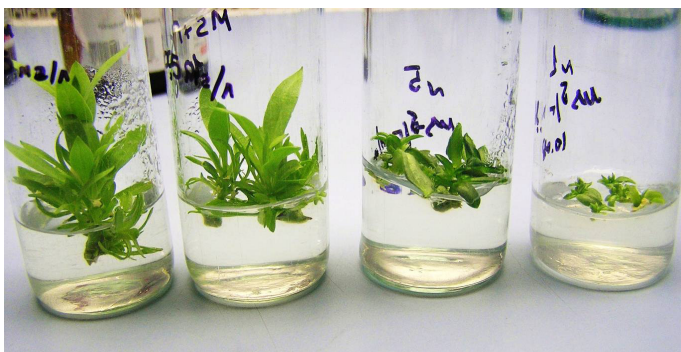


Рис. 2. Изучение фитогормональной регуляции в культуре *in vitro* *E. grandiflorum*:
 1 - ГК 1 мг/л; 2 - ГК 0,5 мг/л; БАП - 0,5 мг/л; НУК - 0,5 мг/л.

В целом, исходя из полученных результатов, технология клонально-микроразмножения *E. grandiflorum* представляет собой несколько этапов. Во-первых, введение в культуру *in vitro* стеблевых эксплантов. Коэффициент размножения на данном этапе составил 7-15 растений из одного стеблевого сегмента размером 1,5-2 см за период 100 дней. При дальнейшем микрочеренковании полученных растений коэффициент размножения составил 3-4 растения/месяц или ≈ 500 тыс. растений в год на питательной среде без гормонов со сбалансированным соотношением макроэлементов N : P : K в питательной среде. Использование ГК (0,05-0,1 мг/л) в питательной среде повышает коэффициент размножения микрочеренкованием до 4-5 растений/месяц или ≈ 1 млн. растений в год. Заключительный этап – формирование корневой системы у микрорастений *E. grandiflorum*, который занимает 10-14 дней. По нашим подсчетам материальные затраты на производство одного микрорастения в месяц по электроэнергии (Украина – 0,1 \$/КВт) составляет 0,017 \$/растение. По химическим реактивам (Sigma) в среднем составляет – 0,024 \$/растение. В сумме затраты на производство одного растения в месяц – 0,04 \$. Стоимость готовой продукции на рынках Украины составляет 0,375 \$ /растение *E. grandiflorum*.

Выводы

1. Разработана среда с измененным балансом N : P : K. Проведен сравнительный анализ формирования регенерантов и их роста на средах MS, 1/2 MS и разработанной нами среды для эустомы. На среде со сбалансированным содержанием N : P : K отмечено формирование жизнеспособных растений, которые успешно адаптируются к почве. 3. Показано, что гибберелиновая кислота в концентрации 0,05 – 0,1 мг/л стимулирует корнеобразование и рост побегов. 4. Разработана эффективная биотехнология непрерывного микроклонального размножения эустомы.

Литература

1. Бентли М. Промышленная гидропоника. [перевод с англ. В.Н. Былова]. – М.: «Колос». – 1965. – 376 с.
2. Регуляторы роста растений : [под ред. акад ВАСХНИЛ Г. С. Муромцева]. – М.: «Колос», 1979. – 279 с.
3. Чесноков В.А. Выращивание растений без почвы / Чесноков В.А., Базырина Е.А., Бушуева Т.М., Ильинская Н.Л. – Л.: изд-во Ленинградского университета. – 1960. – 163 с.
4. Frett J. J. Optimizing nitrogen and calcium nutrition of lisianthus / J. J. Frett; J. W. Kelly; B. K. Harbaugh; M. Roh // Communications in Soil Science and Plant Analysis. – January 1988. – Volume 19, Issue 1. – P. 13 – 24.
5. Fucai S. Multiple Shoot Regeneration from Root Cultures of Prairie Gentian (*Eustoma grandiflorum*) / Seiichi FUKAI, Masanori GOI, Michio TANAKA, Hajime FURUKAWA // Root cultures of pairie gentian, Tech Bull Fac Agr Kagawa Univ. – 1991. – Vol 43, No 1. – P. 31-34.
6. Furucawa H. Shoot regeneration from the Roots of Prairie Gentian (*Eustoma grandiflorum* (Griseb.) Schinners) / Hajime Furacawa, Chichiro Matsubara, Norigiro Shigematsu // Plant Tissue Culture Letters. – 1990. – 7(1). – P. 11-13.
7. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / Murashige T. and Skoog F. // Physiol Plant. – 1962. – 15(3). – P. 473-497.
8. Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants: [Edited by S. Mohan Jain and Sergio J. Ochatt]. – University of Helsinki, Helsinki, Finland and Institut National de la Recherche Agronomique, Umrleg, PCMV, Dijon, France: «Humana Press» – 2010. – 400 p.
9. Salvador E.D. Physical characteristics of soilless growing media: basis for the development of methods to formulate substrates for ornamental plants in Brazil / ED Salvador, J. Balas // Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, Advances and Topical Issues. – Volume III. – P. 161-171.

Резюме

Разработана эффективная биотехнология микрочеренкования *in vitro* *E. grandiflorum*. Создана среда с оптимальным, для данного растения, балансом N : P : K. Исследовано влияние фитогормонов на процессы регенерации, роста и адаптации к почве эустомы. Показано, что оптимальным является использование гиббереллиновой кислоты в концентрации 0,05-0,1 мг/л.

Розроблено ефективну біотехнологію мікрочивкування *in vitro* *E. grandiflorum*. Створено середовище з оптимальним, для даної рослини, балансом N : P : K. Досліджено вплив фітогормонів на процеси регенерації, росту та адаптації до ґрунту лізантуса. Показано, що оптимальним є використання гіберелової кислоти в концентрації 0,05-1 мг/л.

Effective biotechnology for *E. grandiflorum* micricutting *in vitro* were elaborated. There was created a medium with the optimal for this plant N:P:K balance. Phytohormones influence on the process of lisantus regeneration, growth and adaptation to the soil. There was shown that Gibberellic acid with concentration 0.05-0.1 mg/l is optimal.

**КРАСНОВ М. С., **АГИЛЬОН-ГУТИЕРРЕС Д. Р., *РЫБАКОВА Е.Ю.,
*ЯМСКОВА В.П., **БУРЛАКОВА О. В., ЯМСКОВ И.А., **ГОЛИЧЕНКОВ В. А.**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28 e-mail: embbrmsk@mail.ru

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26*

***Биологический Факультет, МГУ им. М. В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕМБРАНОТРОПНЫХ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА РЕГЕНЕРАТЫ КОНЕЧНОСТЕЙ АМФИБИЙ

В данной работе исследовали биорегуляторы, выделенные из сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) и кости крысы, принадлежащие к группе мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ), которые были обнаружены в различных тканях животных и растений (Ямскова и др., 2012). Биорегуляторы данной группы стимулируют процессы восстановления и репарации в патологически измененных тканях, как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo* (Ямскова и др., 2009; Стречий и др., 2011). Изучение процессов регенерации у позвоночных животных является актуальной проблемой современной биологии развития. Удобным объектом для изучения процессов регенерации являются амфибии – поскольку у них данные процессы наиболее выражены, по сравнению с высшими позвоночными. Показано, что хвостатые амфибии во взрослом состоянии могут регенерировать полностью морфологически функциональные конечности и ткани утраченных органов. При этом бесхвостые амфибии сохранили способности к полной регенерации конечностей только на ранних стадиях развития (до метаморфоза), на более поздних стадиях, если и регенерирует конечность, то уже лишь в виде морфологически и функционально не развитой спиккулы.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния МГТБ, выделенных из сыворотки крови и костной ткани млекопитающих, на регенерацию конечностей амфибий.

Материалы и методы

Биорегуляторы выделяли по разработанной ранее методике (Yamskova et al., 2007). В качестве объектов исследования были использованы шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis* Daudin) и испанский тритон (*Pleurodeles waltl* Michahelles). Эксперименты по действию МГТБ на регенерацию конечности *Xenopus laevis in vivo* на стадии 64 (конец метаморфоза). Лягушки были наркотизированы 0,3-% раствором MS-222, а затем у них были ампутированы правые задние конечности в проксимальной области бедра на уровне стило-

пода. Плоскость ампутации проходила перпендикулярно проксимо-дистальной оси конечности. Были сформированы 4 группы: Группа 1: (8 лягушек) вводили по 0,5 мкл МГТБ сыворотки крови КРС (концентрация 10^{-2} мг/мл); Группа 2: (10 лягушек) вводили по 0,5 мкл МГТБ кости крыс (концентрация 10^{-12} мг/мл); Группа 3: (7 лягушек) вводили по 0,5 мкл физиологического раствора; Группа 4: (6 лягушек) Контроль – не проводили инъекций. Раствор МГТБ и физиологический раствор вводили в область бластемы три раза в неделю в течение двух месяцев. Эксперименты по действию МГТБ на регенерацию конечности испанского тритона *Pleurodeles waltl in vitro*. Были использованы взрослые тритоны, их наркотизировали в MS-222, а затем были ампутированы у них левая задняя конечность на уровне голени и хвост на расстоянии 15 мм от конца. Образующиеся регенераты конечности на стадии образования трех-четырех пальцев (2) и хвоста на 40 день после ампутации (IV-V стадии) удаляли у анестезированных животных, дезинфицировали этиловым спиртом и помещали в темные флаконы с 4 мл культуральной среды для амфибий (контроль) или со средой, в которую было добавлено 40 мкл одного из МГТБ (опыт). Перед использованием среда проходила холодную стерилизацию через фильтры (0.22 мкм поры). Состав среды для культивирования: Среда 199 - 350 мл., дистиллированная вода -150 мл., Буффер HEPES 1M - 150 мкл., Гентамицина сульфат 4% - 1 мл., Антибиотик и антимикотик SIGMA - 5 мл., Эмбриональная телячья сыворотка - 50 мл. Было использовано роллерное культивирование: Roller RM5 Assistant, Germany. 35 оборот/мин, (22 °C) в течение 12 дней для конечностей и 14 дней для хвостов. Среду для культивирования меняли каждые 3 дня. После этого, регенераты были зафиксированы в Буэне для дальнейшего приготовления гистологических срезов.

Результаты и обсуждение

В условиях *in vivo*, сывороточный МГТБ в большой концентрации (0,01 мг/мл), а костный МГТБ в СМД (10^{-12} мг/мл), стимулируют регенерацию задней лапы лягушки после ампутации в проксимальной области бедра (Рис. 1).

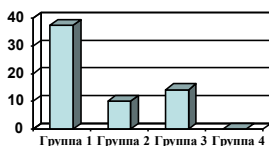
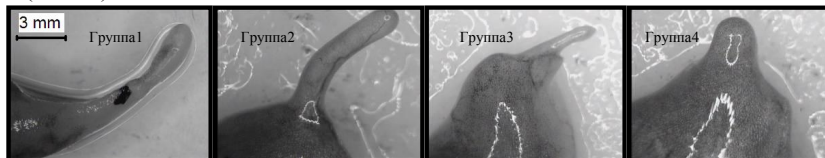


Рис. 1. Результаты через 2 месяца, после ампутации конечности у лягушки в проксимальной области. Группа 1 - МГТБ сыворотки крови 10^{-2} мг/мл; группа 2 - МГТБ кости 10^{-12} мг/мл; группа 3 - физ. раствор; группа 4 – контроль. На диаграмме по оси ординат - % регенераций конечности в каждой группе.

На рис. 2 представлены продольные срезы регенератов задней конечности тритона на стадии формирования 3-х пальцев.

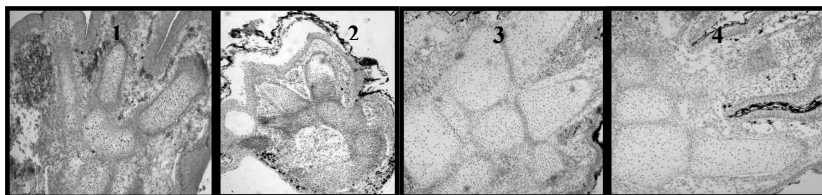


Рис. 2. Регенераты конечности тритона: 1 – без культивирования; 2 - культивирования (контроль); 3 – после культивирования с МГТБ кости (10^{-16} мг/мл); 4 – после культивирования с МГТБ сыворотки крови (10^{-2} мг/мл).

Хорошо выражены хрящевые структуры, соответствующие сформировавшимся пальцам, регенерат покрыт многослойным эпителием, между хрящевыми структурами наблюдаются мезенхимоподобные клетки, коллагеновые волокна, сосуды. Под эпителием и в мезенхиме наблюдаются небольшие скопления пигментированных клеток. При культивировании регенератов в условиях роллерного вращения в течение 12 суток в среде культивирования для амфибий (контроль) выявлена гибель хондроцитов и нарушение структуры формирующегося хряща в области формирования пальцев. В мезенхиме наблюдается много сосудов, наполненных эритроцитами, самих мезенхимных клеток и волокон коллагена практически не наблюдается. Эпителий слущивается, в нем присутствует много гибнущих клеток. В общем можно наблюдать картину воспаления и дегенерации в тканях регенерата. Пигментированные клетки представлены скоплениями в мезенхиме, под эпителием их не наблюдается. При добавлении в среду культивирования МГТБ сыворотки крови млекопитающих наблюдали различную картину при высоких концентрациях МГТБ и МГТБ в СМД. В случае действия МГТБ сыворотки крови в СМД наблюдали гибель хондроцитов и изменение структуры хряща. Эпителий слущивался, под ним находились небольшие скопления пигментированных клеток. В мезенхимной ткани немногочисленные фибробластоподобные клетки и сосуды, коллагеновых волокон не наблюдается. В целом картина немного лучше, чем в контроле. При использовании МГТБ сыворотки крови в высоких концентрациях структура хрящевой ткани поддерживалась жизнеспособной (много хондроцитов и хорошо развит хрящевой матрикс), вокруг хряща были кровеносные сосуды. В мезенхиме наблюдали фибробластоподобные клетки. Эпителий практически не слущивался, под ним видны небольшие скопления пигментированных клеток. Наиболее выраженный протекторный эффект на ткани регенератов оказал МГТБ кости. При добавлении МГТБ кости в СМД вокруг хряща образуются крупные сосуды, заполненные клетками крови. В мезенхиме много фибробластоподобных клеток, кое-где видны мышечные элементы, коллагеновые волокна не выражены. Под эпителием

располагаются скопления пигментированных клеток, а также видны под-кожные железы. МГТБ сыворотки крови в концентрации 10^{-2} мг/мл обладал протекторным действием на состояние тканей регенерирующей конечности тритона *Pl. waltil* при условии ее роллерного культивирования *in vitro*, но и в СМД это действие сохранялось, но проявлялось менее, особенно в отношении хрящевой ткани. МГТБ кости в концентрации 10^{-16} мг/мл обладал выраженным протекторным эффектом на состояние тканей регенерирующей конечности тритона *Pl. waltil* при условии ее роллерного культивирования *in vitro* (особенно на поддержание жизнеспособности и структуры хрящевой ткани). При воздействии МГТБ на культуры регенератов хвостов тритона наблюдали схожую картину (Рис. 3).

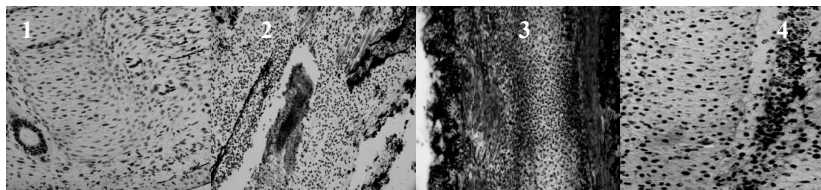


Рис. 3. Регенераты хвостов тритона: 1 – без культивирования; 2 - после культивирования (контроль); 3 – после культивирования с МГТБ сыворотки крови (10^{-2} мг/мл); 4 – после культивирования с МГТБ кости (10^{-14} мг/мл)

МГТБ, выделенный из сыворотки крови, в высокой концентрации обладал морфогенетическим действием на ткани регенерата хвоста тритонов, которое выражалось в том, что состояние культивируемых регенератов хвостов тритонов приближалось к состоянию интактного регенерата, т.е. структура хряща полностью сохранялась, и наблюдали сегментацию хряща, характерную для данной стадии, отсутствовала гибель хондроцитов, элементы спинного мозга и мышечные волокна хорошо выражены, зрелые железы вырабатывают много секрета, в корииуме присутствует много малодифференцированных клеток, пигментные клетки образуют небольшие скопления. В СМД сохранялся протекторный эффект сывороточного МГТБ на все ткани регенерата хвостов тритонов, однако он был менее выражен, чем в высокой дозе. МГТБ, выделенный из костной ткани, в СМД способствовал поддержанию жизнеспособности клеток хрящевой ткани и сохранению её гистоструктуры, т.е. проявлял тканеспецифическое протекторное действие. Однако в высоких концентрациях он не обладал такой активностью. При этом в обеих концентрациях данный МГТБ оказывал сходный протекторный эффект на другие ткани регенерата, отличный от контроля. Таким образом, было показано, что действие биорегуляторов в СМД на состояние регенерата хвоста тритона в культуре *in vitro* отличается от их действия в высоких концентрациях. Полученные результаты показывают, что в основе действия биорегуляторов в СМД и в высоких концентрациях лежат разные механизмы. Учитывая внеклеточную локализацию биорегу-

ляторов данной группы, а также их мембранотропную активность, можно предположить, что триггерный механизм действия этих веществ, контролирующей каскады развивающихся далее сопряженных реакций, может различаться при воздействии разных концентраций биорегуляторов. В СМД МГТБ кости обладает тканеспецифическим действием, поддерживая жизнеспособность клеток и структуру хряща, а в более высокой концентрации данный МГТБ проявляет протекторное свойство в отношении тканей регенерата, но не оказывает влияния на хрящевую ткань. МГТБ сыворотки крови в высоких концентрациях проявляет морфогенетическую активность, а в СМД - поддерживает жизнеспособность соединительнотканых элементов *in vitro*. В условиях *in vivo*, сывороточный МГТБ в большой концентрации (0,01 мг/мл), а костный МГТБ в СМД (10^{-12} мг/мл), стимулируют регенерацию задней лапы лягушки после ампутации в проксимальной области бедра. Это может указывать, что стимулирующее репарации действие МГТБ проявилось в тех условиях, когда регенерационная способность наиболее низка. При воздействии МГТБ сыворотки крови в одном случае развивалась конечность, на которой произошло морфологическое образование пальца с когтем.

Выводы

МГТБ сыворотки крови в концентрации 10^{-2} мг/мл обладал выраженным действием на регенерацию *in vivo* конечности *Xenopus laevis* при ампутации ее в проксимальной области. МГТБ кости в концентрации 10^{-16} мг/мл обладал выраженным протекторным эффектом на состояние тканей регенерирующей конечности и хвоста тритона *Pl. waltil* при условии их роллерного культивирования *in vitro* (особенно на поддержание жизнеспособности и структуры хрящевой ткани). МГТБ сыворотки крови в концентрации 10^{-2} мг/мл обладал протекторным действием на состояние тканей регенерирующей конечности и хвоста тритона *Pl. waltil* при условии их роллерного культивирования *in vitro*.

Литература

1. Стрецький Г.М., Краснов М.С., Рыбакова Е.Ю., Авдеенко О.Е., Тихонов В.Е., Шайхалиев А.И., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Исследование влияния композиции на основе хитозанового геля и биорегулятора сыворотки крови на заживление гнойных ран у мышей // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2011. № 4. с. 211-214.
2. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения // Изд. Макс Пресс: 2009. 82с.
3. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов // Изд. Lambert Academic Publishing. 2012. 127p.
4. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., et al // Biochemical physics frontal research / Eds. S.D. Varfolomeev et al. NY, 2007. P. 61-69.

Резюме

Биорегулятор, выделенный из сыворотки крови быка стимулирует регенерацию конечности у амфибий *in vivo*. Биорегуляторы, выделенные из сыворотки крови быка и кости крысы обладают протекторным действием на состояние тканей регенерирующей конечности и хвоста тритона *Pl. waltl* при условии их роллерного культивирования *in vitro*.

Bioregulator isolated from bovine serum stimulates the regeneration of limbs in amphibians *in vivo*. Bioregulators, isolated from bovine serum and bones of rats have a protective effect on the state of the tissue regenerating limb and tail newt *Pl. waltl*, subject to the roller culture *in vitro*.

Биорегулятор, виділений із сироватки крові бика стимулює регенерацію кінцівки в амфібій *in vivo*. Біорегулятори, виділені із сироватки крові бика і кістки щура мають протекторну дію на стан тканин регенеруючої кінцівки і хвоста тритона *Pl. waltl* за умови їх роллерного культивування *in vitro*.

КРУГЛОВА А.Е.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии Уфимского научного центра РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: kruglova@anrb.ru

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ БОРЕЦА СЕВЕРНОГО *ACONITUM SEPTENTRIONALE KOELLE*

Борец северный (синоним: аконит высокий) *Aconitum septentrionale* Koelle (синоним: *Aconitum lycoctonum* L.), многолетнее растение из семейства Лютиковых, представляет значительную ценность для фармакологии. В корневищах этого растения содержится ряд активных алкалоидов и в том числе лаппаконитин – действующее вещество высокоэффективного препарата аллапинин. Именно борец северный – единственный сырьевой источник производимого в Российской Федерации препарата аллапинин, предназначенного для регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы человека. В настоящее время этот антиаритмический препарат прошел клинические испытания и разрешен к производству. Кроме того, аллапинин запатентован в США, Японии и Германии [1].

Ареал распространения борца северного в России – главным образом, Южный Урал [2-4].

Несмотря на то, что борец северный достаточно широко распространен на Южном Урале, массовый сбор сырья (корневищ) для нужд фармакологии ведет к тому, что это растение может попасть в категорию исчезающих видов. Ситуация осложняется еще и тем, что в корневищах растений, произрастающих на большей части ареала, отмечается низкое содержание лаппаконитина, что делает нерентабельной их заготовку как сырья для производства препарата аллапинин. Более того, массовый сбор корневищ боль-

шими группами, как правило, неквалифицированных сборщиков наносит существенный урон всему растительному покрову региона сбора. В то же время места сбора корневищ с высоким и супервысоким содержанием лап-паконитина приурочены к малонаселенным горным или таежным районам [5].

Таким образом, разработка альтернативных способов расширения сырьевой базы для производства ценного лекарственного средства аллапинин весьма актуальна и имеет несомненный выход в инновационную практику.

Одно из перспективных направлений в этой области – микрклональное размножение борца северного в культуре *in vitro*. Данный метод позволяет быстро размножить ценный генотип растения; получать в больших количествах вегетативное потомство (клоны); работать в лабораторных условиях круглый год; получать растения клоны к определенному сроку; длительно хранить «пробирочные» растения при пониженных температурах, создавая «банк» ценных форм растений [6].

Цель исследования состояла в разработке принципиальных этапов способа клонального микроразмножения *in vitro* растений борца северного.

Материал и методы

В качестве исходного материала использовали генеративные растения борца северного – суперпродуценты лаппаконитина.

Ранее было установлено, что растения борца северного, содержащие в корневищах лаппаконитин в среднем в 5-7 раза выше, чем обычные растения, характеризуются рядом морфологических признаков (know how ИБ УНЦ РАН, свидетельство № 34/2000). Во время экспедиционных выездов по Южному Уралу сотрудники лаборатории экологии растительных ресурсов Института биологии Уфимского НЦ РАН (заведующий лабораторией – д.б.н. Н.И. Федоров) на основании морфологических показателей отобрали в природных популяциях генеративные растения борца северного – суперпродуценты лаппаконитина и любезно предоставили их в наше распоряжение. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии корневища таких растений предварительно проанализировали с целью выявления содержания лаппаконитина.

В работе использовали корневищные почки растений – суперпродуцентов лаппаконитина. Способ клонального микроразмножения борца северного в условиях *in vitro* разрабатывали на основе рекомендаций, приведенных в работах [7-9].

Использовали метод светооптических исследований в авторской модификации [10], а также общепринятый метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и метод полевого опыта [11].

Результаты и обсуждение

С помощью цито-гистологического контроля провели подбор почек, содержащих развитие апексы побега и корня, представленные меристема-

тической тканью. Установлено, что такие корневищные почки характеризуются определенными линейными размерами: 2,0 x 2,0 x 2,0 см.

Экспериментально на основе среды Мурасиге-Скуга [12] подобрали питательную среду для культивирования корневищных почек. Провели серию экспериментов по подбору фитогормонов, необходимых для образования корней и побегов в культивируемых корневищных почках. Наиболее эффективной оказалась среда, содержащая смесь фитогормонов индолуксусной кислоты (ИУК) и кинетина в концентрациях 2,0 мл/л каждый. Необходимость введения ИУК мы объясняем свойством этого фитогормона стимулировать формирование побегов и корней, тогда как кинетин необходим для стимулирования митотической активности клеток [13]. Кроме того, в состав питательной среды необходимо вводить аскорбиновую кислоту (0,4 мг/л) в качестве антиоксиданта, блокирующего действие фенолоксидазы, но не угнетающего рост растения-клона на питательной среде.

В темновых условиях при температуре +26⁰С на 15-17 сут культивирования *in vitro* корневищные почки давали начало растениям-клонам, что обусловлено естественной способностью борца северного к интенсивному вегетативному размножению. Один раз в 7 сут пассировали культивируемую *in vitro* корневищную почку в пробирки со свежей средой того же состава, отделяя при этом излишки тканей. Всего использовали 4 пассажа.

В таких условиях через 28-30 сут культивирования *in vitro* корневищные почки давали начало растениям-клонам.

Далее растения-клоны с хорошо развитой корневой системой переносили *ex vitro* в вегетационные сосуды с почвенной смесью, размещая их на лабораторных площадках при освещенности 18 000 лк в условиях имитации летнего светового дня (18 час свет/6 час темнота) при комнатной температуре. В таких условиях клоны активно вегетировали с формированием хорошо развитой корневой системы. Через 40-45 сут растения-клоны переносили в условия модельных опытов на плантационные участки научного стационара Института биологии УНЦ РАН.

В настоящее время ведутся наблюдения за развитием полученных растений-клонов в полевых условиях, с контролем содержания лаппаконитина в корневищах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Через 3-4 года выращивания на плантациях корневища растений будут переданы в лабораторию экологии растительных ресурсов Института биологии УНЦ РАН для скрининга лаппаконитина и отбора особой-суперпродуцентов лаппаконитина. Растения с максимальным содержанием лаппаконитина предполагается клонировать *in vitro* далее через корневищные почки.

Выводы

Таким образом, разработан способ стабильного получения растений-клонов ценного лекарственного растения борца северного *Aconitum septentrionale* Koelle путем размножения корневищными почками в культу-

ре *in vitro*, включающий следующие принципиальные этапы: 1. Введение в культуру *in vitro* корневищных почек определенного размера, содержащих развитые апексы побега и корня. 2. Получение растений-клонов в культуре *in vitro*. 3. Перенос растений-клонов с хорошо развитой корневой системой в условия *ex vitro*. 4. Перенос растений-клонов в фазе вегетации в полевые условия на плантации.

Растения-клоны бореца северного могут быть использованы в фармакологии для расширения сырьевой базы при производстве антиаритмического препарата аллапинин. Важно, на наш взгляд, и то, что тем самым вносится вклад в сохранение природных популяций бореца северного.

Следует отметить, что клональное микроразмножение бореца северного из корневищных почек разработано впервые. Похожий опыт введения в культуру *in vitro* бореца луковичного был проведен в Японии, однако не имел успеха [14].

Работа поддержана программой «Ведущие научные школы РФ» по теме «Теоретические основы репродукции цветковых растений», грант № НШ 7637.2010.4. (лидер школы – член-корр. РАН Т.Б. Батыгина, БИН РАН, Санкт-Петербург).

Литература

1. Латыпова Г.М., Плеханова Т.М., Мухаметишина В.С. Фармакогностическое изучение аконита северного как источника «Аллапинина» // Тезисы докладов III Украинской конф. по медицинской ботанике. – Киев, 1992. – С. 78-79.
2. Цицилин А.Н., Шретер А.И. Прогноз природных ресурсов *Aconitum septentrionale* Koelle в Башкирской АССР // Растительные ресурсы. – 1990. – Т. 26. – № 4. – С. 513-539.
3. Федоров Н.И., Михайленко О.И., Мулдашев А.А., Лугманова М.Р. Результаты выявления алкалоидоносных видов во флоре Южного Урала // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. – М., 2005. – С. 203-210.
4. Федоров Н.И., Мартыанов Н.А. Особенности распространения и динамики ценопопуляций *Aconitum septentrionale* Koelle в растительных сообществах Башкирии // Растительные ресурсы. – 1993. – Т. 29. – № 3. – С. 29–34.
5. Федоров Н.И., Мартыанов Н.А., Никитина В.С., Ишибирдина Л.М. Содержание алкалоида лаппаконитина в подземной и надземной частях *Aconitum septentrionale* Koelle в растительных сообществах в Башкирии // Растительные ресурсы. – 1996. – № 3. – С. 96-101.
6. Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение растений // Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 191-202.
7. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
8. Геринг Х. Преодоление витрификации и акклиматизации растений при клональном микроразмножении // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 197-200.
9. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

10. *Круглова Н.Н., Егорова О.В.* Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. – М.: Лабора, 2011. – 135 с.

11. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – № 3. – P. 473-497.

13. *Медведев С.С.* Физиология растений. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2004. – 335 с.

14. *Hatano K.* Clonal multiplication by tip tissue and alkaloid contents of clonally propagated plants // *Planta medica.* – 1988. – № 1. – P. 22-26.

Резюме

Разработан способ экспериментального получения растений-клонов борца северного *Aconitum septentrionale* Koelle в условиях *in vitro* на основе использования корневищных почек.

The method of experimental obtaining of clone plants of *Aconitum septentrionale* Koelle in *in vitro* conditions on the base of using the rhizome gemmae was prepared.

КРУГЛОВА Н.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии Уфимского научного центра РАН,

Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: kruglova@anrb.ru

К ВОПРОСУ О ВЫЯВЛЕНИИ АВТОНОМНОСТИ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

Многочисленными эмбриологическими исследованиями установлено, что развитие зародыша (эмбриогенез) растений представляет собой единый процесс, в результате которого из одной исходной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш, обладающий всеми морфогенетическими потенциями взрослого растения. Вместе с тем в своем развитии зародыш проходит через ряд дискретных стадий (или, в терминологии различных авторов – периодов, фаз, этапов), различающихся по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, значению для дальнейшего развития растения. Каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлена на реализацию как морфогенетического потенциала зародыша, так и онтогенетической программы особи в целом [1].

Системный подход к дифференциации зародыша с учетом морфогенетических и морфофизиологических корреляций позволил выявить ряд критических стадий эмбриогенеза растений, во время которых закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша. Последовательные стадии развития зародыша рассматриваются как процесс, при котором в различные критические точки времени и пространства происходит переключение на альтернативные пути, а те или иные части организма становятся «детер-

минированными» в отношении их дальнейшей дифференциации. В целом зародыш демонстрирует свойства динамичной системы с пульсирующим характером функционирования своих элементов [2].

Одна из критических стадий эмбриогенеза растений – автономность зародыша как особое структурно-функциональное состояние развивающегося растительного организма, отражающее его способность к саморегуляции, независимость от окружающих тканей и проявляющееся в его способности завершить нормальный эмбриогенез вне материнского организма. Автономность зародыша может рассматриваться как один из этапов автономизации онтогенеза, с которого зародыш (новый спорофит) переходит на относительно самостоятельный путь развития [3].

Высказано мнение [2], что стадия автономности зародыша для цветковых растений разных таксонов будет совершенно различна, поскольку определится в основном специфичной генетикой, т.е. разнообразием структур материнского организма, которые окружают зародыш и обуславливают как специфику его строения и развития, так и особенности формирования проростка и растения в целом. Предложен способ выявления стадии автономности зародыша экспериментально методом культуры *in vitro* разновозрастных зародышей (эмбриокультура *in vitro*) по способности изолированного зародыша завершить нормальный эмбриогенез и дать в условиях *in vitro* нормальный проросток на простой безгормональной среде [3]. Такой подход вполне оправдан. Действительно, с одной стороны, именно культура *in vitro* позволяет создать условия для наиболее полной реализации всех (в том числе потенциальных) онтогенетических программ развития зародыша, а значит, и особи в целом, поскольку зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма. С другой стороны, именно в культуре *in vitro* экспериментатор может моделировать условия материнского организма и выявить ту стадию эмбриогенеза, когда зародыш способен к дальнейшей дифференциации и прорастанию во взрослое нормальное растение независимо от экзогенных гормонов питательной среды. В то же время, по нашему мнению, следует дать оценку автономности зародыша не только по признаку формирования нормального проростка на безгормональной среде *in vitro*, но и по формированию из такого проростка полноценного фертильного растения далее, в условиях развития *ex vitro*.

Цель исследования состояла в выявлении стадии автономности зародыша яровой мягкой пшеницы методом эмбриокультуры *in vitro* и определении цито-гистологического статуса автономного зародыша.

Материал и методы

В качестве объекта исследования использовали сорт яровой мягкой пшеницы Симбирка, перспективный для климатической зоны Южного Урала и районированный в Республике Башкортостан в 1988 г. Сорт выведен на Ульяновской государственной сельскохозяйственной опытной станции методом индивидуального отбора из гибридной комбинации (Минская х Без-

остая) х Саратовская 36 [4]. Ранее нами [5] для растений этого сорта отмечена высокая отзывчивость зародышей на условия культуры *in vitro*. Семена были любезно предоставлены лабораторией селекции яровой пшеницы Башкирского НИИ СХ РАСХН (заведующий лабораторией – к. с.-х.н. В.И. Никонов) согласно Договору о творческом сотрудничестве на 2011–2015 гг.

Растения, выращенные в полевых условиях на экспериментальных участках научного стационара Института биологии УНЦ РАН (Уфимский район), срезали на 2.5–25.0 сут после искусственного опыления.

Использовали метод фенологических наблюдений за сезонным ритмом роста и развития растений пшеницы в полевых условиях [6], метод полевого опыта [7], метод эмбриокультуры *in vitro* яровой мягкой пшеницы с учетом оригинальных методических эмбриологических нюансов [8] и цито-гистологические (светооптические) методы исследования, модифицированные применительно к биотехнологическим исследованиям [9]. Для цито-гистологических исследований зародыши фиксировали каждые 0.5 сут, начиная с 0.5 сут после искусственного опыления. Препараты просматривали и фотографировали при помощи микровизора проходящего света μ VIZO-103 (ОАО «ЛОМО», г. Санкт-Петербург).

Для культивирования *in vitro* использовали незрелые зародыши, изолированные после искусственного опыления на следующих стадиях эмбриогенеза (согласно авторской периодизации [10]): четырехклеточный зародыш (2.5 сут после опыления, длина зародыша 0,12–0,14 мм); многоклеточный зародыш (3.0–4.0 сут после опыления, длина зародыша 0,15–0,2 мм); органогенез в трех подстадиях: подстадия 1 (4.5–8.0 сут после опыления, длина зародыша 0,4–0,6 мм), подстадия 2 (8.5–12.0 сут после опыления, длина зародыша 0,8–1,3 мм), подстадия 3 (12.5–17.0 сут после опыления, длина зародыша 1,5–2,0 мм); сформированный зародыш (17.5–20.0 сут после опыления, длина зародыша 2,1–2,2 мм). Незрелые зародыши на стадии зиготы и стадии двухклеточного зародыша в экспериментах не использовали: миниатюрность зародышей на этих стадиях эмбриогенеза представляет значительную методическую трудность.

Культивируемые зародыши размещали щитком вниз на индукционную питательную среду, составленную по прописи [11] с добавлением в качестве гормонального компонента синтетического аналога ауксина 2,4-Д в различной концентрации: 0.0 мг/л (контроль), 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 мг/л. Культивирование проводили в темноте, при температуре +26°C.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных экспериментальных данных свидетельствует о следующем.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на стадиях четырехклеточного и многоклеточного зародыша, на подстадии 1 стадии органогенеза при всех концентрациях 2,4-Д в питательной среде и в конт-

роле ответной реакции зародышей не наблюдали. Такие зародыши постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 2 стадии органогенеза на всех вариантах сред с 2,4-Д через 5–7 сут культивирования наблюдали формирование неморфогенных обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. Пролиферация каллусов была скудной, и в ходе дальнейшего культивирования такие каллусы постепенно дегенерировали. В контрольном варианте каллусообразования не наблюдали, экспланты постепенно дегенерировали.

При культивировании *in vitro* зародышей, инокулированных на подстадии 3 стадии органогенеза, через 5–7 суток культивирования при концентрации 2,4-Д в питательной среде 1.0–3.0 мг/л наблюдали формирование морфогенных каллусов плотной компактной консистенции, матового желтовато-белого цвета, узловой формы. В остальных случаях, в том числе в контрольном варианте, формировались неморфогенные каллусы.

Зародыши, инокулированные на стадии сформированного зародыша, после 10–12 сут культивирования *in vitro* на безгормональной питательной среде без 2,4-Д (контроль) давали начало проросткам и далее, после переноса на среду для регенерации и в почвенные условия *ex vitro*, - нормальные фертильные растения. При культивировании сформированных зародышей на питательной среде с добавлением 2,4-Д (все концентрации) через 5–7 сут наблюдали образование неморфогенного водянистого каллуса.

Таким образом, сформированный зародыш следует считать автономным зародышем, имеющим определенный уровень эндогенных регуляторов роста, обеспечивающих в сочетании с другими веществами его дальнейшее нормальное прорастание. Согласно цито-гистологическим данным, такой зародыш характеризуется наличием всех типичных для зародышей злаков органов: щиток, лигула (вырост щитка), колеоптиль, эпибласт, колеориза, дифференцированная почечка, состоящая из апекса побега и первого листа.

Выводы

Ответная реакция изолированных незрелых зародышей пшеницы на условия культивирования *in vitro* в условиях выполненных экспериментов зависит от стадии эмбриогенеза и концентрации 2,4-Д в питательной среде.

Стадии автономности зародыша пшеницы модельного сорта Симбирка, выявленной по ответной реакции зародыша на культивирование *in vitro* на безгормональной среде (контроль), соответствует сформированный зародыш (17.5-20 сут после опыления, длиной 2,1–2,2 мм), характеризующийся наличием всех типичных для зародышей злаков органов.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований Отделения биологических наук РАН «Биологические ресурсы России: ди-

намика в условиях глобальных климатических и антропогенных воздействий» (2012-2014 г.г.).

Литература

1. *Батыгина Т.Б.* Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 6. – С. 884-898.
2. *Батыгина Т.Б., Васильева В.Е.* Целесообразность системного подхода к проблеме дифференциации зародыша покрытосеменных растений // Онтогенез. – 1983. – Т. 14, № 3. – С. 304-311.
3. *Батыгина Т.Б.* Хлебное зерно. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
4. Характеристика сортов сельскохозяйственных культур, включенных в Госреестр по Республике Башкортостан / под ред. Д.Б.Гареева. – Уфа, 1997. – 96 с.
5. *Круглова Н.Н., Катасонова А.А.* Незрелый зародыш пшеницы как морфогенетически компетентный эксплантат // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т. 41, № 2. – С. 121-131.
6. *Челак В.Р.* Система размножения пшеницы *Triticum L.* – Кишинев: Штиинца, 1991. – 320 с.
7. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.
8. *Круглова Н.Н.* Культура *in vitro* разновозрастных зародышей яровой мягкой пшеницы на основе эмбриологических и цитофизиологических данных / методические рекомендации. – Уфа: Гилем, 2012. В печати.
9. *Круглова Н.Н., Егорова О.В.* Световой микроскоп как инструмент в биотехнологии растений. – М.: Лабора, 2011. – 135 с.
10. *Круглова Н.Н., Круглова А.Е.* Периодизация развития зародыша пшеницы для биотехнологических разработок // Факторы экспериментальной эволюции организмов: сборник научных трудов. Т 11. – К.: Логос, 2011. – С. 325-330.
11. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473-497.

Резюме

Сформированный зародыш пшеницы (17.5-20 сут после опыления, длиной 2,1–2,2 мм), характеризующийся наличием всех типичных для зародышей злаков органов, соответствует стадии автономности.

The formed wheat embryo (17.5-20 days after pollination, 2,1-2,2 mm of length) characterized by availability of all typical cereal embryo organs is in keeping with the stage of autonomy.

КУЗНЕЦОВА О.В.¹, МАЛИНОВСКАЯ Н.В.²

¹Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины,
Украина, 01601, Киев-1, ул. Терещенковская, 2, e-mail: Olga_59k@mail.ru;

²Украинский государственный химико-технологический университет,
Украина, 49005, Днепрпетровск-5, пр. Гагарина, 8, e-mail: Olga_59k@mail.ru

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЫСШЕГО БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *PLEUROTUS OSTREATUS* НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Особый интерес при культивировании высших базидиомицетов на жидких питательных средах представляет не только биомасса грибов, содержащая белки, углеводы и витамины, но и культуральная жидкость, обогащенная биологически активными веществами [1, 2]. Живые мицелиальные культуры, продуцирующие окислительные и гидролитические ферменты, могут найти широкое применение для биоконверсии лигнифицированных растительных отходов с одновременным обогащением их белком [3]. Ферменты, обладающие способностью свертывать молоко, могут использоваться для приготовления сыров. Гидролитические ферменты высших базидиомицетов могут найти применение и для ферментативного получения сахаров из целлюлозосодержащего сырья [4, 5]. Также отмечено, что культуральная жидкость при выращивании базидиомицетов содержит ряд лекарственных веществ: антибиотики, противоопухолевые соединения, алкалоиды, иммуностимуляторы [6, 7].

По мнению специалистов-микологов, продуцентами пищевой грибной биомассы, получаемой путем культивирования базидиомицетов на жидких средах, являются хорошо известные съедобные грибы. Наибольшей скоростью накопления биомассы, высоким коэффициентом потребления источника углерода, способностью расти на разнообразных дешевых отходах пищевой промышленности и сельского хозяйства отличаются виды сапротрофных дереворазрушающих грибов. Одним из таких грибов является вешенка обыкновенная (*Pleurotus ostreatus*) [8].

Биотехнология культивирования базидиомицетов на жидких питательных средах практически идентична процессу культивирования изолированных органов, тканей и клеток растений. Основными компонентами питательных сред при микрокультивировании растений являются минеральные соли, источники углеводного питания, витамины и регуляторы роста. Иногда в питательные среды включают комплексные органические добавки: гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, кокосовое молоко, эндосперм кукурузы, экстракты из различных органов растений. Регуляторы роста (ауксины, цитокинины, гиббереллины) используют для регуляции дифференциации и морфогенеза изолированных тканей растений [9, 10]. Питательные среды для культивирования базидиомицетов также содержат источники углерода и азота, минеральные соли, различные органические до-

бавки. Однако регуляторы роста при культивировании грибов практически не используются [8, 11]. Окончательно не установлено физиологическое и биохимическое действие рострегуляторов на скорость роста, накопление биомассы, биосинтетическую активность грибов.

Целью данной работы является изучение влияния регуляторов роста на рост, развитие и биосинтетическую активность грибного мицелия *Pleurotus ostreatus* при культивировании на жидких питательных средах.

Материалы и методы

Объектом исследования был штамм съедобного гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. IBK-551 (HK-35), полученный из коллекции шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины [12].

Маточный мицелий *P. ostreatus* выращивали и сохраняли в пробирках на скошенном кукурузном агаре.

В исследовании использовали синтетическую глюкозо-аммонийную (Г-АМ) питательную среду [13]. Изучали влияние на рост и развитие мицелия *P. ostreatus* натурального регулятора роста гиббереллина и комплексного стимулятора роста биогумата, в котором содержание фитогормонов (ауксины, гиббереллины, цитокинины) составляет 0,28 г/л [14]. Рострегуляторы добавляли в питательную среду в концентрациях 0,01%, 0,005%. Контрольная среда не содержала стимуляторов роста.

Подготовку и стерилизацию питательных сред проводили согласно общепринятым методикам [15, 16]. В качестве посевного материала использовали 9-суточные культуры, выращенные на чашках Петри. Инокуляцию осуществляли дисками мицелия диаметром 8 мм. На 50 мл питательной среды вносили три диска посевного мицелия. Проводили поверхностное культивирование *P. ostreatus* на жидкой питательной среде при температуре 26 ± 1 °С.

Скорость роста мицелия *P. ostreatus* определяли по накоплению биомассы на 14-е сутки культивирования. Биомассу фильтровали, промывали дистиллированной водой, высушивали до воздушно сухого веса и взвешивали.

Опыт проводили в трехкратной повторности. Полученные результаты обрабатывали методами математической статистики. Данные считали достоверными при $p < 0,05$ (по Стьюденту) [17].

Результаты и обсуждение

Проведенные экспериментальные исследования показали ускорение роста и развития *P. ostreatus* на жидкой питательной среде под влиянием гиббереллина и биогумата (рис. 1, 2). Причем эффект ускорения роста гриба был более выраженный на питательной среде с натуральным регулятором роста гиббереллином.

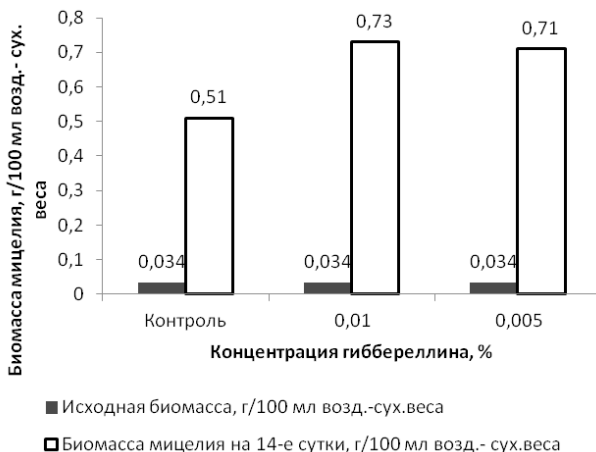


Рис. 1. Влияние гиббереллина на накопление биомассы *P. ostreatus*.

По сравнению с контролем на 14-е сутки культивирования биомасса *P. ostreatus* на среде с концентрацией гиббереллина 0,01% увеличилась на 43,1%, а с концентрацией 0,005% - на 39,2%. В то же время на среде с концентрацией биогумата 0,01% отмечено увеличение биомассы гриба по сравнению с контролем на 31,6%, а с концентрацией 0,005% - на 5,3%.

Морфологическая характеристика мицелиальных колоний *P. ostreatus*, развивающихся на поверхности жидкой питательной среды с добавлением регуляторов роста, не показала каких-либо различий по сравнению с контрольным вариантом. Мицелий гриба белый, пушистый, на поверхности образует ватообразные колонии. Погруженный мицелий прозрачный, бесцветный, желеобразный.

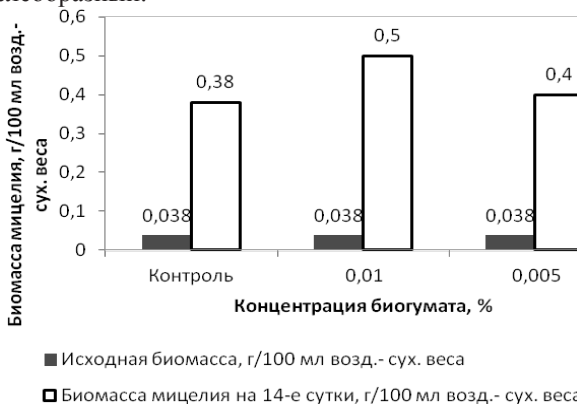


Рис. 2. Влияние биогумата на накопление биомассы *P. ostreatus*.

На протяжении процесса культивирования наблюдали незначительное защелачивание питательной среды, особенно активное в средах, содержащих регуляторы роста. Также наблюдали увеличение вязкости культуральной жидкости, что связано, вероятно, с накоплением метаболитов гриба в питательной среде.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что регуляторы роста гиббереллин и биогумат активно влияют на рост и развитие *P. ostreatus* при культивировании на жидких питательных средах. Интенсивность действия регуляторов зависит от вида регулятора и его концентрации. Среди исследованных регуляторов роста наилучший стимулирующий эффект отмечен при добавлении в питательную среду гиббереллина. Наиболее оптимальной концентрацией изученных рострегуляторов является концентрация 0,01%. Подбирая соотношения и концентрации регуляторов роста, можно целенаправленно регулировать их действие на рост и развитие высших базидиальных грибов в культуре.

Оптимизация жидких питательных сред посредством внесения регуляторов роста может быть полезной в биотехнологическом процессе получения как мицелиальной биомассы, так и биологически активных веществ высших базидиомицетов.

Литература

1. Соломко Э.Ф. Грибы как физиологически функциональный пищевой продукт и источник фармакологически активных лекарственных веществ // Перспективы использования лекарственных грибов при решении медико-экологических проблем/ Мат-лы междунар. науч.-практ. конф.– Киев, 10-11 сентября 2004.– С. 70-80.

2. Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов в России // Микология и фитопатология.– 2004.– Т. 38.– Вып. 2.– С. 1-7.

3. Бабицкая В.Г. Грибы – эффективные деструкторы лигноцеллюлозных субстратов: их морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика // Микология и фитопатология.– 1993.– Т. 27, № 5.– С.38-44.

4. Кудрявцева О.А., Дунаевский Я. Е., Камзолкина О.В., Белозерский М.А. Протеолитические ферменты грибов: особенности внеклеточных протеаз ксилотрофных базидиомицетов // Микробиология.– 2008.– Т. 77, № 6.– С. 725-737.

5. Походня Ю.Г., Малиновский Н.И., Лапко А.Г. Выделение и характеристика фермента, обладающего билирубиноксидазной и лакказной активностью, из мицелия базидиального гриба *Pleurotus ostreatus* // Биохимия. - 2009.– Т. 74, № 9.– С. 1260-1269.

6. Rondanelli M., Opizzi A., Monteferrario F. The biological activity of beta-glucans // Minerva Med. – 2009. - vol. 100, № 3.– p. 237-245.

7. Бухало А.С., Соломко Э.Ф., Вассер С.П., Михайлова О.Б. Лекарственные препараты и пищевые добавки из макромицетов // Успехи медицинской микологии.– М.: Нац. акад. микологии, 2005.– Т. 5.– С. 254-256.

8. Бухало А.С., Бисько Н.А., Соломко Э.Ф., Билай В.Т. и др. Культивирование съедобных и лекарственных грибов. Практические рекомендации/ Под общ. ред. А.С. Бухало.– Киев, 2004.– 120 с.

9. Кунах В.А. Биотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. - К.: Логос, 2005.– 730 с.

10. Neumann K.–H., Imani J., Kumar A. Phytohormones and Growth Regulators. – Plant Cell and Tissue Culture. – A Tool in Biotechnology. Basics and Application. – Springer Berlin Heidelberg, 2009. – P. 227–233.

11. Sanchez C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms // Applied Microbiology and Biotechnology – 2010. - vol. 85., № 5.– P. 1321-1337.

12. Buchalo A.S., Mitropolskay N.Yu., Mykchaylova O.B. Catalogue of the culture collection of mushrooms IBK.– Kyiv: N.G. Kholodny Institute of Botany, NA of Sciences et Ukraine, NVF “Slavutich-delfin”, 2006.– 36 p.

13. Соломко Э.Ф. Синтетическая среда для культивирования *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kuntt. Препринт. – Киев: Ин-т ботаники им. Н.Г.Холодного, 1992.– 23 с.

14. Гармаш С. М. Дослідження біохімічних властивостей біогумусу та біогумату // Вопросы химии и хим. технологии. – 2004. – № 4. – С. 82–84.

15. Методы экспериментальной микологии: Справочник / Под ред. В. И. Билай. – Киев. – 1982. – 552 с.

16. Бухало А. С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – Киев. – 1988. – 157 с.

17. Лакин Г. Ф. Биометрия. – Москва. – 1980. – 293 с.

Резюме

Приведены данные о влиянии регуляторов роста гиббереллина и биогумата на рост и развитие мицелия *Pleurotus ostreatus* на жидких питательных средах при поверхностном культивировании. Получены результаты позитивного воздействия определенных концентраций регуляторов роста на накопление мицелиальной биомассы и синтетическую активность гриба.

Наведені дані про вплив регуляторів росту гібереліну і біогумату на ріст і розвиток міцелію *Pleurotus ostreatus* на рідких живильних середовищах при поверхневому культивуванні. Отримані результати позитивної дії визначених концентрацій регуляторів росту на накопичення міцеліальної біомаси і синтетичну активність гриба.

The data about influence of growth regulators gibberellin and biohumates on the growth and development of the mycelium of *Pleurotus ostreatus* on liquid nutrient medium at surface cultivation is resulted. The results of positive effect of the certain concentrations of growth regulators on the accumulation of mycelial biomass and synthetic activity of the fungus are obtained.

КУЗЬМИНА Н.С., СТРЕЛКОВА М.А., СЛЕПЯН Л.И., КИРИЛЛОВА Н.В.

*ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия Минздрава
соцразвития России,*

Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14 литера А,

e-mail: nadezhda.kuzmina@pharminnotech.com

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ШТАММЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ARALIACEAE

В Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии (СПХФА) создан один из первых в России банк штаммов культивируемых клеток лекарственных растений. На сегодняшний день в коллекции находятся штаммы растений семейств Araliaceae, Arosynaceae, Agavaceae – всего 17 штаммов. [1].

Экспериментально созданная биологическая система клеток высших растений, культивируемых *in vitro*, позволяет всесторонне исследовать рост, клеточную дифференциацию и развитие, как в нормальных условиях, так и в условиях стресса. Химические процессы, протекающие в клетке, – одно из основных условий ее жизни, развития и функционирования. Под действием самых различных неблагоприятных факторов, как правило, развивается цепочка сходных неспецифических адаптационных реакций, совокупность которых получила название фитостресса. Для клеток культивируемых *in vitro* такими воздействиями могут быть: понижение/повышение температуры культивирования, воздействие магнитных полей, ультразвуковое влияние, ультрафиолетовое излучение, химический стресс, в том числе введение в стандартную питательную среду новых компонентов, а также наноматериалов и т.д.

Любое неблагоприятное воздействие на клетку имеет те же причины, что и при естественном старении. В частности, в настоящее время считают, что одной из главных причин старения у аэробов является накопление в процессе метаболизма кислорода активных форм кислорода, которые характеризуются выраженной реакционной способностью. Широкий спектр повреждающего действия прооксидантов обусловлен их способностью атаковать и окислять разнообразные биомолекулы, важнейшими из которых являются нуклеиновые кислоты, белки, липиды и углеводы. Для поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза в клетках существует антиоксидантная защита, которая включает специализированные ферментативные антиоксидантные системы, которые взаимосвязаны и действуют как единая система. В связи с этим, можно сделать вывод о том, что ферментативные антиоксидантные системы, главным звеном которых являются такие ферменты как СОД, каталаза и пероксидаза, являются надежными маркерами физиологического состояния стабильности биосистем, и, в частности, культивируемых *in vitro* клеток высших растений [2].

Постоянное увеличение количества и мощности устройств, создающих при своей работе электромагнитные поля, привело к тому, что значительная часть экосистем находится под непрерывным действием магнитных полей (МП). В связи с этим обострился интерес к изучению влияния МП на живые организмы. В конце XX в. появились работы, посвященные воздействию МП на всхожесть и интенсивность роста растений и накопления биомассы различных видов живых организмов. Данные, приводимые в этих работах, весьма противоречивы и лишь констатируют факты практического приложения магнитных полей. Поэтому следующим этапом стало изучение метаболических перестроек в клетке и субклеточных структурах под действием МП. Однако, вопрос о механизмах взаимодействия биообъектов с этим физическим фактором до сих пор остаётся слабоизученным. [3].

Материалы и методы

В качестве тест-объектов исследования выбраны штаммы *Panax ginseng* (С. А. Меу.) коллекционный и *Panax quinquefolium* L. селективный с германийорганическим соединением 1-гидроксигерматран-моногидрат ("Lx-5"). Источником воздействия служил магнит мощностью 2 Тл. Штаммы культивировали на модифицированной питательной среде, в темноте, при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Тест-объекты подвергали воздействию МП в течение 48 часов на разных этапах роста, оценивая содержание внутриклеточного белка по методу Лоури, активность каталазы – перманганатометрическим способом и СОД – люминисцентным методом. На конечных сроках культивирования проводили определение сырой массы, количественное определение гликопептидного комплекса (ГПК) по оригинальной методике [4] и содержание водорастворимых полисахаридов (ВРП) по общепринятой методике в модификации [5]. Полученные данные обрабатывали статистически и рассчитывали как средние из 5-7 сосудов одного варианта.

Результаты

Исследование ростовых характеристик, состояния системы ферментов антиоксидантной защиты, а также накопление вторичных метаболитов служит одним из критериев устойчивости штаммов к стрессовым факторам.

Для изучения влияния действия МП на рост биомассы определяли массу клеток на конечных сроках культивирования (33 сутки роста). Полученные результаты представлены в таблице 1.

Установлено, что после обработки МП штамма *Panax ginseng* на 12 сутки наблюдается увеличение массы на 8-10 %. Однако, при воздействии МП на 20 сутки наблюдали снижение массы. Такой же эффект был отмечен и для штамма *Panax quinquefolium* + Lx-5.

Дальнейшие исследования были направлены на изучение состояния системы ферментов антиоксидантной защиты и содержание внутриклеточного белка, как маркеров физиологического состояния клеток, которые определяли в указанные сроки роста непосредственно после воздействия МП. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 1

Результаты определения сырой массы образцов.

Тест-объект	Обработка МП, сут-ки роста	Контроль, сырая масса г	Опыт, сырая масса г
Panax ginseng	6	46,3±0,5	46,5±0,5
	12	46,3±0,5	48,3±0,7
	20	46,3±0,5	43,9±0,3
	30	46,3±0,5	42,4±0,3
Panax quinquefolium + Lx-5	30	48,4±0,7	45,1±0,3

Таблица 2

Результаты количественного определения биохимических показателей.

Тест- объекты	Обработка МП, сутки роста	Образец	Активность каталазы, Усл. Ед./г	Активность СОД, Усл. Ед./г	Общий белок, мг/г
Panax ginseng	6	опыт	65,0	52,8	2,2
		контроль	75,0	64,1	3,0
	12	опыт	32,5	48,3	2,4
		контроль	50,0	58,3	2,6
	20	опыт	55,0	47,2	3,3
		контроль	85,5	46,9	3,7
	30	опыт	75,0	46,0	3,1
		контроль	80,0	50,4	3,4
Panax quinquefolium + Lx-5	30	опыт	62,5	49,8	3,2
		контроль	65,0	58,3	3,6

Представленные в таблице результаты указывают, что на всех сроках роста в данных условиях эксперимента наблюдается понижение активности ферментов: каталазы и СОД, а также уменьшение внутриклеточного белка в среднем на 15%.

Для изучения влияния МП на метаболизм было проведено количественное определение ГПК и ВРП. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3

Результаты количественного определения ГПК и ВРП.

Тест - объекты	Обработка МП, сутки роста	Содержание ГПК, %		Содержание ВРП, %	
		опыт	контроль	опыт	контроль
Panax ginseng	6	2,9±0,2	2,3±0,1	7,9±0,1	7,5±0,2
	12	2,2±0,2		8,0±0,2	
	20	3,5±0,1		8,1±0,2	
	30	4,0±0,2		8,4±0,2	
Panax quinquefolium + Lx-5	30	6,4±0,1	5,1±0,2	8,2±0,1	8,0±0,2

Получены результаты о содержании ГПК и ВРП, которые повышаются при обработке тест – объектов на ранних сроках культивирования, что можно рассматривать как ответную реакцию клеток на стресс.

Таким образом, как показали предварительные опыты, магнитное поле затрагивает все стороны метаболических процессов, происходящие в клетках.

Литература

1. *Slepyan L.I.* Bank of medicinal plant cell cultures as a model of innovative phyto-biotechnology / L.I.Slepyan, I.E.Kaukhova, O.N.Gromova, N.S.Kusmina // 15th International Congress Phytopharm 25-27 Juli. –Nuremberg, Germany. - 2011. – p.53.

2. *Кириллова, Н.В.* Ферменты антиоксидантонои защиты- маркеры физиологического состояния штамма Панаксел-5 / Н.В. Кириллова // IX Межд. съезд “Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения”, 2005. - С. 11-14.

3. *Половинкина Е.О., Сеницына Ю.В.* Окислительный стресс и особенности воздействия слабых стрессоров физической природы на перекисный гомеостаз растительной клетки. Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2010. – 62 с.

4. *Кузьмина, Н.С.* Гликопептидный комплекс (ГПК) листьев *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey, корней и препаратов женьшеня *Panax ginseng* C. A. Mey. и биомассы клеток этих растений / Н.С. Кузьмина, Л.И. Слепян, А.Л. Марченко // Растительные ресурсы-2008.–Т.44. - Вып.4.–С.155-164.

5. Государственная фармакопея СССР. Вып.1, 2. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина. - 1990.

Резюме

Представлены экспериментальные данные изучения влияния магнитного поля на рост, антиоксидантную активность ферментов и метаболизм биологически активных веществ в штаммах растений семейства Araliaceae. Установлено, что на ранних этапах роста действие магнитного поля стимулирует рост клеток и содержание биологически активных веществ на 15 %, снижая активность ферментов на 10-15 %.

The experimental data studying the effect of magnetic field on the growth, activity of antioxidant enzyme and metabolism of biologically active substances in the strains of plants of the family Araliaceae. Found that in the early stages of growth of the magnetic field stimulates cell growth and maintenance of biologically active substances by 15%, reducing the activity of enzymes by 10-15%.

ВПЛИВ ТРИВАЛОСТІ ФОТОПЕРІОДУ, ТЕМПЕРАТУРИ ТА АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ІНДУКЦІЮ УТВОРЕННЯ МІКРОБУЛЬБ КАРТОПЛІ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Сучасні умови аграрного виробництва вимагають прискореного переходу насінництва і розсадництва на безвірусну основу. Технології мікроклонального розмноження рослин в культурі *in vitro* постійно удосконалюються, що дає змогу отримувати оздоровлений посадковий матеріал багатьох культур [2].

Однією з невід'ємних складових сучасного насінництва картоплі є удосконалення існуючих методів відтворення оригінального селекційного матеріалу шляхом мікроклонального розмноження на поживному середовищі в умовах *in vitro* і вирощування мікробульб [1].

Оздоровлений біотехнологічними методами насіннєвий матеріал на перших етапах його використання відзначається кращою якістю, оскільки під час його продукування синтез вірусного білка в рослинах затримується, у результаті уповільнюється темп накопичення вірусної інфекції. Разом з тим, враховуючи значну вартість насіннєвого матеріалу, одержаного шляхом *in vitro*, особливої актуальності набуває удосконалення прийомів розмноження посадкового матеріалу [3, 5].

Матеріали і методи

Для визначення найбільш оптимального режиму бульбоутворення в культурі *in vitro* сорту картоплі «Невська» нами у 2007-2009 рр. в умовах мікроклональної лабораторії був проведений дослід відповідно загальноприйнятих методик [4, 5]. На вивчення були поставлені чотири фактори: фактор А - фотоперіоди (10 та 16 годин), фактор В – температурні режими (18-20°C та 23-25°C), фактор С – норми азоту у розчині (повна норма, половина від норми та без азоту), фактор Д – час перенесення живців (перенесення на 10-й та на 20-й день).

Живці рослин сорту Невська вирощували на повному рідкому живильному середовищі Murashige, Skoog (МС) на фоні фотоперіодів 10 та 16 годин освітлення на добу при температурах 18-20 та 23-25 °С. На 10-й день живці однієї групи перенесли з повного поживного розчину на розчин з ½ норми азоту та без азоту. У другій групі рослин поживне середовище змінювали через 20 днів. Фотоперіод та температури зберігалися попередні.

Спостереження за ростом рослин та інтенсивністю бульбоутворення показали, що протягом 3-х років досліджень кількість міжвузлів на фоні різного фотоперіоду різнилися не в значній мірі (табл. 1).

При вивченні температурних режимів було встановлено, що вони впливали на збільшення кількості міжвузлів лише у перші 20 днів росту та

розвитку рослин. Так, при температурі 23-25⁰С кількість міжвузлів була на 17,3% вищою, ніж при температурі 18-20⁰С. Проте, вже на 60-й день культивування рослин цей показник становив лише 11,8%. Висота рослин при підтриманні температурного режиму на рівні 23-25⁰С була на 25,3-28,5% більшою, ніж при підтриманні температури на рівні 18-20⁰С. На 40-й день культивування при температурному режимі 18-20⁰С кількість рослин з мікробульбами становила 23,6%, що в 4,6 рази вище, ніж при температурі на рівні 23-25⁰С. В цілому за весь період культивування при температурі 18-20⁰С мікробульби сформувалися на 95,7%, а при температурі 23-25⁰С – на 65,8% рослин. Встановлено, що при заміні живильного середовища на 10-й день процес бульбоутворення проходив більш інтенсивно, ніж при заміні його на 20-й день. В цілому мікробульби було сформовано на 78,7 та 82,7% рослин, відповідно.

При перенесенні рослин на 10-й день з повного живильного середовища на середовище із вмістом $\frac{1}{2}$ кількості азоту та середовище без азоту вже на 40-й день культивування зменшувалася висота рослин на 12,5% та 19,7%, а також кількість міжвузлів зменшилась відповідно на 18,4% та 22,4%. На 20-й день перенесення рослин з повного живильного середовища на середовище із вмістом $\frac{1}{2}$ кількості азоту та середовище без азоту на 40-й день культивування, висота рослин зменшувалася на 3,4% та 8,4%, а також кількість міжвузлів – на 5,7% та 9,5%, відповідно. На 60-й день культивування висота рослин на живильному середовищі з половинною нормою азоту була на 6,4% меншою по відношенню до рослин із повною нормою, а на середовищі без азоту – на 9,5%. Аналогічним був стан і з кількістю міжвузлів. Проте, без застосування азоту та при застосуванні половини його норми за весь період культивування в цілому збільшувалася кількість рослин із мікробульбами на 24,1 та 14,9 % відповідно.

Аналіз даних свідчить, що при фотоперіоді 16 годин у порівнянні з 10-ти годинним освітленням в середньому збільшувалася маса мікробульби на 17,8%, а маса бульб з однієї рослини – на 19,8% (табл. 2).

При температурному режимі 18-20⁰С маса середньої мікробульби була на 68,8% більшою, ніж при режимі 23-25⁰С. Те ж саме стосується і маси мікробульб на одній рослині. Так, при застосуванні температури 18-20⁰С, цей показник був у 2,5 рази вищим порівняно з температурою 23-25⁰С. При перенесенні культивованих рослин із живильного середовища з повною нормою азоту на середовище з половинною нормою збільшувалася маса середньої мікробульби на 6,9%, а маса мікробульб на одну рослину – на 11,6%.

При перенесенні на середовище без азоту ці показники збільшувалися на 8,7% та на 23,1% відповідно.

Маса середньої мікробульби та маса мікробульб на одній рослині були більшими при заміні живильного середовища на 20-й день культивування, ніж при заміні на 10-й день на 31,9% та 49,7%, відповідно. Тобто, 20 днів культивування повністю задовольняли потребу в азоті і при подальшій вегетації наявність цього елемента не впливала на процес бульбоутворення.

Таблиця 1
Вплив рівня азотного живлення, температури та тривалості фотоперіоду на ріст, розвиток рослин картоплі сорту Невська в культурі *in vitro*, середнє за 2007-2009 рр.

Фотоперіод, год.	Температура, °С	Показники на день живцювання												Кількість рослин, що утворили мікробульби, %
		20-й				40-й				60-й				
		висота рос- лин, см	кількість між- вузлів, шт	кількість рослин з мікробульба- ми, %	висота рос- лин, см	кількість між- вузлів, шт	кількість рослин з мікробульба- ми, %	висота рос- лин, см	кількість між- вузлів, шт	кількість рос- лин з мікробуль- бами, %				
заміна середовища на 10-й день культивування														
10	18-20	Повна норма, без заміни середовища	3,6	3,2	5,5	5,0	4,5	43,0	5,5	5,8	71,9	95,0		
		½ норми	3,7	2,9	1,3	4,4	3,8	21,2	4,7	4,1	42,5	94,5		
	без азоту	3,5	3,0	1,7	4,2	3,6	25,4	4,7	4,3	45,4	98,1			
	Повна норма, без заміни середовища	4,7	3,7	0,0	6,0	4,8	5,8	6,6	5,8	18,4	52,1			
16	23-25	½ норми	4,2	3,1	0,7	5,9	4,1	7,5	6,8	5,4	30,5	72,5		
		без азоту	4,6	3,5	0,7	5,4	4,2	4,2	6,7	5,7	27,5	88,1		
	Повна норма, без заміни середовища	3,5	3,2	1,2	5,4	4,9	24,3	6,1	5,8	47,5	92,6			
	½ норми	3,1	3,0	0,5	3,7	3,6	13,6	4,4	4,1	40,6	87,5			
16	18-20	без азоту	2,8	2,6	0,8	3,3	3,3	14,2	3,6	3,7	38,7	97,0		
		Повна норма, без заміни середовища	4,6	3,8	0,0	5,9	5,4	5,8	6,5	6,2	74,9	46,4		
	½ норми	4,2	3,7	0,3	5,5	4,7	7,8	6,2	5,6	23,5	54,2			
	без азоту	4,2	3,5	0,0	5,1	4,2	2,0	5,9	5,2	9,4	65,9			

Продовження табл. 1

Фотоперіод, год.	Температура, °С	Показники на день живцювання												Кількість рослин, що утворили мікродуль-бами, %				
		20-й				40-й				60-й								
		висота рослин, см	кількість між-вузлів, шт	кількість рослин з мікродуль-бами, %	висота рослин, см	кількість між-вузлів, шт	кількість рослин з мікродуль-бами, %	висота рослин, см	кількість між-вузлів, шт	кількість рослин з мікродуль-бами, %								
10	18-20	заміна середовища на 20-й день культивування												94,3				
		Повна норма, без заміни середовища	4,1	3,4	4,4	5,5	5,0	39,4	6,2	5,6	73,0							
		½ норми	3,5	3,0	3,4	4,3	4,0	37,1	5,1	4,9	71,5							
	без азоту	3,1	2,8	0,8	4,0	3,5	27,8	4,4	4,5	75,4								
	Повна норма, без заміни середовища	4,7	3,9	0,0	6,2	5,2	5,6	6,9	6,4	12,1								
	½ норми	4,9	3,8	0,0	6,9	5,2	4,7	7,5	6,0	37,7								
16	18-20	без азоту	5,2	4,2	0,0	6,7	5,6	2,5	7,6	6,8	25,1							
		Повна норма, без заміни середовища	3,9	3,6	1,1	6,0	5,4	16,1	6,2	6,0	52,1							
		½ норми	4,2	3,8	0,0	5,9	5,4	10,9	6,1	5,6	56,1							
	без азоту	4,0	3,6	0,0	5,5	5,0	10,6	6,1	5,7	53,7								
	Повна норма, без заміни середовища	4,4	3,7	0,0	6,1	5,6	4,4	6,7	6,3	26,2								
	½ норми	4,8	3,7	0,0	6,1	5,3	4,8	6,6	6,0	38,7								
без азоту	4,8	4,1	0,0	5,9	5,3	6,0	6,4	5,7	39,9									
23-25																		

Таблиця 2

Вплив умов азотного живлення, дії температур та фотоперіоду на продуктивність рослин картоплі в культурі *in vitro*, 2007-2009 рр.

№ вар.	Температура, °С	Фотоперіод, год.	Строки заміни середовища	Вміст азоту	Маса мікробульби, г	Маса мікробульб на 1 рослину, г	Кількість мікробульб на 1 рослину, шт.	
1	18-20	10	10-й день	повна норма	172,7	163,9	0,9	
2				½ норми	139,0	133,7	1,0	
3				без азоту	160,3	153,8	1,0	
4			20-й день	½ норми	204,8	211,8	1,0	
5				без азоту	201,3	213,7	1,1	
6		16	10-й день	повна норма	226,7	227,0	1,0	
7					½ норми	183,4	152,9	0,8
8					без азоту	179,9	174,5	1,0
9			20-й день	½ норми	247,6	283,2	1,2	
10				без азоту	259,0	286,4	1,1	
11	23-25	10	10-й день	повна норма	81,5	48,9	0,5	
12				½ норми	89,6	60,0	0,7	
13				без азоту	101,8	88,8	0,8	
14			20-й день	½ норми	108,4	86,2	0,8	
15				без азоту	128,8	115,0	0,9	
16		16	10-й день	повна норма	111,1	52,8	0,5	
17					½ норми	139,5	71,4	0,5
18					без азоту	107,5	69,4	0,6
19			20-й день	½ норми	153,2	99,9	0,7	
20				без азоту	148,6	111,3	0,7	
НІР ₀₅ , мг/росл.						6,0		

В середньому за три роки досліджень максимальну продуктивність рослин було отримано при сполученні факторів: освітлення 16 годин, температура культивування 18-20°C, заміна повного живильного середовища на 20-й день культивування на середовище з ½ норми азоту або без азоту. Маса мікробульб у цих варіантах була 247,6 та 259,0 мг, а маса мікробульб на одній рослині становила 283,2 та 286,4 мг.

Висновки

Збільшення продуктивності посадкового матеріалу картоплі в культурі *in vitro* можливо досягти шляхом вирощування живців на фоні 16 годинно-го освітлення при температурі 18-20°C і заміні повного живильного серед-

овища МС на 20-й день на середовище, до складу якого азот не входить або входить у половинній нормі.

Література

1. Бугаєва І.П., Сніговий В.С. Культура картоплі на півдні України. – Херсон: Айлант, 2002. – 176 с.

2. Григорюк І.П., Мельничук М.Д., Клюваденко А.А., Бундук Ю.М. Методологічні підходи щодо мікроклонального розмноження айви звичайної // Вісник аграрної науки. – 2011. – № 2. – С. 30-33.

3. Киселев В. Н., Соломина И. П. Современные аспекты семеноводства овощных культур и картофеля / обзор М.С. «Агропромформ». – М., 1990 – 16 с.

4. Биотехнологические методы получения и оценки оздоровленного картофеля / Л.Н. Трофимец, В.Б. Бойко, Т.В. Зейрук и др. – Москва: ВО «Агропромиздат», 1988. – 37 с.

5. Методичні рекомендації щодо проведення досліджень з картоплею / В.С. Куценко, А.А. Осипчук, А.А. Подгаєцький та ін. – Немішаєве, 2002. – 183 с.

Резюме

Наведено результати досліджень з вивчення впливу азотного живлення, температурних режимів та фотоперіоду на інтенсивність бульбоутворення картоплі в культурі *in vitro*.

Приведены результаты исследований по изучению влияния азотного питания, температурных режимов и фотопериода на интенсивность клубнеобразования картофеля в культуре *in vitro*.

Results over of researches are brought on the study of nitric feed, temperature conditions on intensity of potato in the culture of *in vitro*.

ЛЕНИВКО С.М., ЕРЧАК Н.П.* , КОВАЛЕНКО В.В.

Брестский государственный университет имени А.С. Пушкина,
Республика Беларусь, 224016, Брест, бульвар Космонавтов, 21, e-mail: lenivko@brsu.brest.by

*Университет естествознания и гуманитарных наук в Седльцах,
Польша, 08-110, Седльце, ул. 3 Мая-54

ВЛИЯНИЕ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ В КУЛЬТУРЕ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ ОЗИМЫХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Проблема оптимизации питательных сред для повышения индукции каллусогенеза в условиях *in vitro* для злаков является актуальной и разрабатывается по разным направлениям. Большинство проводимых исследований связано с поиском оптимальных концентраций различных регуляторов роста растений (2,4-дихлофеноксисукусной кислоты, 6-бензиламинопурина, индоллил-3-уксусной кислоты, кинетина) и их сочетаний для инициации первичного каллуса. Немаловажным, но малоисследованным, направлением является оптимизация минерального и органического компонентов

питательных сред. Опубликованные сведения об активном участии кремния в обменных процессах растений в условиях *in vivo* [1–3] указывают на перспективность исследований по использованию органических соединений кремния в качестве компонентов питательных сред в культуре *in vitro*, в первую очередь злаков, как кремнефильных культур. В связи с этим необходимо проведение детальных исследований, направленных на поиск кремнийорганических соединений, положительно влияющих на процесс каллусообразования в условиях *in vitro* при культивировании различных эксплантов *Triticum aestivum* L. На начальном этапе наших исследований в качестве эксплантов *Triticum aestivum* L. были использованы молодые листочки. В качестве объекта исследования выбраны листовые экспланты из-за возможности их получения независимо от вегетационного периода развития растений.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужили два сорта мягкой пшеницы с озимым типом развития – Легенда и Центос, районированные в Беларуси. В качестве эксплантов использовали базальные участки листовых пластинок, которые выделяли из колеоптилей 4–5 дневных проростков. Ростки стерилизовали 30% раствором гипохлорита натрия. Для индукции процессов каллусообразования в чашку Петри диаметром 40 мм помещали по 10 эксплантов на питательную среду MS (Murashige T., Skoog F.) [4], содержащую полный набор макро- и микросолей, мезоинозит, глутамин, сахарозу, агар-агар, 2,4-Д, никотиновую кислоту, тиамин, пиридоксин. Опираясь на результаты предыдущих наших исследований о положительном влиянии соединений кремния на всхожесть и энергию прорастания семян сортового и линейного материала *Triticum aestivum* L. [5], в качестве дополнительного компонента использовали синтезированные водорастворимые силильные соединения [(4-N-метил)-N'-пиперазинио]метилспироби(2,5-диокса-3-оксо-1-силациклопентан)ат (соединение 1) и гидрооксалат диметил(2-тиенил)- γ -[(N-метил)-N'-пиперазинопропил]силана (соединение 2) в ряде мольных концентраций (10^{-4} М, 10^{-5} М и 10^{-6} М). По каждому варианту опыта было выделено 60–70 эксплантов. Разработана схема экспериментов, согласно которой в каждом цикле проводилась одновременная посадка выделенных в асептических условиях молодых листочков двух сортов озимой мягкой пшеницы на один вариант питательной среды. Такой подход позволил получить наиболее сопоставимые данные по отзывчивости генотипов на условия культивирования и оценить темпы роста образовавшихся каллусов по их размеру. Культивирование эксплантов на дополненных питательных средах MS проводили в течение 3–4 недель в термостате при постоянной температуре 26°C в темноте.

Результаты и обсуждение

Оценку отзывчивости листовых эксплантов двух сортов озимой мягкой пшеницы на условия *in vitro* проводили на 30 день.

Культивирование листовых эксплантов двух сортов Центос и Легенда озимой мягкой пшеницы на дополненных питательных средах MS показало, что зависимость частоты каллусообразования от концентрации соединения 1 (рисунок 1) и соединения 2 (рисунок 2) носила нелинейный характер.

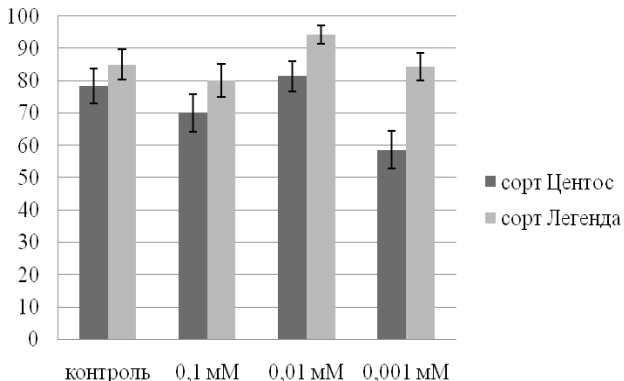


Рисунок 1. Частота каллусообразования в культуре листовых эксплантов двух сортов мягкой пшеницы при различных концентрациях соединения 1

Анализ полученных данных по влиянию кремнийорганического соединения 1 показал, что концентрация 10^{-5} М благоприятно влияет на частоту каллусообразования при культивировании листовых эксплантов двух сортов. Превышение контрольных значений составило 3,21% у сорта Центос и 10,13% у сорта Легенда. Соединение 1 в более высокой концентрации (10^{-4} М) снизило частоту каллусообразования на 7,44% у сорта Центос и на 5,11% у сорта Легенда. Самая низкая концентрация (10^{-6} М) соединения 1 незначительно повлияла на процесс формирования каллусной ткани у сорта Легенда и существенно снизила данный показатель на 19,62% у сорта Центос.

Использование соединения 2 в качестве кремнийорганической добавки показало, что превышение данных контроля наблюдалось только в одном варианте опыта. Так при культивировании листовых эксплантов сорта Центос на питательной среде с добавлением 10^{-5} М силильного соединения 2 частота формирования каллусов на 4,21% была выше по сравнению с контролем. Значительное снижение оцениваемого показателя на 21,78% по сравнению с данными контроля наблюдалось при культивировании листовых эксплантов сорта Легенда на питательной среде MS, содержащей 10^{-4} моль/л соединения 2.

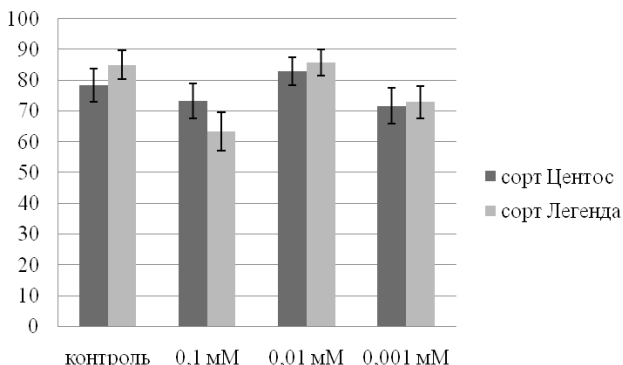


Рисунок 2. Частота каллусообразования в культуре листовых эксплантов двух сортов мягкой пшеницы при различных концентрациях соединения 2

Максимальный показатель частоты каллусообразования (95,24%) отмечен на питательной среде содержащей 10^{-5} моль/л соединения 1 при культивировании листовых эксплантов сорта Легенда. Минимальный показатель частоты каллусообразования (58,57%) отмечен на питательной среде с содержанием соединения 1 в концентрации 10^{-6} моль/л при культивировании листовых эксплантов сорта Центос.

Таким образом, наши исследования показали влияние кремнийорганического компонента в составе питательной среды MS на индукцию каллусообразования в культуре листовых эксплантов двух сортов озимой мягкой пшеницы. При добавлении исследуемых соединений в концентрациях 10^{-5} М наблюдалось повышение частоты каллусообразования в трех из четырех вариантов опыта. Только при культивировании листовых эксплантов сорта Легенда применение 10^{-5} М концентрации соединения 2 не сказалось на частоте каллусообразования, значения в этом варианте опыта и в контроле были близкими. Несмотря на сходную тенденцию повышения частоты каллусообразования при добавлении в питательную среду MS 10^{-5} М концентраций исследуемых соединений, нами отмечена различная реакция сортов Центос и Легенда при применении высоких и низких мольных концентраций исследуемых соединений. Возможно, наблюдаемые различия связаны с исходным содержанием кремния в этих сортах, что обусловило их различную чувствительность к кремниевым соединениям разного строения.

Выводы

Кремнийорганический компонент в составе питательной среды MS оказывает влияние на индукцию каллусообразования в культуре листовых эксплантов озимых сортов Центос и Легенда мягкой пшеницы. Для выяснения закономерностей в системе концентрация–эффект по каждому соеди-

нению необходимо проведение дальнейших исследований с использованием ряда сортов мягкой пшеницы.

Работа поддержана ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологии».

Литература

1. Матыченков В.В. Роль подвижных соединений кремния в растениях и системе почва–растение: автореф. дис. ... док. биол. наук : 24.12.2008 / Институт фундаментальных проблем биологии РАН. – Пушкино, 2008. – 34 с.

2. Смолин Н.В., Савельев А.С. Влияние регуляторов роста на зараженность растений озимой ржи *Puccinia recondite* и *Blumeria graminis F. sp. Secalis* // Научный журнал КубГАУ. – 2007. – №27(3). – С. 8–23.

3. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. – М.: Мир, 1989. – 439 с.

4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiology Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

5. Ленивко С.М., Ерчак Н.П., Коваленко В.В., Кирисюк Ю.В., Кобак Е.Г. Новый подход по оптимизации питательных сред для культивирования эксплантов пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Веснік Брєсцкага унїверсітєта. Сер. 5. – 2011. – № 2. – С. 48–52.

Резюме

Впервые исследована возможность использования кремнийорганических соединений [(4-N-метил)-N'-пиперазинио]метилспироби(2,5-диокса-3-оксо-1-силациклопентан)ата и гидрооксалата диметил(2-тиенил)-γ-[(N-метил)-N'-пиперазинопропил]силана в качестве компонентов питательной среды MS для культивирования листовых эксплантов двух озимых сортов Центос и Легенда мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Показано положительное влияние 10⁻⁵М концентраций исследуемых соединений.

Вперше досліджено можливість використання кремнійорганічних сполук [(4-N-метил)-N'-піперазініо]метилспироби(2,5-діоксу-3-оксо-1-силациклопентан)ату і гідрооксалату диметил(2-тієніл)-γ-[(N-метил)-N'-піперазінопропил]силана в якості компонентів поживного середовища MS для культивування листових експлантів двох озимих сортів Центос і Легенде м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.). Виявлений позитивний вплив 10⁻⁵М концентрацій досліджуваних сполук.

For the first time there was investigated the possibility to use organosilicon compounds [(4-N-methyl)-N'-piperasinio]methylspirobi(2,5-dioxa-3-oxo-1-silacyclopentane)ate and hydrooxalate dimethyl(2-thienyl)-γ-[(N-methyl)-N'-piperasinepropyl]silane as components of culture medium MS to cultivate leaf explants of the two kinds Centos and Legenda of winter common wheat (*Triticum aestivum* L.). The positive influence of 10⁻⁵M concentrations of these compounds was shown.

НАКОПИЧЕННЯ ПОЛІФРУКТАНІВ СУСПЕНЗІЙНИМИ ТА КАЛУСНИМИ КЛІТИННИМИ КУЛЬТУРАМИ, КУЛЬТУРОЮ „БОРОДАТИХ” КОРЕНІВ ТА ОРГАНАМИ РОСЛИН ТОПІНАМБУРУ (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.)

Топінамбур (*Helianthus tuberosus* L.) – багаторічний вид рослин північноамериканського походження родини Складноцвітних. Топінамбур відомий видозміненими підземними пагонами – столонами – здатними накопичувати кетоцукри, зокрема інулін, який є запасним полімером фруктози. Поліфруктани характеризуються множиною корисних властивостей і використовуються в медицині як цукрозамісники при цукровому діабеті [1], сорбенти та пробіотики для нормалізації мікрофлори кишечника [2], також показано позитивний вплив кетоцукрів на імунну систему [3]. Крім того, топінамбур розглядається як джерело генів, що відповідають за синтез кетоцукрів, для генетичної інженерії з метою вивчення особливостей їх перенесення та експресії, і накопичення полімерів фруктози в запасючих органах картоплі та цукрового буряку [4]. Клоновано гени 1-сахараза: сахарозофруктозилтрансферази, 1-фруктан:фруктанфруктозилтрансферази [5,6], також – цитохрому P450 [7], лектинів [8] тощо. Топінамбур є досить стійкою до шкідників та невибагливою до фізико-хімічних факторів середовища рослиною з швидким приростом біомаси, що робить його перспективною культурою для сільського господарства, джерелом сировини для виробництва біопалива та потенційною системою для гетерологічної експресії генів. Представлена робота описує особливості накопичення поліфруктану інуліну клітинними суспензійними та калусними культурами, культурою „бородатих” коренів та органами рослин топінамбуру.

Матеріали та методи

В якості вихідного рослинного матеріалу використовували асептичні бруньки столонів, стебла та листя рослин, які поверхнево-стерилізували послідовним зануренням у 70% розчин етанолу протягом 2хв., 20% розчин відбілювачу (2% гіпохлориту натрію) протягом 15 хвилин та наступним 4-разовим відмиванням стерильною дистильованою водою. Асептичні експланти перенесли на живильні середовища MS [9], SH [10] та MS з половинним вмістом мікро- та макросолей без додавання фітогормонів та культивували в умовах 16-годинного фотоперіоду при температурі 24°C. Суспензійні культури ініціювали з неморфогенного калусу, отриманого на твердому живильному середовищі MS, і культивували в рідкому живильному середовищі MS з додаванням 2 мг/л 2,4-дихлорофеноксоцтової кислоти у колбах об'ємом 0,5 л на ротаційному шейкері (125 об./хв.) при 24°C, 16-годинному фотоперіоді.

Для отримання культури „бородатих” коренів топінамбуру проводили генетичну трансформацію аспігичних листових та стеблових експлантів з використанням агропінового штаму A4 *Agrobacterium rhizogenes*. Суспензійну бактеріальну культуру вирощували у рідкому живильному середовищі Лурія-Бертані (пептон 10г/л, дріжджовий екстракт 5г/л, NaCl 10г/л, рН=7.2) на орбітальному шейкері (200 об./хв.) за температури 28°C протягом 24 годин. Отриману бактеріальну культуру осаджували центрифугуванням (5000 об./хв., 10 хв.). Отриманий осад ресуспедували в рідкому середовищі MS з додаванням 200 мкМ ацетосирингону та культивували на ротаційному шейкері (200 об./хв.) за температури 28°C протягом години. Листові експланти та фрагменти стебел інкубували у бактеріальній суспензії протягом 20 хв. та піддавали вакуумній інфільтрації. Для трансформації експланти викладали на безгормональне живильне середовище MS без додавання антибіотиків на ніч. Надалі експланти переносили на агаризоване живильне середовище MS з додаванням 500 мг/л цефотаксиму для елімінації бактерій та культивували при температурі 24°C в умовах 16-годинного фотоперіоду з періодом субкультивування 3-4 тижні. Сумарну рослинну ДНК екстрагували згідно Doyle J.L. та Doyle J.J [11]. ПЛР-аналіз проводили з використанням праймерів 5'-atggatccsaaattgctattcctctccacga-3', 5'-ttagcctcttcttcaggtttact gcagc-3' для доведення присутності *rolB* гена з метою підтвердження трансгенної природи отриманої культури та 5'-atgctcgcaaggcagtaagccsa-3', 5'-ggagctcttcagcatggagca-3' для виявлення присутності *virD1* гена з метою виявлення бактеріального забруднення. Ампліфікація фрагменту гена *rolB* проходила за наступних умов: денатурація 94°C/5 хв; 30 циклів ампліфікації (денатурація 94°C/30 с, відпал 65°C/30 с, синтез 72°C/45 с); заключний синтез 72°C/5 хв.; ампліфікація фрагменту гена *virD1* проходила за наступних умов: денатурація 94°C/5 хв; 30 циклів (денатурація 94°C/30с, відпал 60°C/30с, синтез 72°C/35с); заключний синтез 72°C/5хв. Продукти реакції фракціонували в 1% агарозному гелі в трис-боратній буферній системі.

Вміст інуліну визначали за методом Мак-Пері та Слаттері [12], який базується на реакції Селеванова, суть якої полягає в здатності кетоцукрів забарвлюватись резорцином в кислому середовищі. Зразки культури трансгенних коренів, калусних та суспензійних культур, листя, стolonів висушували протягом доби при кімнатній температурі. До 100 мг подрібненого сухого рослинного матеріалу додавали 5 мл дистильованої води, поліфруктани екстрагували на водяній бані протягом 20 хв. при температурі 80°C. Далі відбирали 0,5 мл екстракту і додавали 0,5 мл 0,1% розчину резорцину та 0,5 мл концентрованої соляної кислоти, нагрівали на водяній бані протягом 20 хв. при температурі 80°C. Отримані розчини охолоджували та вимірювали інтенсивність забарвлення на ФЕК при довжині хвилі 540 нм. Концентрацію визначали за калібрувальним графіком, побудованим на основі вимірювання інтенсивності забарвлення стандартних розчинів фруктози концентрацією 0; 1,25; 2,5; 5 мг/мл.

Результати та обговорення

Інтенсивну індукцію морфогенного та неморфогенного калусогенезу на листових та стеблових експлантах топінамбуру (рис. 1а) спостерігали на середовищі MS без додавання фітогормонів через 2-4 тижні після поверхневої стерилізації експлантів, на відміну від даних Таха H.S. *et al.* та Yeoman M.M. *et al.* [13, 14], де показано низький рівень або відсутність калусотворення на середовищах без додавання регуляторів росту. Ініціацію прямої регенерації рослин на черешкових експлантах (рис. 1б) спостерігали через 1-2 тижні культивування на середовищах SH та MS з половинним вмістом мікро- та макросолей. Клітинну суспензійну культуру індукували через 3 тижні культивування неморфогенної калусної культури шляхом перенесення біомаси у рідке живильне середовище MS з додаванням 2 мг/л 2,4-дихлорофеноксоцтової кислоти та наступним культивуванням у колбах об'ємом 0,5 л на ротатійному шейкері (125 об./хв.) при 24°C, 16-годинному фотоперіоді. Ініціацію *Ri*-ризогенезу (рис. 1в) спостерігали в результаті агробактеральної трансформації листових та стеблових експлантів топінамбуру з використанням агропінового штаму A4 *A. rhizogenes* на безгормональному середовищі MS з додаванням антибіотику цефотаксиму у вказаній концентрації при 24°C в умовах 16-годинного фотоперіоду через 2-3 тижні культивування. Контрольні нетрансформовані експланти були нездатні до формування культури *Ri*-коренів. Частоту *Ri*-коренетворення, що становила $29,4 \pm 7,2\%$, визначали як відношення кількості точок ініціації коренетворення до загальної кількості трансформованих експлантів. За допомогою ПЛР-аналізу показано присутність *rolB* гену для 95-98% отриманих ліній (рис. 1г), що підтримує трансгенну природу отриманих кореневих культур, та відсутність агробактеріального забруднення.

Показано тенденцію до очікуваного збільшення вмісту поліфруктанів у калусних (до 567 мг/г сухої маси) та суспензійних (до 480 мг/г сухої маси) клітинних культурах у порівнянні з вмістом кетоцукрів у листі рослин (до 83 мг/г) та столонах рослин (317 мг/г) (рис. 2), а також достовірно вищий вміст поліфруктанів у зразках культури трансгенних коренів (до 680 мг/г сухої маси) у порівнянні іншими варіантами, можливо, через дію стресових факторів, пов'язаних з агробактеріальною трансформацією, і відповідно зміною рівня накопичення запасних речовин [15]. Так, для коренів трансгенних рослин цикорію (*Cichorium intybus* L.), регенованих з культури „бородатих” коренів, показано достовірно вищий вміст кетоцукрів (134,65-186,78 мг/г сухої маси) у порівнянні з відповідними показниками у зразках коренів нетрансгенних рослин (112-186 мг/г сухої маси). За умови агробактеріальної трансформації рослин цикорію з використанням векторних конструкцій, що містили ген чужорідного білку, вміст поліфруктанів був вищий (176-236 мг/г сухої маси) за описані варіанти дослідження.

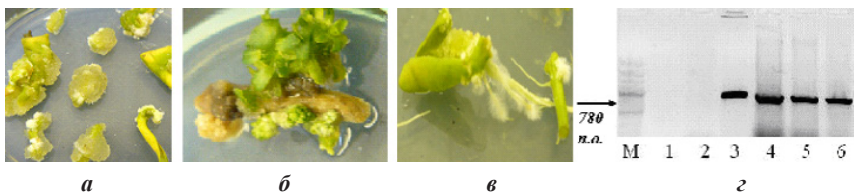


Рис. 1. Ініціація калусотворення (а) та пряма регенерація рослин (б) на експлантах черешків листя топінамбуру, індукція *Ri*-коренетворення (в) на черешкових експлантах, електрофореграма ПЛР-аналізу на присутність *rolB* гена (г): М – Маркер (1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 1 – негативний контроль (проба без ДНК), 2 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини), 3 – позитивний контроль (плазмідна ДНК (A4)), 4-6 – ДНК аналізованих зразків культури „бородатих” коренів

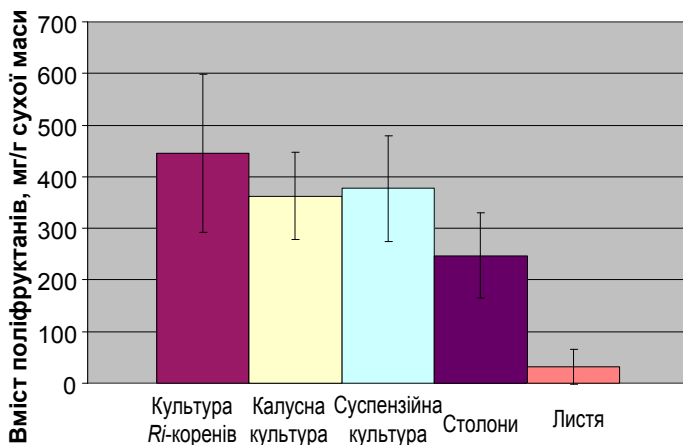


Рис. 3. Вміст поліфруктанів в різних культурах та органах рослин топінамбуру (мг на г сухої маси)

Висновки

Таким чином, описано особливості отримання калусних та суспензійних клітинних культур, а також прямої регенерації рослин топінамбуру в культурі *in vitro*. Показано тенденцію до збільшення вмісту поліфруктанів у калусних та суспензійних клітинних культурах у порівнянні з вмістом кетоцукрів у листі рослин, а також достовірно вищий вміст поліфруктанів у отриманій культурі трансгенних коренів у порівнянні з іншими варіантами дослідження.

Література

1. Van Loo J.P., Coussement P., De Leenheer L. et al. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet // Crit. Rev. Food Sci. Nutr., - 1995. - № 35. - P.525–552,
2. Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics // Nutr. Res. Rev. – 2005. – № 17. – P.259–275,
3. Watzl, B., Girrnbach, S., and Roller, M. Inulin, oligofructose and immunomodulation // Br. J. Nutr. – 2005. - № 93. – P.49–55,
4. Sévenier, R., Hall, R.D., van der Meer, I.M. et al. High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet // Nat. Biotechnol. - 1998. – № 16. – P.843–846,
5. Koops, A.J. and Jonker, H.H. Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* 'Columbia.' 1. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstruction of fructan synthesis *in vitro* with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyltransferase // Plant Physiol. - 1996. – № 110. – P.1167–1175,
6. Luscher, M., Purification and characterization of fructan:fructan fructosyltransferase from Jerusalem artichoke // New Phytologist - 1993. - № 123 - P.717–724,
7. Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, A. et al. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway // Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A., - 1993. - № 90. - P.4102–4106,
8. Suseelan, K.N., Mitra, R., Pandey, R. et al. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) // Arch. Biochem. Biophys. - 2002. - № 407 - P.241–247,
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol Plant.– 1962.– Vol.15, №3.– P. 473–496,
10. Schenk R. Hildebrand A. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // Can. J. Bot. – 1972. – № 50. P.199-204,
11. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – №12. – P.13–15,
12. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Яров Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987.– 143 с.,
13. Taha, H.S., El-sawy, A.M. and Bekheet, S.A. In Vitro Studies on Jerusalem Artichoke (*Helianthus Tuberosus*) and Enhancement of Inulin Production // J. Appl. Sci. Res. – 2007. – Vol.3 - № 9. – P.853-858,
14. Yeoman M.M., Brown R. Effects of mechanical stress on the plane of cell division in developing callus cultures // Ann Bot. – 1971. – № 35 – P.102–1112,
15. Матвеева Н. А, Кваско О. Ю. Особливості накопичення поліфруктанів в трансгенних рослинах цикорію // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. - Т.9 - №1.– С.65-69.

Резюме

В статті описано особливості отримання калусних та суспензійних клітинних культур, а також прямої регенерації рослин топінамбуру в культурі *in vitro*, визначено вміст кетоцукрів у отриманих культурах та показано тенденцію до збільшен-

ня вмісту поліфруктанів у калусних та суспензійних клітинних культурах і культури трансгенних коренів.

В статті описано особливості отримання калусних і суспензійних клітинних культур, а також особливості регенерації рослин топинамбура в культурі *in vitro*, определено содержание кетосахаров в отриманих культурах і показано тенденцію к увеличению содержания полифруктанов в калусных і суспензійних культурах і в культурі трансгенних коренів.

This article describes the peculiarities of obtaining of callus and suspension cell cultures and Jerusalem Artchoke plant regeneration *in vitro*. Polyfructan content was measured for the obtained cultures. The level of polyfructan accumulation in callus and suspension cell cultures and the obtained *Ri*-root one tends to be higher comparing to other variants.

**МАТВЕЕВА А.Ю., КУРЧИЙ В.М., СИРАНТ Л.В., МОРГУН Б.В.,
ТИЩЕНКО Е.Н.**

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: mgirais@mail.ru*

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ШТАММОМ GV3101 (pICH5290)

Поиск приемов и методов по повышению частоты интеграции Т-ДНК в геном растений остаётся актуальным вопросом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Одно из основных ограничений этой молекулярной биотехнологии по генетическому улучшению многих хозяйственно-ценных инбредных линий кукурузы связано с отсутствием эффективных способов регенерации *in vitro*. Поэтому представляет интерес разработка приёмов генетической трансформации, которые позволяют избежать трудоёмкие и экономически затратные процедуры культивирования *in vitro*. К их числу относится способ *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*, предложенный Чумаковым М.И и соавторами [1]. Оптимизировав его, нами получены трансгенные T0-растения инбредных линий кукурузы и их T1- и T2-поколения с целевым геном – супрессором пролинденогеназы [2].

Наряду с оптимизацией условий интеграции Т-ДНК, немаловажное значение имеет изучение физиолого-биохимических изменений, происходящих в процессе трансгенеза растений, и их отдалённых последствий на рост, развитие и продуктивность. Поскольку *Agrobacterium tumefaciens* патоген, способный приводить даже к программированной гибели клеток кукурузы, трансформация *in planta* генеративных тканей с использованием обезоруженных штаммов может оказывать влияние на процесс эмбриогенеза, а также синтез/ метаболизм запасных веществ. Одна из сторон этого вопроса связана с запасными белками и углеводами. Для кукурузы как крахмал-содержащего растения, представляет интерес изучение метабо-

лизма сахарозы, являющейся источником не только углерода и энергии в растущих и развивающихся гетеротрофных тканях зерновок, но и нуклеозиддифосфатсахаров – субстратов для биосинтеза крахмала и полисахаридов клеточных стенок. Баланс между сахарами как регуляторными молекулами, которые согласно современным представлениям принимают участие в контроле ряда физиологических процессов, и компонентами метаболических путей является результатом функционирования энзимов сахарозосинтазы и инвертазы [3, 4]. Целью данной работы было получение методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* T0- и T1-растений инбредных линий кукурузы, содержащих *bar*-ген устойчивости к фосфинотрицину, и анализ качества их зерновок по экспрессии генов запасных белков и метаболизму сахарозы.

Материалы и методы

Инбредные линии кукурузы 250, 1555, 1580 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины) трансформировали частично модифицированным нами методом Чумакова и соавт. [1] с использованием штамма GV3101, несущего векторную конструкцию pICH5290 с *bar*-геном устойчивости к фосфинотрицину (любезно предоставленную Институтом клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины). ДНК выделяли из листьев T0-проростков, наличие *bar*-гена в геноме кукурузы определяли ПЦР-методом, используя праймеры 5'-GCGGT STGCA CСATC GTCAAC-3' (F) и 5'-CAGAT CTCGG TGACG GGCAG GAC-3' (R). Условия амплификации ДНК: преденатурация 94 °C 4 мин; 35 циклов: денатурация – 94 °C 30 с; реассоциация – 59 °C 1 мин; синтез – 72 °C 18 с; конечная элонгация – 72 °C 10 мин. Отсутствии примесей *A. tumefaciens* в растительных тканях анализировали, используя праймеры к гену *virD1*. Электрофорез ДНК проводили в 1,2 %-ном агарозном геле при напряжённости электрического поля 5 В/см в течение 45 мин в буфере 0,5× ТБЕ в присутствии 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Выделение и электрофорез запасных белков кукурузы проводили согласно рекомендациям Попереля Ф.А. и Асыки Ю.А. [5]. Активность энзимов сахарозосинтазы (СС), вакуолярной (ВИ) и цитоплазматической (ЦИ) инвертазы, а также содержание сахарозы, моносахаров и крахмала в эндосперме T1-растений на стадии молочно-восковой зрелости (14 день после опыления) определяли методами, описанными ранее [6]. Достоверность полученных результатов определяли по критериям Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Варьируя составом сред для инокуляции, концентрацией клеток агробактериальной суспензии штамма GV3101 (pICH5290) и условиями инфицирования *in planta*, были получены початки инбредных линий кукурузы 250, 1555, 1580. Молекулярно-генетический анализ произвольной выборки зерновок показал наличие селективного *bar*-гена в геноме кукурузы (рис. 1). Согласно результатам ПЦР-анализа, где в качестве маркера использовали ген *virD1*, в листьях растений отсутствовала примесь агробактерии (данные не приведены).

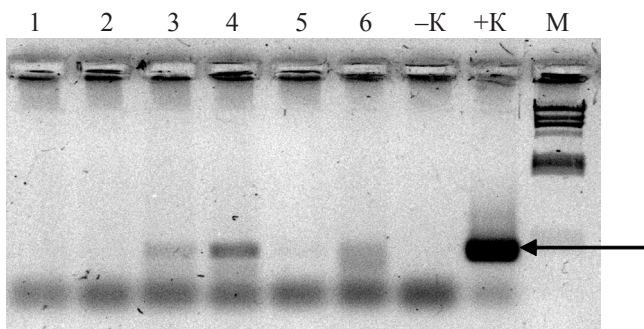


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК генотипов инбредных линий кукурузы 1555 (1-4), 1580 (5, 6), трансформированных *in planta* штаммом GV3101 (pICH5290), с использованием праймеров к гену *bar*; ожидаемый размер ампликона составлял 494 п.н.: 1, 2, 5 – ДНК листьев контрольных (нетрансформированных) растений; 3, 4, 6 – ДНК листьев трансформированных растений; М – маркер молекулярных масс – ДНК бактериофага λ , гидролизованная эндонуклеазой HindIII.

Одним из удобных биохимических показателей, который позволяет оценить последствия генетической трансформации клеток генеративных тканей кукурузы обезоруженными штаммами *A. tumefaciens* на процессы оплодотворения и эмбриогенеза, являются запасные белки. Спектр полипептидов зеинов на стадии полной спелости зерновок T0-растений инбредных линий кукурузы не выявил достоверных отличий между трансформированными и нетрансформированными вариантами (рис. 2).

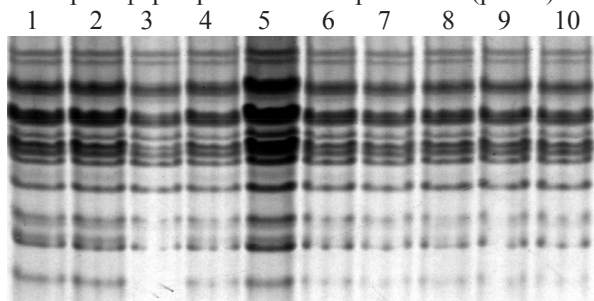


Рис. 2. Электрофореграмма полипептидов запасных белков – зеинов контрольных (J250 1-2, 1580 6-7) и инфицированных *in planta* растений инбредных линий кукурузы J250 (3-5) и 1580 (8-10) с помощью GV3101 (pICH5290).

Аналогичные результаты были получены нами ранее и для LBA4404 (pVi2E) [7]. Это позволяет предположить, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация не оказывает существенного влияния на процесс биосинтеза запасных белков.

В отличие от экспрессии генов зеинов в эндосперме развивающихся зерновок трансформированных линий кукурузы наблюдались изменения в метаболизме сахарозы. На рис. 3, 4 представлены результаты исследования активности ферментов сахарозосинтазы и инвертазы, катализирующих реакции соответственно синтеза/расщепления и гидролиза сахарозы.

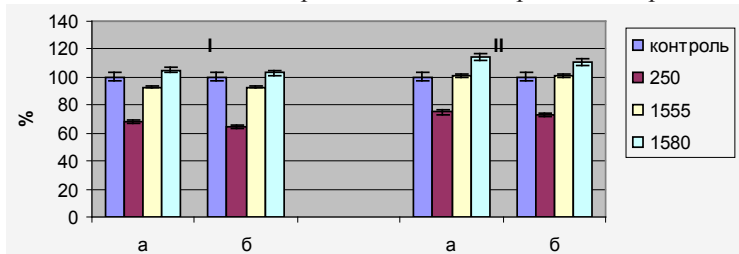


Рис. 3. Удельная (а) и общая (б) активность СС: I – в реакции синтеза сахарозы, II – в реакции расщепления с УДФ в эндосперме Т1-растений, полученных после инфицирования *in planta* генеративных тканей штаммом GV3101 (pICH5290), % от контроля.

Как видно из представленных данных, в реакции синтеза сахарозы трансформированных растений генотипов Л250 и Л1555 в отличие от Л1580 происходило достоверное снижение относительных значений удельной (ОУА) и общей (ООА) активности, причем больший негативный эффект был характерен для первой линии (на 32% и 35% соответственно для ОУА и ООА). Что касается реакции расщепления сахарозы СС, которая проводилась с субстратом УДФ в концентрации, соответствующей максимальной скорости реакции, то ответная реакция на инфицирование обезоруженным штаммом приводила как к понижению ОУА (на 25%) и ООА (на 27%) для Л250, так и к повышению соответственно на 14% и 11% для Л1580. Для генотипов Л1555 активность СС не изменялась.

Гидролиз сахарозы осуществляет инвертаза, необратимо катализирующая реакцию с образованием двух гексоз, которые в дальнейшем включаются в процессы гликолиза и дыхания и могут быть потенциальными регуляторными молекулами. На рис. 4 представлены результаты сравнительного изучения активности вакуолярной и цитоплазматической инвертазы в эндосперме Т1-растений.

ОУА и ООА ВИ для Л250 возрастала соответственно на 21% и 17%, притом, что для 1555 и 1580 – их значения достоверно не различались. Активность ЦИ у генотипов инбредной линии 250 также стимулировалась (ОУА и ООА соответственно на 19% и 16%). Это же касается и Л1580 (на 12% и 9%). В целом же, в ответ на *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию наблюдались генотипические различия функционирования энзимов ВИ и ЦИ, связанные как с повышением, так и понижением относительных значений удельной и общей активности этих форм инвертазы.

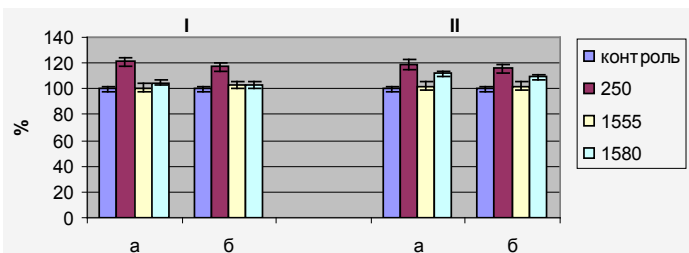


Рис. 4. Удельная (а) и общая (б) активность инвертазы: I - VI, II - CI в эндосперме молочно-восковой зрелости T1-растений, полученных после инфицирования генеративных тканей штаммом GV3101 (pICH5290), % от контроля.

Что касается углеводов, то по сравнению с контролем у генотипов трансформированных растений Л1555 и Л1580 наблюдалось повышение содержания сахарозы соответственно на 48 и 23%, тогда как количество моносахаров – только у линии 250 (на 15%) (табл. 1). В результате этого соотношение сахароза/моносахара относительно контроля для генотипов 1555 и 1580 возрастало, в то время как для Л250 – уменьшалось. Содержание крахмала, наоборот, снижалось у Л250 и Л1580 (на 29% и 25%, соответственно), тогда как у 1555 оставалось на неизменном уровне. Представленные данные свидетельствуют о варьировании содержания углеводов, а также баланса сахарозы и гексоз в ответ на *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию как результат изменений в активности энзимов метаболизма сахарозы.

Таблица 1

Содержание углеводов в эндосперме зерновок T1-растений кукурузы на стадии молочно-восковой спелости

Вариант	Сахароза, мкмоль на г ткани	Моносахара, мкмоль на г ткани	Крахмал, мкмоль глюкозы на г ткани	Сахароза / Моносахара
Л250 - Контроль	$366,3 \pm 7,4$ 100%	$151,8 \pm 1,6$ 100%	$151,8 \pm 1,6$ 100%	2,4
250 - GV3101 (pICH5290)	$361,6 \pm 6,3$ 99%	$174,1 \pm 0,5^*$ 115%	$30,7 \pm 0,2^*$ 71%	2,1
Л1555 - Контроль	$262,8 \pm 3,1$ 100%	$123,6 \pm 1,3$ 100%	$34,8 \pm 0,5$ 100%	2,1
1555 - GV3101 (pICH5290)	$390,0 \pm 4,1^*$ 148%	$128,8 \pm 1,1$ 104%	$34,5 \pm 1,1$ 99%	3,0
Л1580 - Контроль	$316,6 \pm 4,2$ 100%	$127,3 \pm 1,6$ 100%	$102,1 \pm 0,5$ 100%	2,49
1580 GV3101 (pICH5290)	$390,0 \pm 5,8^*$ 123%	$128,4 \pm 2,8$ 101%	$76,8 \pm 4,5^*$ 75%	3,04

Примечание: * – достоверная разница между контролем и вариантами при $p < 0,05$.

Выводы

Таким образом, методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* получены T0- и T1-растения кукурузы с перенесенным *bar*-геном. В процессе трансгенеза изменений в экспрессии генов запасных белков не наблюдалось, вместе с тем в зависимости от генотипа осуществлялась стимуляция/ингибирование активности энзимов сахарозосинтазы и инвертазы, в результате чего варьировало содержание углеводов и изменялся баланс сахарозы к гексозам.

Литература

1. Чумаков М.И. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* / М.И. Чумаков, Н.А. Рожок, В.А. Великий и др. // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 8. – С. 1083-1088.
2. Матвеева А.Ю. Активность сахарозосинтазы и инвертазы эндосперма кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированной *in planta* обезоруженными штаммами *Agrobacterium tumefaciens* / А.Ю. Матвеева, В.Д. Сакало, В.М. Курчий и др. // Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 55-64.
3. Сакало В.Д. Регуляция метаболизма сахарозы у свёклы и других культур / В.Д. Сакало. – Киев: Логос, 2006. – 248 с.
4. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development / K. Koch // Current Opinion in Plant Biology. 2004. – 7. – P. 235-248.
5. Попереля Ф.А. Методические указания по электрофорезу зерна кукурузы для определения процента гибридности семян F1 / Ф.А. Попереля, Ю.А. Асыка. – М., 1988.
6. Сакало В.Д. Активність сахарозосинтази та інвертази в етіологованих проростках кукурудзи за дії стресових чинників / В.Д. Сакало, В.М. Курчий // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 5. – С. 400-407.
7. Матвеева А.Ю. Изменения функционирования энзимов метаболизма сахарозы в проростках инбредных линий кукурузы, инфицированной *in planta* штаммом GV2260, содержащим плазмиду pCB002 / А.Ю. Матвеева, В.М. Курчий, Л.В. Сирант и др. // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. – Київ: Логос, 2011. – Т. 11. – С. 340-345.

Резюме

Аналізували експресію генів запасних білків і метаболізм сахарози в рослинах інбредних ліній кукурудзи, трансформованих *in planta* штаммом GV3101 (pICH5290). Показано, що в процесі трансгенезу змін у експресії генів запасних білків не спостерігалось, разом з тим у залежності від генотипу здійснювалась стимуляція/інгібування активності ензимів сахарозосинтази й інвертази, а також варіював вміст вуглеводів й змінювався баланс сахарози і гексоз.

Аналізували експресію генів запасних білків і метаболізм сахарози в рослинах інбредних ліній кукурудзи, трансформованих *in planta* штаммом GV3101 (pICH5290). Показано, що в процесі трансгенезу змін в експресії генів запасних білків не спостерігалось, разом з тим у залежності від генотипу здійснювалась стимуляція/інгібування активності ензимів сахарозосинтази й інвертази, а також варіював вміст вуглеводів й змінювався баланс сахарози і гексоз.

Storage proteins gene expression and sucrose metabolism enzymes of maize inbred lines plants, transformed *in planta* with GV3101 (pICH5290) strain were analyzed. Changes in gene expression of storage proteins at the transgenesis process were not observed. At the same time stimulation/inhibition of enzyme activity both sucrose synthase and invertase realized dependently from the genotype. Side by side carbohydrate content as well as sucrose/hexoses balance varied.

**МАТВЕЕВА Н.А., ШАХОВСКИЙ А.М., КОМАРНИЦКИЙ И.К.,
КВАСКО Е.Ю., КИЩЕНКО Е.М.**

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: joyna56@gmail.com*

СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С ГЕНОМ *hTert* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Генетическая трансформация растений с использованием бактерий *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes* давно используется для переноса генов в геном растений. В основе этого метода лежит природная способность агробактерий вызывать у многих видов двудольных у растений образование т. н. корончатых галлов или бородачатых корней [1, 2]. С помощью бактерий рода *Agrobacterium* в растительный геном перенесен целый ряд генов, а исследования касаются широкого спектра видов растений.

Возможно, растения также могут быть использованы для генетической трансформации геном *hTert*, кодирующим каталитический компонент теломеразы. Изучение теломеразы является в настоящее время актуальным направлением на стыке ряда научных дисциплин - физиологии, генетики, биотехнологии, медицины. История открытия и изучения теломеразы достаточно давняя. Еще в начале 20 ст. Каррель и его сотрудники [3] выявили возможность очень длительного культивирования фибробластов из сердца куриного эмбриона. В 1961 г. Хейфлик опубликовал данные о существовании временного предела для культивирования диплоидных фибробластов человека [4]. В результате исследований А. М. Оловникова [5] было высказано предположение о недорепликации и постепенном укорачивании ДНК, что ограничивает пролиферативный потенциал клеток. В 2009 г. за открытие механизма действия теломеразы Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider и Jack W. Szostak была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Актуальность исследований активности теломеразы состоит в ее участии в процессах старения, а также в процессе перерождения нормальных клеток в злокачественные.

Реализация достижений биотехнологии, в частности, генетической инженерии, может дать возможность изучать синтез и функционирование теломеразы с использованием растительных систем. Такой фермент может быть использован для исследования процесса канцерогенеза и создание ле-

чебных средств «нового» поколения для борьбы с онкологическими заболеваниями. Кроме того, представляет интерес изучения трансгенных растений с геном теломеразы человека с точки зрения влияния присутствия этого гена на продолжительность жизни растений, а также возможность функционирования этого гена в растительном геноме. Вместе с тем, в настоящее время отсутствуют публикации относительно перенесения гена *hTert* в геном растений.

Нами в качестве объектов трансформации геном *hTert* использовали растения *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana.

Материалы и методы

Для трансформации табака листья растений, культивируемых *in vitro* на среде ½ МС (среда Мурасиге и Скуга [6] с уменьшенным вдвое содержанием макроэлементов), резали на фрагменты, культивировали их в течение 30 минут в суспензии *A. tumefaciens* с вектором pCB181 и далее переносили на среду МС [6] с добавлением 1 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 0,5 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК). Через двое суток экспланты переносили на ту же среду, дополненную цефатоксимом (600 мг/л) и культивировали на ней в течение 7 суток. Далее листья культивировали на среде МС, дополненной БАП (1 мг/л), НУК (0,5 мг/л), канамицином (50 мг/л) и цефатоксимом (600 мг/л).

Т-ДНК вектора pCB181 содержала целевой ген теломеразной обратной транскриптазы *hTert* (human telomerase reverse transcriptase) под контролем промотора 35S ВМЦК и терминатора *ocs*, а также селективный ген *nptII* под контролем *nos* промотора и терминатора (рис.1).

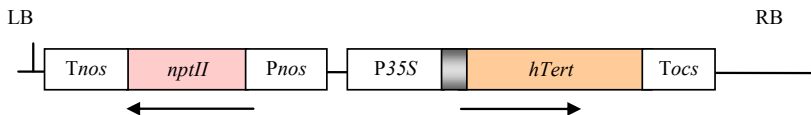


Рис.1. Схема Т-ДНК вектора pCB181, использованного для трансформации растений табака

Частоту регенерации растений определяли в процентах как отношение количества эксплантов с регенерированными зелеными растениями к общему количеству эксплантов.

Геномную ДНК выделяли из листьев стерильных растений ЦТАБ методом [7]. ПЦР-амплификацию ДНК проводили на амплификаторе Mastercycler personal 5332 (Eppendorf). Реакционная смесь (20 мкл) содержала однократный ПЦР-буфер с сульфатом аммония, 0,25 мкМ соответствующих праймеров (табл.), 200 мкМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 0,5 ед. Taq-полимеразы, 10-50 нг ДНК-пробы. К реакционной смеси также добавляли или 10% ДМСО, или 10% глицерина, или не добавляли эти компоненты. Общий объем реакционной смеси - 20 мкл. Изучали возможность использования двух пар праймеров (см. табл., № 1 и

2) при разных температурах. Условия проведения реакции: денатурация – 94 °С, 3 мин, 30 циклов амплификации 94°С, 45 сек.– 70°С, (55,5°С, 60,8°С, 66,0°С, 69,7°С – при оптимизации условий амплификации), 30 с - 72°С, 30 с., заключительный синтез - 72°С, 3 мин.

Таблица

Праймеры, которые были использованы для подтверждения присутствия генов *nptII* и *hTert*

№	Ген	Праймеры	Размер амплифицированного фрагмента, п.н.
1	hTert	5'- ggcgacgacgtgctgttca-3' 5'-cagcgggcagtgctcttga -3'	813
2	hTert	5'- tcctgcctgaaggagctgttg - 3' 5' - aacggcagactcggctggcac - 3'	479
3	nptII	5'- cctgaatgaactccaggacaggca-3' 5'- gctctagatccagagtcccgctcagaag-3'	622

Результаты исследования

После кокультивирования эксплантов с агробактериями очень быстро, уже через 10-14 суток началась прямая регенерация растений (на всех эксплантах кроме одного каллусная ткань отсутствовала). Частота регенерации составила 48%, при этом все растения, которые формировались в присутствии селективного антибиотика (50 мг/л канамицина), были зелеными. Растения высотой около 5 мм отделяли от эксплантов и переносили на среду ½ МС с канамицином и цефатоксимом, на которой через 7-10 суток формировались корни. Следует отметить, что все полученные растения не отличались от контрольных нетрансформированных, имели нормальную морфологию, образовывали корни.

Для выяснения того, действительно ли полученные растения являлись трансформированными, использовали метод полимеразной цепной реакции. При оптимизации условий проведения ПЦР оказалось, что корректно могут быть использованы обе пары праймеров, причем при проведении реакции принципиальным и необходимым оказалось добавление в реакционную смесь ДМСО или глицерина, т.к. ген определялся только в присутствии этих реагентов (рис.2).

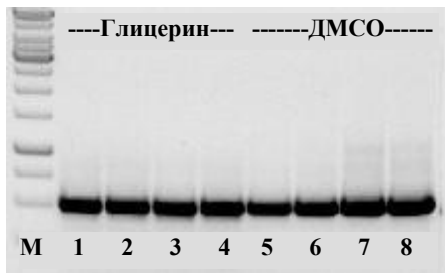


Рис.2. Влияние условий проведения ПЦР (10% ДМСО, 10% глицерин) на результаты амплификации гена *hTert*, плазмидная ДНК: 1 и 5 – 69,7°, 2 и 6 - 66°, 3 и 7 - 60,8°, 4 и 8 – 55,5°, праймеры №2

Выборочный ПЦР анализ полученных растений (15 образцов) показал, что все пробы имели как селективный ген *nptII* (рис.3), так и ген *hTert*.

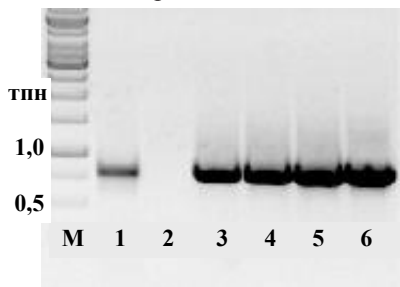


Рис.3. Электрофореграмма результатов анализа растений на присутствие гена *hTert*: М – маркер, 1 – плазмидная ДНК; 2- ДНК контрольного растения; 3-6 – ДНК растений, полученных после трансформации вектором рСВ181 (праймеры №1)

Вместе с тем, оказалось, что у части растений детектировали *virD1*, что указывало на присутствие агробактерий. Очевидно, очень быстрая регенерация и, таким образом, короткий срок культивирования растений в присутствии селективного антибиотика (только 2 мес) оказался недостаточным для элиминации бактерий. Повторный анализ через 6 мес. показал отсутствие *vir* района, вместе с тем ген *hTert* детектировался. Это свидетельствует о том, что регенерированные в селективных условиях растения действительно являются трансгенными.

На одном из эксплантов наблюдался рост каллусной ткани, из которой через 3 месяца после трансформации формировались побеги. Регенерация растений продолжалась длительное время, все исследованные растения имели целевой ген.

В результате проведенной работы была достигнута поставленная цель и получены трансгенные растения табака с геном *hTert*, кодирующим теломеразную обратную транскриптазу. Вместе с тем, результаты исследований ставят много новых вопросов, например, будет ли экспрессироваться перенесенный ген в клетках растения, будет ли активна теломеразная обратная транскриптаза, синтезированная растениями, повлияет ли перенесение гена на жизненный цикл растений и другие.

Выводы

Проведенные исследования показали, что ген *hTert* может быть перенесен в геном растений (на примере растений *Nicotiana tabacum*) с использованием метода *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Частота трансформации оказалась достаточно высокой и составила 48%. Процесс прямой регенерации протекал быстро, поскольку уже через 1 месяц после трансформации были получены растения, которые, согласно результатам ПЦР, имели целевой ген.

Литература

1. Nester E.W., Gordon M.P., Amasino R.M., Yanofsky M.F. Crown gall: a molecular and physiological analysis // Annual Rev. of Plant Physiol. - 1984. – vol. 35, P. 387-413.

2. Binns A.N. and Thomashow M.F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants // Annual Rev. of Microbiol. - 1988. - vol. 42, P. 575-606.

3. Carrel A. Artificial activation of growth in vitro of connective tissue // J.Exp. Med.- 1913. - vol. 17. - P. 14-19.

4. Haiflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains // Exp.Cell Res. - 1961. - vol.25. - P. 585-621.

5. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // J. Theor. Biol.- 1973. - vol. 41, № 1 - P.181-190.

6. Murashige T. Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. - 1962. - vol.15, №3. - P. 473 - 497.

7. Дрейнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений. В кн. Генная инженерия растений. - М: Мир. - 1991.- С.241-245.

Автори виражають признательность член-корр. РАНН, профессору Ф.Л.Киселеву (НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАНН, Россия) за предоставленную возможность использования гена теломеразной обратной транскриптазы *hTert* в наших исследованиях.

Резюме

Проведена трансформация растений *Nicotiana tabacum* L. вектором, содержащим ген теломеразной обратной транскриптазы *hTert* и получены трансгенные растения табака с частотой 48%.

Проведено трансформацію рослин *Nicotiana tabacum* L. вектором, що містить ген теломеразної зворотної транскриптази *hTert* та отримано трансгенні рослини тютюну з частотою 48%.

The transformation of *Nicotiana tabacum* L. using the vector with human telomerase reverse transcriptase gene *hTert* carried out and transgenic tobacco plants at 48% frequency were obtained.

МИХАЛЬСКАЯ С.И.¹, АДАМЕНКО Н.И.¹, МОРГУН Б.В.², ТИЩЕНКО Е.Н.¹

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148

РЕГЕНЕРАЦИЯ *IN VITRO* ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ ПРИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Несмотря на значительные успехи селекционно-генетических программ по получению биотехнологических растений кукурузы (*Zea mays* L.), генетическая трансформация коммерческих генотипов не является рутинной и надёжно воспроизводимой. Один из ключевых этапов обсуждаемой методологии связан с тотипотентностью трансформированных клеток. Он имеет непосредственное отношение, с одной стороны, к выбору типа экспланта, оптимизации питательных сред и условий культивирования, взаи-

модействию генотип x окружающая среда, а с другой – к используемому методу доставки рекомбинантных молекул ДНК в геном кукурузы.

Традиционно, для реализации морфогенетического потенциала кукурузы *in vitro* в качестве экспланта используют незрелые зародыши [1-3]. Однако, способность к образованию эмбрионного каллуса – признак, присущий далеко не всем генотипам, что ограничивает возможности получения трансгенных растений-регенерантов. Наряду с использованием незрелых зародышей в последние годы с успехом начали разрабатываться системы методов генетической трансформации, где первичными эксплантами являются узелковые зоны побега, апикальные меристемы [4-7]. Исследования, сочетающие поиск наиболее подходящих для генетической трансформации эксплантов и оптимизацию условий культивирования, направлены на преодоление генотипической зависимости регенерационной способности элитных линий кукурузы. К числу основных проблем, связанных с реализацией его морфогенетического потенциала, относятся: зачастую низкая частота индукции каллусообразования и регенерации побегов, снижение уровня тотипотентности клеток при длительном культивировании, соматональная изменчивость, химерность [5].

Интерес к эксплантам кукурузы, включающим верхушку побега, обусловлен компетентностью к *Agrobacterium*-опосредованная трансформация клеток апикальной меристемы, из L2 слоя которых способны развиваться генеративные структуры, формирующие гаметы [4, 7]. Перенос Т-ДНК и её интеграция в геном однодольных зависит от многих факторов, включающих генотип, тип экспланта, условия инокуляции, культивирования *in vitro*, селекции, агробактериальный штамм и векторную конструкцию. Цель данной работы состояла в оптимизации условий регенерации *in vitro* от сегментов узелковой зоны побегов и анализ компетентности их клеток к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации ряда элитных инбредных линий кукурузы.

Материалы и методы

В работе использовали зрелые зерновки инбредных линий кукурузы: Л250, Л390, Л1544, Л1552, Л1563, Л1652 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев). Стерилизованные зерновки проращивали в течение 6-8 суток на MS-среде при 27 °С с 16-часовым фотопериодом и освещённостью 3-4 клк. Часть побега – узелковую зону и ткани, расположенные ниже и выше неё (~ 0,5см), делили поперечно на сегменты размером 1-2 мм. Они служили эксплантами при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации штаммом *LBA4404*, содержащим векторную конструкцию pBi2E с двухцепочечным (дц) РНК-супрессором гена пролинедегидрогеназы (PDH) и с геном *nptII*, любезно предоставленную к.б.н. А.В. Кочетовым (Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск). Индукцию побегообразования осуществляли на модифицированной нами питательной среде В5 Гамборга [8], содержащей

8,0 мг/л кинетина, 0,4 мг/л НУК (В5п). Культивирование проводили при условиях, описанных выше. Суспензию клеток агробактерии, выращенную в течение суток в жидкой LB-среде, разводили 5-кратно средой В5, содержащей 2 мМ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, (оптическая плотность при 600 нм = 0,5). Экспланты, инокулированные в течение 1 часа, высаживали на эту же агаризованную среду, не содержащую углеводов, и кокультивировали 2 суток в темноте при 27 °С. Затем пассировали на среде В5п с цефотаксимом конечной концентрации 500 мг/л. Селекцию на устойчивость к канамицину (*Km*, 100 мг/л) проводили после индукции ризогенеза в течение 2-3-х пассажей.

Наличие целевого и селективного гена определяли ПЦР-методом в листьях *Km*-устойчивых растений-регенерантов кукурузы. Применяли следующие праймеры для фрагментов: первого экзона гена *pdh* 5'-AACAA-ACTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC-3' (F) и 5'-GAGAT-GTTGG-TCTAG-ATTTG-GCAGC-3' (R), первого интрона гена *pdh* – 5'-AACAA-CTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC-3' (F) и 5'-ATTAA-GCTTT-CGAAC-SAAAC-AAGT-3' (R); для гена *nptII* – 5'-CCTGA-ATGAA-CTCCA-GGACG-AGGCA-3' (F) и 5'-GCTCT-AGATC-CAGAG-TCCCG-CTCAG-AAG-3' (R). Наличие агробактериальной примеси в регенерантах кукурузы контролировали по гену *virC*, используя праймеры 5'-ATCAT-TTGTA-GCGAC-T-3' (F) и AGCTC-AAACC-TGCTT-C-3' (R) [9]. ПЦР осуществляли в амплификаторе Mastercycler Personal 5332 Eppendorf, используя для PDH-ex1, PDH-int, *nptII* программу: первичная денатурация 94°C 4 мин и 35 циклов: – денатурация 94 °С 30 с, реассоциация 54 °С 30 с, элонгация 72 °С 30-45 с (в зависимости от размера ампликонов), конечная элонгация 72 °С 10 мин; а для *virC* отличия были в условиях реассоциации – 59 °С 30 с. Безматричный негативный контроль – те же условия амплификации без добавления общей ДНК для всех проанализированных образцов показал отсутствие ампликонов. Электрофорез ДНК проводили в 1,2 %-ном агарозном геле в буфере 0,5 x TBE, содержащем 2,5 мкг/мл бромистого этидия, при напряжённости 5 В/см в течение 1 часа. Маркером молекулярных масс был GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas).

Результаты и обсуждение

Регенерация побегов осуществлялась путём прямого органогенеза. Индукция побегообразования происходила на 10-14 день культивирования, в отдельных случаях наблюдалось появление 2-3-х побегов на эксплант, которые могли показывать разную устойчивость к селективной концентрации канамицина. Ризогенез происходил спонтанно на той же самой В5п-среде спустя короткий период времени после регенерации побегов. Укоренённые растения-регенеранты развивались в течение 4-х недель. Следует отметить, что ответной реакцией эксплантов на выбранные условия культивирования была не только преимущественная регенерация побегов, но иногда и прямое прорастание.

Независимо от тестируемых генотипов частота регенерации побегов от инокулированных агробактерией эксплантов варьировала в пределах 15-17 % и достоверно не отличалась. Относительно низкий уровень побегообразования, возможно, является отражением гетерогенности тканей сегментов нодульной области побега, поскольку помимо апикальной меристемы они включали примордии листьев, частично мезокотиль, колеоптиль и начинающие развиваться листья. В частности, ранее нами было показано [10], что, клетки мезокотила кукурузы обладают крайне низкой способностью к органогенезу, несмотря на их компетентность к агробактериальной инфекции.

Одним из факторов, влияющих на индукцию регенерации *in vitro*, является стадия роста и дифференцировки клеток проростков кукурузы, от которых вычленяется эксплант. Это было отмечено нами ранее для побегов этиолированных проростков протестированных нами инбредных линий [11]. Однако, учитывая данные о возможности повышения частоты побегообразования при фотоморфогенезе [7], прорастание зерновок кукурузы осуществляли на свету. Кроме того, поскольку канамицин может негативно влиять на ризогенез, селекцию на устойчивость к антибиотику проводили после формирования корней.

ПЦР-анализ с использованием праймеров к первому экзону и интрону целевого гена показал наличие дцРНК- супрессора гена пролиндегидрогеназы в суммарной ДНК листьев T0-растений инбредных линий Л250, Л1544, Л1552. Вместе с тем, одновременное присутствие фрагментов целевого и селективного генов зафиксировано только в одном случае – у растений-регенерантов Л250 (рис. 1).

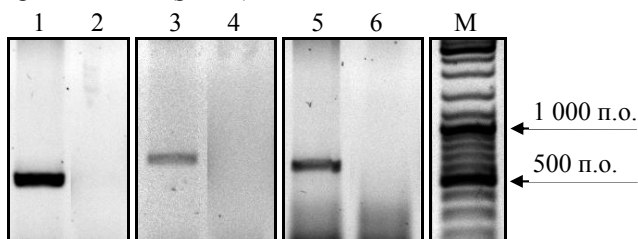


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК листьев регенеранта (№15), полученного от сегментов нодульной зоны побегов инбредной линии кукурузы Л250, с использованием праймеров к генам PDH и *nptII*: 1 – к фрагменту первого экзона гена PDH (545 п.о.), 3 – к фрагменту первого интрона гена PDH (700 п.о.), 5 – к фрагменту гена *nptII* (649 п.о.), 2, 4, 6 – ДНК контрольных (нетрансформированных) растений. М – Маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas.

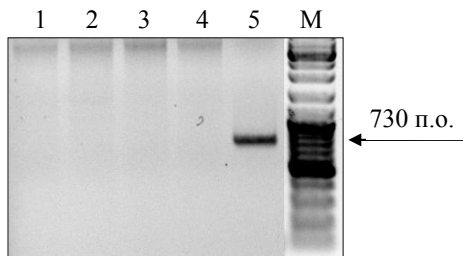


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации фрагмента *virC*-гена в ДНК листьев растений-регенерантов инбредных линий кукурузы (1 – Л250, 2 – Л1544, 3 – Л1552, 4 – негативный контроль (без ДНК), 5 – положительный контроль – ДНК агробактериального штамма *LBA4404*; М – Маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas.

Отметим, что среди проанализированной случайной выборки *Km*-устойчивых растений-регенерантов, которые в течение 2-х пассажей выдерживали селективную концентрацию антибиотика, 2-кратно превышающую его необходимую и достаточную концентрацию, количество Т0-регенерантов составляло 4 (Л250), 3 (Л390), 3 (Л16522), 2 (Л1563), 2 (Л1552), 1 (Л1544). Кроме того, молекулярно-генетический анализ по гену *virC* штамма *LBA4404*, несущего рВи2Е, показал отсутствие агробактериальной примеси во всех проанализированных вариантах (рис. 2). Отметим, что перенос Т-ДНК в клетки и её интеграция в геном кукурузы осуществлялся нами в отсутствие ацетосирингона, однако с использованием высокой концентрации тиосульфата натрия – одного из тиоловых компонентов, который, как установлено Olhofs и соавт [11], способен повышать частоту трансформации клеток. К тому же, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, согласно нашим данным [12], может стимулировать и регенерацию побегов. Тот факт, что в ДНК *Km*-устойчивых растений показано наличие дцРНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы, свидетельствует о компетентности клеток используемого экспланта к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации штаммом *LBA4404*, несущим плазмиду рВи2Е. Относительно низкая частота регистрируемых нами трансформационных событий может быть, отражением того, что не всегда индукция побегообразования через прямой органогенез происходит от единичных клеток. Кроме того, значение могут иметь выбранные нами условия инокуляции, сокультивирования, используемый агробактериальный штамм. Тем не менее, преимуществом предложенного способа регенерации *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации элитных инбредных линий кукурузы является то, что побегообразование происходит путём прямого органогенеза в течение короткого периода времени, что снижает вероятность соматической изменчивости растений-регенеран-

тов. Более того, почти сразу же при культивировании на тех же самых питательных средах может индуцироваться ризогенез.

Выводы

Предложен способ регенерации *in vitro* через прямой органогенез от поперечно расщеплённых сегментов узелковой зоны побега и показана принципиальная возможность переноса дцРНК-супрессора гена пролиндехидрогеназы в клетки этого экспланта для ряда генотипов элитных инбредных линий кукурузы.

Литература

1. *Ishida Y., Hiei Y., Komari T.* Protocol. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize // Nature protocols. – 2007. – 2, № 7. – P. 1614-1621.
2. *Frame B., Main M., Schick R., Wang K.* Genetic transformation using maize immature zygotic embryos / Thorpe T. A., Yeung E. C. (eds) *Plant Embryo Culture. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* (Springer Science-Business Media 2011) – Vol.710. – P. 327-341.
3. *Данилова С. А., Долгих Ю. И.* Условия, необходимые для эффективной агробактериальной трансформации *Agrobacterium tumefaciens* эмбрионного каллуса кукурузы // Физиология растений. – 2005. – т. 25, № 4. – С. 600-608.
4. *Gould J., Devey M., Hasegawa O., Ulian E. C., Peterson G., Smith R. H.* Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex // Plant Physiology. – 1991. – Vol. 95. – P. 426-434.
5. *Sairam R. V., Parani M., Franklin G., et al.* Shoot meristem: an ideal explant for *Zea mays* L. transformation // Genome. – 2003. – 46. – P. 323-329.
6. *Sticklen M. B., Oraby H. F.* Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crops // *In Vitro Cell Dev. Biol. – Plant.* – 2005. – 41. – P. 187-200.
7. *Sidorov V., Gillertson L., Addae P., Duncan D.* *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus // Plant Cell Rep. – 2006. –Vol. 25. – P. 320-328.
8. *Gamborg J. L., Miller R. A., Ojima K.* Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots // *Experim. Cell Res.* – 1968. – № 50. – P. 151-158.
9. *Sawada H. Ieki H., Matsuda I.* PCR Detection of Ti and Ri Plasmids from Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains // *Applied and environmental microbiology.* – 1995. – Vol. 61, № 2 – P. 828-831.
10. *Струнин Д. Е., Сергеева Л. Е. Тищенко Е. Н.* Регенерация растений путём прямого органогенеза из сегментов проростков элитных инбредных линий кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – т. 40, № 2. – С. 164-170.
11. *Olhoft P. M., Lin K., Galbraith J., Neisen N. C., Somers D. A.* The role of thiol components in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells // Plant Cell Rep. – 2001. – 20. – P. 731-737.
12. *Комисаренко А. Г. Михальская С. И., Малина А. Э., Сергеева Л. Е., Тищенко Е. Н.* Оптимизация метода индукции регенерации *in vitro* инбредных линий и гибридов подсолнечника // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41. № 3. – С. 255-261.

Резюме

Предложен способ регенерации *in vitro* путём прямого органогенеза из клеток сегментов узелковой зоны побегов и показана их перспективность для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации инбредных линий кукурузы.

Запропонований спосіб регенерації *in vitro* шляхом прямого органогенезу з клітин сегментів вузлової зони пагонів та виявлено їх перспективність для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації інбредних ліній кукурудзи.

The regeneration induction method through direct organogenesis from cells of segments of nodal section was developed as well as their availability for *Agrobacterium*-mediated transformation of elite corn inbred line is shown.

**¹НІТОВСЬКА І.О., ¹ДУПЛІЙ В.П., ¹РУДАС В.А., ²АБРАЇМОВА О.Є.,
²САТАРОВА Т.М., ¹МОРГУН Б.В.**

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: iranit@ukr.net

²Інститут сільського господарства степової зони НААН України
49600, Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ТРАНСФОРМАЦІЇ КАЛЮСНИХ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ ДЕТЕКЦІЇ ТРАНЗІЄНТНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА БЕТА-ГЛЮКУРОНІДАЗИ

Для отримання трансгенних рослин, зокрема кукурудзи, найбільш розповсюдженими є біолістичний та *Agrobacterium*-опосередкований методи [1,2]. Проте відбір придатних до генетичної трансформації генотипів та оптимізація умов і параметрів трансформації є дуже важливими факторами досягнення успіху у створенні трансгенних рослин культур, які важко трансформуються. Використання детекції ранніх подій трансформації шляхом гістохімічного фарбування тканин на присутність транзійентної експресії гену β-глюкуронідази полегшує цю задачу.

Метою роботи було оптимізувати умови та параметри біолістичної та *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації регенераційно здатного калюсу кукурудзи конкретних генотипів, використовуючи векторні конструкції, які містять ген β-глюкуронідази.

Матеріали та методи

Матеріалом досліджень була кукурудза інбредної лінії А-188, ліній вітчизняної селекції ДК675, ДК267 та польської селекції PLS61, а також гібриди F1 Chi-31♀×ДК675♂, PLS61♀×UH004♂. В дослідженні використовували регенераційно активний калюс отриманий із незрілих зародків.

Для введення матеріалу в асептичні умови качани стерилізували у 70% етанолі протягом 1 хв. і 50% розчині комерційного відбілювача Domestos протягом 40 хв. з використанням вакуумної інфільтрації та відмивали стерильною дистильованою водою. Незрілі зародки розміром 0,5-2 мм викладали на модифіковане середовище N6m для калюсогенезу, яке місти-

ло 30 г/л сахарози, 100 мг/л інозиту, 700 мг/л проліну, 0,5 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л дикамба, 0,1 мг/л абсцизової кислоти, 8 г/л агару та решта складових середовища N6 [3].

В експериментах з біолістичної трансформації використовували саморобну гармату типу particle inflow gun (PIG) та гармату Biolistic PDF-1000/He.unit (Bio-Rad). Носіями ДНК були частинки золота діаметром 0,6 мкм (Bio-Rad) або вольфраму діаметром 1 мкм (M-17, Bio-Rad). Для трансформації біолістичним методом використовували вектор рАНС25 [4], який містить ген β -глюкуронідази *uidA* та ген фосфінотрицинацетилтрансферази *bar*, обидва під контролем промотору убікітину кукурудзи. За 4 години до початку експерименту калюс викладали у вигляді кола діаметром приблизно 3 см на чашки Петрі з модифікованим середовищем N6m, яке містило 0,3М манітол, щоб запобігти осмотичному шоку клітини під час пошкодження їх мікрочастинками. В кожній чашці було від 20 до 30 калюсів в залежності від розміру. Приготування частинок та нанесення на них ДНК робили за методикою [5]. Через добу після обстрілу калюс переносили на середовище N6m без манітолу. Гістохімічний аналіз експресії β -глюкуронідази в калюсах проводили за методикою [6] через 4 доби після обстрілу, а решта калюсів переносили на селективне середовище N6m з додаванням 5 мг/л фосфінотрицину. Калюс культивували в темряві при 27°C.

Агробактеріальну генетичну трансформацію проводили шляхом ко-культивування калюсу кукурудзи з *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV2260 або GV3101, яка містила вектор p35S GUS INT[7]. Т-ДНК вектора має селективний ген неоміцин-фосфотрансферази II *nptII* під контролем промотору гену нопалінсинтази та репортерний ген *uidA* з інтроном під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти. Нічну культуру агробактерії осаджували і розводили в десять разів у рідкому середовищі LS-inf [2], в яке додавали 200 мкМ ацетосерінгону. Отриману агробактеріальну суспензію нарощували на качалці в темряві при 28°C протягом 2–4 годин. Калюс занурювали в агробактеріальну суспензію на 15–30 хв та проводили вакуумну інфільтрацію бактерії. Потім підсушували на фільтрувальному папері та переносили на середовище N6. Ко-культивування калюсів з агробактерією проводили в темряві при 24°C протягом двох або п'яти діб. Через 2–5 діб калюси фарбували на наявність транзійтної експресії гену β -глюкуронідази, а решта переносили на середовище N6, яке містило 500 мг/л цефотаксиму для пригнічення росту агробактерії та 50 мг/л канаміцину для селекції трансформованих калюсів. Вивчали вплив на агробактеріальну трансформацію таких параметрів як штам агробактерії, генотип, час культивування з агробактерією, підсушування агробактерії на експланті, кліностакування та обстріл калюсу мікрочастками вольфраму перед трансформацією. Щоб підсушити агробактерію, калюси переносили на поживне середовище для ко-культивування з підвищеним вмістом агару (1,5%), при цьому чашки не замотували плівкою. Для дослідження впли-

ву мікропоранень на ефективність трансформації, частину калюсів перед трансформацією обстрілювали мікрочастками вольфраму. Вивчення впливу мікрогравітації проводили, використовуючи рівномірне обертання калюсів по горизонтальній осі на кліностаті зі швидкістю 2 об/хв протягом двох діб перед трансформацією.

Результати досліджень

Оцінку параметрів біолистичної трансформації проводили на білому рихлому калюсі І типу (рис.1) лінії А-188, що утворювався після 10–20 діб культивування незрілих зародків на середовищі N6m і є найкращим для трансформації завдяки високій регенераційній здатності [6].



Рис. 1. Утворення на середовищі N6m калюсу І типу із незрілих зародків кукурудзи лінії А-188.

Порівняння ефективності різного типу гармат проводили за умов рівності інших параметрів, тобто на рослинному матеріалі, отриманому з одного качана, використовуючи частинки золота або вольфраму з нанесеною ДНК однієї партії приготування. Гістохімічне дослідження транзйентної експресії гену *uidA* показало, що більш ефективним для трансформації є використання гармати фірми Bio-Rad, ніж саморобної PIG гармати та часток золота в якості носіїв ДНК порівняно з вольфрамом (рис.2).

Тестування параметрів гармати Bio-Rad на однаковому рослинному матеріалі показало, що при використанні тиску 900 psi транзйентна експресія дещо більша, ніж при використанні 1100 psi. Також було підтверджено, що використання часток золота як носіїв ДНК краще, ніж часток вольфраму(рис.2).

Наступним кроком було дослідити оптимальні умови трансформації кукурудзи шляхом ко-культивування калюсу з агробактерією штаму GV2260 або GV3101, яка має плазмиду p35S GUS INT[10]. Присутність інтрону в репорторному гені *uidA* забезпечує синтез активної β -глюкуронідази лише в рослинних клітинах, що дозволяє оцінити транзйентну експресію гена вже через 2–4 доби після культивування з агробактерією. В експериментах використовували регенераційно активний калюс кукурудзи тривалого культивування (3-15 місяців), отриманий від незрілих зародків інбредних ліній

ДК675, ДК267 та PLS61, а також гібридів F1 Chi-31♀×ДК675♂, PLS61♀×УН004♂. Показано, що найбільш впливовими факторами на ефективність транзйентної експресії гену β-глюкуронідази є генотип, штам агробактерії, підсушування агробактерії на експланті та час культивування з агробактерією. Так, наприклад, серед досліджуваних генотипів зовсім не спостерігали транзйентної експресії β-глюкуронідази в калюсах гомозиготної лінії ДК675 та гібриду Chi-31♀ x ДК675♂, а найкращу транзйентну експресію відмічали для ліній ДК267 та PLS61 (рис 3). Показано збільшення ефективності трансформації при використанні штаму агробактерії GV3101 порівняно з GV2260 для генотипів ДК267, PLS61 та PLS61♀×УН004♂. Підсушування агробактерії на експланті виявилось за результатами гістохімічного фарбування більш ефективним порівняно з культивуванням на звичайному середовищі в закритих плівкою чашках Петрі. За нашими даними кокультивування калюсу з агробактерією протягом двох діб є більш ефективним, ніж п'ятиденне культивування. Також ефективність транзйентної експресії

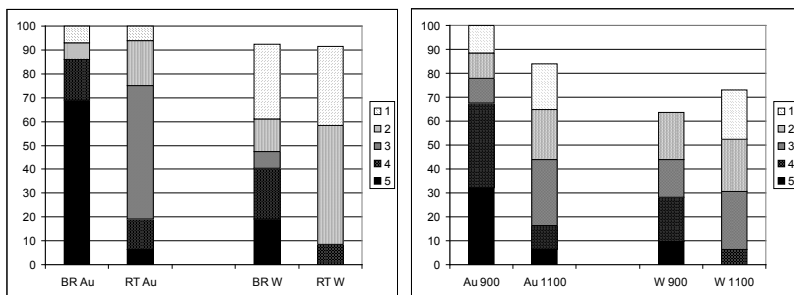


Рис. 2. Оцінка транзйентної експресії гену *uidA* в калюсі кукурудзи в залежності від використаної гармати (зверху) (BR – Bio-Rad, RT – саморобна Рудас-Табак), часток (Au – золото, W – вольфрам) та тиску (900 або 1100 psi) В легенді представлені бали згідно експертної оцінки.

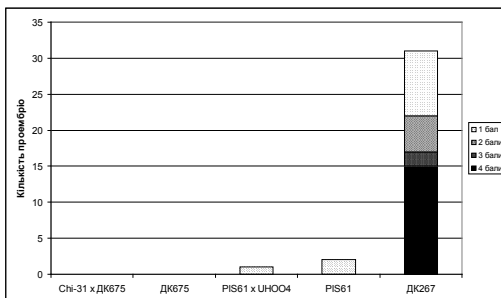


Рис. 3. Оцінка транзйентної експресії гену *uidA* в калюсі кукурудзи різних генотипів після генетичної трансформації з *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV2260, яка містила вектор p35S GUS INT.

пресії β-глюкуронідази дещо підвищується, якщо перед трансформацією застосовувати обстрілювання мікрочастками вольфраму або кліностагування калюсів, тоді як поєднання цих двох факторів призводить до зменшення транзйентної експресії порівняно з калюсами, які нічим не оброблялись.

Висновки

Дослідження транзйентної експресії гена *uidA* після біолістичної генетичної трансформації кукурудзи інбредної лінії А-188 показало, що більш ефективним є використання гармати фірми Bio-Rad the biolistic PDF-1000/He.unit, часток золота як носіїв ДНК та тиску 900 psi під час трансформації.

Вивчення транзйентної експресії гена β-глюкуронідази після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації калюсу кукурудзи показало, що найбільш впливовими факторами на ефективність трансформації є генотип, штам агробактерії, підсушування агробактерії на експланті та час культивування з агробактерією. Також спостерігається незначне підвищення транзйентної експресії β-глюкуронідази, якщо перед трансформацією застосовувати мікропоранення експлантів через обстрілювання мікрочастками вольфраму або кліностагування калюсів. Векторна конструкція з інтроном в репорторному гені *uidA* дозволила відбирати генотипи придатні для агробактеріальної трансформації.

Використання векторних конструкцій, які містять ген β-глюкуронідази полегшує оптимізацію умов та параметрів генетичної трансформації кукурудзи.

Література

1. *Koziel MG, Beland GL, Bowman C et al.* Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*// Bio/Technology. – 1993. – Vol. 11. – P. 194-200.
2. *Ishida Y, Hiei Y, Komari T* *Agrobacterium*-mediated transformation of maize//Nature Protocols. – 2007. – Vol. 2. – P. 1614-1621
3. *Pescitelli SM and Sukhapinda K* Stable transformation via electroporation into maize Type II callus and regeneration of fertile transgenic plants//Plant Cell Rep. – 1995. - Vol. 14. – P. - 712-716.
4. *Christensen A.H. and Quail P.H.* Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants// Transgenic Research. – 1996. – Vol. 5. – P. 213-218.
5. *Василенко М.Ю., Кучук М.М., Овчаренко О.О., Кучук М.В.* Отримання транспластомних рослин *Nicotiana bethamiana* із генами мікобактерії (*Mycobacterium tuberculosis*)//Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2010. – Vol. 9. – P. 224-229.
6. *Jefferson R.A.* Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system// Plant Mol. Biol. Rep. – 1987. – Vol. 5. – P. 387-405.
7. *Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., and Rocha-Sosa M.* Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation//Mol.Gen.Genet. – 1990. – Vol. 220. – P. 245-250.

Резюме

Завдяки використанню векторних конструкцій, які містять репортерний ген β -глюкуронідази, були оптимізовані умови і параметри біолистичної та *Agrobacterium*-опосередкованої генетичної трансформації ембріогенного каллосу кукурудзи конкретних генотипів через детекцію ранніх подій трансформації шляхом гістохімічного аналізу тканин на присутність транзйентної експресії гену.

Благодаря использованию векторных конструкций, которые содержат ген β -глюкуронидазы, были оптимизированы условия и параметры биолистической и *Agrobacterium*-опосредованной генетической трансформации эмбриогенного каллуса кукурузы конкретных генотипов, через детекцию ранних событий трансформации путем гистохимического анализа ткани на присутствие транзйентной экспрессии гена.

Due to using vectors containing β -glucuronidase reporter gene, the condition and the parameters of the biolistic and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of the corn embriogenic callus have been optimized for contain genotype via detection of the gene transient expression by the tissue hystochemical analysis.

ПАВЛОВА М. П.

РАИСА ГЕОРГИЕВНА БУТЕНКО – УЧЕНЫЙ, ПЕДАГОГ И ДРУГ

Это было недавно. Это было давно... В своих воспоминаниях о Раисе Георгиевне Бутенко я хочу коснуться моих и только моих впечатлений о педагоге, большом ученом и друге, оставившим светлые и теплые чувства благодарности до сегодняшнего дня. Наше знакомство произошло в Киеве. В 1964 году Раиса Георгиевна посетила Институт ботаники им. Н.Г. Холодного Украинской Академии наук, и сотрудник отдела цитологии П.Г. Сидоренко пригласил ее на встречу с нашим молодым и немногочисленным коллективом. Раиса Георгиевна с таким воодушевлением и увлеченностью рассказывала о новом в то время направлении биологической науки – культуре тканей, органов и Клеток растений, что невозможно было не “заболеть” и не увлечься этим новым и очень перспективным направлением исследований. Тем более, что мой небольшой практический багаж был связан с микробиологией – работа со штаммами дрожжей тоже требовала умения приготовления питательных сред, посевов и пересевов дрожжей в условиях стерильности и т. п. В Институте ботаники в то время еще не была создана экспериментальная база для работы с культурой тканей растений и когда я поступила в аспирантуру, Раиса Георгиевна согласилась стать моим научным руководителем и предоставила возможность выполнения работы на базе своего отдела в ИФР АН СССР. Таким образом, Раиса Георгиевна открыла для меня врата в науку, которой я посвятила всю свою сознательную жизнь, став одним из первых ее учеников. А учиться у нее было чему. И прежде всего - умению заботиться о нас, приехавших из других городов в Москву. Она написала мне: ”Я узнала у нас в институте, что мож-

но сделать для устройства Вас в общежитие. Это трудно, но, говорят, возможно. Для этого нужна Ваша энергия и упорство, т.к. надо ходить и просить"... Так с ее помощью я оказалась в общежитии на Малой Бронной. И начался увлекательный процесс обучения, приобретения навыков работы с культурами и интенсивных самостоятельных исследований *in vitro* каллусных и суспензионных культур моркови, а позже и других видов растений.

Направление выращивания изолированных клеток растений начало развиваться только с 1958 года и нерешенных вопросов, связанных с культурой клеток, было еще очень много. Передо мной Раиса Георгиевна поставила цель – получить одноклеточные клоны культуры ткани табака и дать им морфофизиологическую характеристику.

Наблюдения показали, что отфильтрованные из суспензии одиночные клетки, высеянные затем на агаровые питательные среды, оставались живыми в течение двух-трех недель и дольше, но не делились. В то время как в кластерах, состоящих из 10 и более клеток, отмечался незначительный рост. И тогда Раиса Георгиевна предложила мне провести серию экспериментов по стимуляции индукции деления единичных клеток табака в культуре *in vitro*.

В серии экспериментов было установлено, что если отдельные клетки отделить от групп клеток стеклянными пластинками, целлофаном или мембранными фильтрами, то деления в этих клетках не происходит. Эти опыты позволили выдвинуть предположение, что от длительности культивирования суспензионных и каллусных культур зависит важный фактор – обогащение питательных сред продуктами метаболизма делящихся и растущих клеток. Поэтому отфильтрованную, так называемую кондиционированную питательную среду в дальнейшем использовали для изучения поведения отдельных клеток в жидких и агаризованных питательных средах. Для индукции единичных клеток к делению эффективным оказалось также использование метода культуры ткани «няньки». Для этого небольшие кусочки каллусной ткани размещали на расстоянии 5мм от единичных клеток, а метаболиты «няньки» индуцировали деление.

В те годы в нашем распоряжении еще не было микроманипуляторов, поэтому выделение единичных клеток проводилось довольно примитивно: на стерильную трубочку надевали стеклянный наконечник с тонким носиком. Эти трубочки мы изготавливали сами – над пламенем спиртовки их разогревали, а затем растягивали жидкое стекло до образования микротрубочек. Затем стерильную трубочку с наконечником нужно было взять в рот и мягкими движениями губ отловить отдельные клетки и высадить их в чашки Петри на агаризованные кондиционированные питательные среды. Наблюдения за клетками проводили под микроскопом и фотографировали для документации поведения единичных клеток. Клетки начинали делиться, образуя микроколонии. Позже мне удалось снять фильм и показать все фазы митотического деления изолированных клеток табака *in vitro*.

Каждый сотрудник отдела вел свое направление исследований. Молодые и амбициозные, все мы хотели получить интересные результаты, а Раиса Георгиевна наблюдала за нами, часто беседовала с каждым, обсуждала полученные результаты, проводила семинары. Нам всем было очень интересно. Она никогда не повышала голос и только однажды я увидела, ее гневающуюся Группа ученых из зарубежья должна была посетить наш отдел и Раиса Георгиевна попросила всех привести в полный порядок большую рабочую комнату, в которой обычно работало несколько человек. Это нужно было сделать быстро, т.к. гости уже были на пороге... Через несколько минут Раиса Георгиевна возвратилась и не увидела изменений... Ее щеки пылали, она поднималась на носки и опускалась и тихо произнесла...”Ребята, ведь я же вас просила...”. Было стыдно. В один миг все было готово к приему гостей и встреча прошла отлично. Этот случай послужил для нас всех уроком на будущее. Время учебы в Москве запомнилось мне как праздник, который всегда со мной... Я вспоминаю, как в маленьком кабинете Раисы Георгиевны выделили рабочее место для меня и Саши Воллосовича (ныне покойного). Мы сидели буквально «на голове» у Раисы Георгиевны. Было тесно, но работать было очень интересно. В воскресные дни мы часто встречались с Сашей в культуральной комнате, где инспектировали нашу предыдущую работу – как идет рост культур, нет ли инфекции и т.д. Саша на высокой лестнице просматривал свои колбы, а я внизу – чашки Петри с высеянными клетками. Это были музыкальные встречи – Саша пел, никого и ничего не замечая, кроме своих колб, а я тоже напевала «для себя». Как-то, просматривая рукопись моей статьи, Раиса Георгиевна спросила: “А вы читаете по-французски?” И я ответила ей, что с переводом мне помогла Наталья Дмитриева. Такая взаимопомощь в отделе была нормой. Если у тебя не было каких-либо реактивов, с тобой всегда делились. Хорошие были времена...

Вспоминаю, как однажды в теплый летний день администрация института организовала бесплатную поездку за город. Группа сотрудников Института, и мы в том числе, оказались в Подмосковном лесу, где были озеро. Это было прекрасным местом отдыха и более близкого знакомства друг с другом. Спустя годы знакомства переросли в дружеские отношения. До сегодняшнего дня с Ларисой Ивановной Слепян, Ниной Федоровной Писецкой, Майей Саркисовой эти отношения живы. К Раисе Георгиевне приезжали на стажировку и консультации из многих городов страны, а также из Чехословакии, Болгарии и т.д. Колоритная болгарка Недялка Загорска часто приезжала в Москву, а иногда в Киев и была гостем в моем доме. С коллегами из Чехословакии – Ярмилой Свободовой, Зденеком Опатрны и Франтишком Новак – сотрудниками Института экспериментальной ботаники ЧСАН, мы встречались иногда за чаем в гостепреимной семье Раисы Георгиевны и Юрия Павловича. Хочу отметить еще одну характерную особенность Раисы Георгиевны. Ее муж – Юрий Павлович - был родом с Укра-

ины, а украинцы, как известно, очень любят борщ. И Раиса Георгиевна готовила вкусные украинские блюда и, конечно же, борщи. Однажды Раиса Георгиевна пригласила к себе домой нескольких коллег из зарубежья, меня и Наталью Дмитриеву на ужин. Мы вместе ездили за продуктами, купили дичь и всякие вкусности и я с удивлением, наблюдала, как Раиса Георгиевна ловко расправилась с дичью, которую потом запекла в духовке. Было домашнему вкусно и уютно. Общение продолжалось допоздна...

Я благодарна Раисе Георгиевне за то, что уже после защиты диссертации она продолжала опекать и подбадривать наш молодой киевский коллектив и была добрым советчиком в выборе направлений дальнейших исследований. Она не теряла связи с нами – звонки и письма были нормой наших отношений. В одном из поздравлений она с юмором писала: “Дорогие собратья по оружию, киевские культуральщики клеток и тканей, группа культуры тканей ИФРа поздравляет Вас с новым годом и желает новых успехов на поприще истязания бедной, изолированной, т.е. оторванной от материнской груди маленькой растительной клетки. Желаем успехов”. В 1974 году Раиса Георгиевна сделала для меня незабываемый подарок – из научной командировки в Англию она привезла на мое имя приглашение профессора Ноттингемского Университета Е.С. Кокинга: “Мы рады пригласить Маргариту К. Павлову поработать в департаменте Ботаники в течение двух месяцев. Я полагаю, что она сначала поедет в лабораторию профессора Стрита в Лейчестере на четыре месяца, а затем приедет к нам на два месяца”. Профессор Е. Кокинг впервые разработал метод получения изолированных протопластов из тканей корня и плодов томатов и освоение этого метода было перспективным для изучения особенностей получения протопластов из других видов растений и условий их культивирования *in vitro*. Более того, изолированные протопласты явились перспективной моделью для изучения новых возможностей – слияния протопластов, “пересадка” клеточных органелл и проведение целого ряда генетических исследований. Это было сказочное предложение с драматическим концом. Необходимые документы были собраны и сданы в отдел связи с зарубежными странами АН Украины, но, как выяснилось позже, были утеряны, а время было упущено... Спустился год я познакомилась с проф. Н. Стритом на XII Ботаническом конгрессе в Ленинграде и он подарил мне свою монографию, которая стала для нас всех настольной книгой.

Как я уже упоминала выше, полученные ранее каллусные и суспензионные культуры клеток сахарной свеклы были использованы нами как модель для изучения контроля репродукции клеток *in vitro*. Применение методов математического планирования экспериментов, разработанные проф. МГУ В.Максимовым, лекции которого мы посещали вместе с Раисой Георгиевной, оказались эффективными при работе с культурами тканей и клеток разных видов растений.

Заканчивая свои воспоминания о Раисе Георгиевне, хочу сказать, что я благодарна судьбе за то, что в моей жизни была Раиса Георгиевна – большой ученый, руководитель и просто друг. Она была прекрасным организатором – мы ей благодарны за семь всесоюзных и международных конференций, на которых подводились итоги и демонстрировались научные успехи отечественных и зарубежных исследователей. Ее ученики достойно представляли достижения в области биологии культивируемых органов, тканей и клеток растений *in vitro*. Несмотря на большую занятость, она всегда находила время для общения с каждым из ее учеников. В своей последней весточке Раиса Георгиевна писала...”Я всегда любила тебя, сейчас много работаю над книгой. Надеюсь, мы встретимся, если ты не уедешь к японцам. Твоя Раиса Бутенко”. Светлая память о Раисе Георгиевне навсегда сохранится в моей душе.

М.К. Павлова, Киев, Украина.
ritaslava@ukr.net

ПОЛЯКОВА Л.В., ЖУРОВА П.Т.

*Украинский НИИ лесного хозяйства и агролесомелиорации им.В.В.Высоцкого
Украина, 61024, Харьков, ул Пушкинская 86, e-mail: polyakova_lv@mail.ru*

ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОЛОВ НА РАЗВИТИЕ И УКОРЕНЕНИЕ ЭКСПЛАНТОВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Вследствие низкой морфогенетической активности эксплантов от взрослых деревьев дуба в условиях *in vitro*, многие исследователи обращаются к микроразмножению ювенильного материала – семянцев, либо зародышевого материала [2,5]. Однако практически никогда не отслеживаются биохимические особенности материала, используемого для микроклонирования, хотя имеются работы о влиянии флавонолов на транспорт ауксинов в растениях [3,4]. В последнее время появились исследования, связанные с изучением влияния отдельных групп вторичных веществ на развитие и укоренение эксплантов в условиях *in vitro*. Например, для эксплантов ореха грецкого, полученных соматическим эмбриогенезом и генетически трансформированных на линии с нарушенным синтезом флавонолов, было показано, что на укоренение значительное влияние оказывает их уровень в листьях и стеблях [3]. Аналогичные данные показаны для мутантов культуры *Arabidopsis* [4].

В течение ряда лет нами анализировались группы семянцев, используемых для микроклонирования по признаку степень гликозилирования флавонолов (соотношение гликозидов и агликонов) в листьях [1], причем этот показатель оказался информативным не только в общей оценке ростовой активности, но и устойчивости к мучнистой росе. Однако влияние отде-

льных групп веществ – гликозидов и агликонов - на ростовую активность при этом не выявлялось.

Материалы и методы

Для микроклонирования использовали индивидуальные сеянцы с определением в листьях содержания первичных веществ – белка и вторичных – гликозидов флавонолов (ФЛ), агликона кверцетина (Кв) и гидролизуемых танинов (ГТ) [1]. Исходным материалом служили сеянцы полусибсового потомства 600-летнего дерева дуба черешчатого – ПС-600.

Результаты и обсуждение

Влияние основных групп первичных и вторичных веществ на ростовую активность было рассмотрено на 42-х 6-месячных сеянцах ПС-600 (таблица 1).

Таблица 1

Биохимическая характеристика сеянцев дуба по приросту за 4 месяца

Группа особей	прирост	Б	ФЛ	ГТ
Уст.гр – 5 ос.	5 – 10 см	9.26±0.67	0.64±0.08	1.54±0.25
Уст.гр. -9 ос.	0 – 4 см	8.81±0.32	0.78±0.14	1.82±0.19
Воспр.гр – 8 ос	5 – 10 см	10.47±0.48*	0.77±0.22	1.47±0.14*
Воспр.гр -20 ос.	0 – 4 см	9.34±0.27*	0.58±0.08	1.87±0.15*

*P<0.05; уст.–особи, устойчивые к мучнистой росе; воспр.– восприимчивые к инфекции.

Материалы т.1 показывают, что по содержанию гликозидов флавонолов достоверного различия между группами растений разной ростовой активности или разной степени устойчивости к инфекции мучнистой росы не обнаруживается. Влияние на ростовую активность оказалось заметным для содержания в листьях восприимчивых к инфекции сеянцев белка и гидролизуемых танинов. Однако выборка сеянцев по признаку минимального уровня Кв в листьях выявила существенное влияние на ростовую активность (средний прирост за 4 месяца) этого показателя (табл.2)

Таблица 2

Влияние содержания кверцетина в листьях на прирост сеянцев

Группа особей	прирост	Б	Кв
Кв<0.1%-15 ос.	3.81±0.72*	9.23±0.36	0.088±0.009**
Кв>0.3% - 27ос.	2.2±0.52*	9.46±0.25	0.25±0.015**

Как показывают данные т.2, в отличие от ФЛ, растения с низким уровнем Кв в листьях характеризовались на 73% более высокой ростовой активностью при практически равном содержании Б. Понимание различия действия этих близких по химической структуре веществ – гликозидов и агликонов (гликозиды ФЛ в листьях дуба преимущественно представлены кверцетин-3-рамнозидом, а доминирующий агликон – кверцетин) стало возможным на основе работы, выполненной с мутантной по редуцирован-

ной активности фермента флавонол-синтаза культурой ореха грецкого [3], а также с аналогичным мутантом культуры *Arabidopsis* [4]. Было установлено, что гликозиды ФЛ практически не оказывают ингибирующего влияния на транспорт ИУК в стеблях и листьях. Однако, эта группа веществ активно ингибировала транспорт НУК в клетках корня и на 25-30% повышала активность образования корней в трансформированных линиях ореха грецкого..

В нашем случае мы действительно не отметили влияния уровня синтеза гликозидов ФЛ в исходных сеянцах на развитие надземной части (табл.1), но достаточно отчетливо проявилось влияние на этот признак уровня содержания доминирующего агликона листьев дуба – Кв (табл.2). В дальнейшем подтверждение негативного влияния Кв на транспорт ауксинов было отмечено на образцах эксплантов, полученных от сеянцев с разным исходным уровнем Кв в листьях (табл.3, рис.1).

Таблица 3

Биохимическая характеристика 4-месячных сеянцев ПС-600 (№ 15 и № 16), использованных для микроклонирования.

сеянцы	Б%	ФЛ%	Кв%	ГТ%	Высота, см
№15 (6 эксплантов)	9.6	0.72	0.29	1.90	1.5±0.08
№ 16 (9 эксплантов)	9.5	0.60	0.14	2.10	3.0±0.12

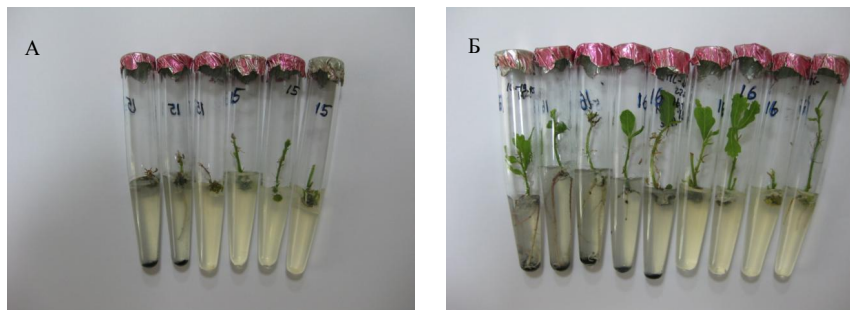


Рис. 1. Развитие эксплантов (возраст *in vitro* 1 месяц) дуба черешчатого, полученных из 4-месячных сеянцев дуба черешчатого (ПС-600): А – сеянец № 15, содержание кверцетина – 0.29%; Б – сеянец № 16, содержание кверцетина – 0.14%

Материалы (табл.3) показывают, что высота 1-месячных эксплантов от сеянца с повышенным уровнем Кв (№ 15) была практически в два раза ниже, чем от сеянца с низким уровнем этого компонента (№ 16). Содержание Б и гликозидов ФЛ было практически одинаковым. Рис.1 дополнительно показывает, что облиственность побегов эксплантов с низким уровнем Кв также была значительно выше.

Для оценки развития корневой системы использовали экспланты, перенесенные в почву и развивающиеся в условиях *in vivo* на протяжении 5-и месяцев (рис.2).



Рис.2. Развитие корневой системы у эксплантов (в грунте 5 месяцев), полученных из 4-месячных семян, в листьях которых определено следующее содержание гликозидов флавонолов: А - № 9 – 0.24%; Б - №14 – 1.10%; В - № 6 – 0.9%

Рис.2 показывает, что уровень содержания ФЛ в листьях исходного микроклонированного материала может оказывать реальное влияние на характер развития корневой системы. Несмотря на малую выборку, активность роста корней оказалась в точном соответствии с литературными данными о влиянии гликозидов ФЛ на транспорт НУК в корнях соматоклональных линий ореха грецкого с редуцированным и нормальным уровнем этих веществ в листьях [3]. В нашем случае, действительно, уровень ФЛ в листьях исходных семян № 14 и № 6 был в 4 и 5 раз выше, чем в семенах № 9 (1.1% - 0.9% и 0.24% соответственно), а развитие корневой системы оказалось намного более активным в семенах с низким уровнем ФЛ (№ 9).

Литературные данные позволяют рассмотреть состояние семян, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* в параметрах активности синтеза разных групп флавоноидов. Оказалось, что редуцированный синтез кверцитрина (кверцетин-3-рамнозид) в листьях и стеблях ореха грецкого [3], культуры *Arabidopsis* [4], в листьях дуба черешчатого (рис.2) усиливает активность корнеобразования, так как при этом снижается ингибирующее влияние данного компонента на транспорт НУК в тканях корня. Ингибирование транспорта ауксинов в случае повышенного уровня ФЛ связывают с их локализацией в вакуолях, передвижением к мембранам и клеточным стенкам с образованием специфических комплексов с полисахаридами, протеинами или другими компонентами [4]. Этот процесс может вызывать изменение свойств мембран, лимитируя экспрессию ауксиновых генов, а также влияя на транспорт сахаров, необходимых для образования корней [3].

Ингибирующее влияние на ростовую активность надземной части семян и эксплантов оказалось более заметно выраженным для агликоновых структур флавонолов – в листьях дуба – это кверцетин. Редуцированный синтез этого компонента, вероятно, снимает ингибирование транспорта ауксинов гликозилированными формами флавонолов [3], что проявляется в повышенной ростовой активности эксплантов (рис.1). Однако сохране-

ние слишком низкого уровня Кв, синтезируемого в хлоропластах, может снизить способность растения выдерживать стрессовые внешние нагрузки, приводящие к появлению в клетках оксидных радикалов, вследствие значительной антиоксидантной активности кверцетина и его способности активнее других молекул флавонолов scavенгировать H₂O₂ и O₂- [6].

Заключение

Совпадение литературных и полученных нами данных может позволить получать с помощью микроклонирования ювенильного материала (сеянцы до 1 года) генотипы с заданными биохимическими и морфологическими качествами. Вероятно, благоприятным сочетанием является несколько сниженный уровень Кв в исходном материале (для повышенной ростовой активности) и достаточно низкий уровень ФЛ, что может обеспечить более активное развитие корневой системы на этапе перевода эксплантов из условий *in vitro* в условия *in vivo*. Однако необходимо учитывать физиологическую (прежде всего антиоксидантную) активность флавонолов, избегать микроклонирования материала с редуцированным синтезом этих веществ в размножаемых образцах.

Литература

1. Полякова Л.В., Губин Е.А. Биохимическая характеристика сеянцев дуба черешчатого, используемых для размножения *in vitro* // Матеріали міжн.конф. "Фактори експериментальної еволюції", Київ, Логос, 2008. Збірн.наукових праць.– Т.5.– С. 314-317.
2. Chalupa V. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation // *Biolgia Plantarum.*–1993.– V.10.–P.414-421.
3. El Euch C., Jay-Allemand C., Pastuglia M., Dumas P., Charpentier J.P., Capelli P., Jouanin L. Expression of antisense chalcone synthase RNA in transgenic hybrid walnut microcuttings. Effect on flavonoid content and rooting ability // *Plant Molecular Biology.*–1998.–V.38.–P.467-479.
4. Khun B.M., Geisler M., Bigler L., Ringli Ch. Flavonols Accumulate Asymmetrically and Affect Auxin Transport an Arabidopsis // *Plant Physiol.*–2011.–V.156.–P.585-595.
5. Pijut P., Lawson Sh., Michler Ch. Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, Health, and productivity // *Plant.*–2011.–V.47.–P.123-147.
6. Takahama U. Hydrogen Peroxide-Dependent Oxidation of Flavonols by Intact Spinach Chloroplasts // *Plant Physiol.*– 1984.– V.74.– P.852-855.

Резюме

Регуляторная роль флавонолов на развитие сеянцев дуба черешчатого, используемых для микроклонирования, оказалась различной для гликозилированной формы веществ и агликонов. Если уровень содержания агликонов оказывал заметное действие на высоту и пророст сеянцев, то гликозиды флавонолов влияли на развитие корневой системы

Регуляторний вплив флавонолів на розвиток сіянців дуба звичайного, які використовували для мікроклонального розмноження, виявився різним для гликозидів і

агликонів. Якщо рівень вмісту агликонів виявив помітний вплив на ростову активність і приріст сіянців, то глюкозиди флавонолів впливали на розвиток кореневої системи.

Different influence on the development of oak seedlings and microclonal explants was noticed. Low level of flavonol aglicons predominantly affect on increased growth activity of stem and leaves. Low flavonol glycosides influenced root developing in condition in vivo.

СЕРГЕЕВА Л.Е., БРОННИКОВА Л.И., ДЫКУН М.О., СИРАНТ Л.В.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: Zlenko_lora@ukr.net

КОМБИНИРОВАННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ СОИ, ОТОБРАННЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ С КАТИОНАМИ БАРИЯ

Проблема устойчивости растений к осмотическим стрессам (засоление, засуха) остаётся одной из наиболее сложных как с теоретической, так и с практической стороны, несмотря на значительные усилия и определённые достигнутые результаты. Потребность в формах растений, способных переживать в неблагоприятных/экстремальных условиях, становится всё более острой. Это объясняется тем, что абиотические стрессы ужесточаются добавлением антропогенных поллютантов. Возникает вопрос о комплексной устойчивости.

Среди научных методов, используемых для решения проблемы стресса/устойчивости, в последние годы ведущее место начинает занимать биотехнология. С нашей точки зрения одним из наиболее адекватных способов исследования фундаментальных процессов, с одной стороны, и получения растительных форм с новыми (даже исключительными) характеристиками, с другой, является клеточная селекция. При этом клеточная селекция как метод, экологически безопасна, поскольку замкнутая система *in vitro* исключает вредные воздействия на окружающую среду. В то же время, как любой научный подход, клеточная селекция требует постоянного совершенствования.

Нами была предложена идея и опробован метод клеточной селекции для получения растительных форм, устойчивых к осмотическим стрессам, с использованием ионов тяжёлых металлов (ИТМ). Для этого была создана селективная система с ионами Ba^{2+} в концентрации, летальной для культур дикого типа [1]. В таких условиях были отобраны клеточные линии сои, частота появления которых не превышала 10^{-6} . Такое событие, как было показано ранее, свидетельствует в пользу выделения генетически изменённых вариантов [3].

Клеточные линии сои, устойчивые к катионам бария, тестировали в условиях засоления; оценивали относительный прирост биомассы и содержание белка в каллусе.

Материалы и методы

Ba^{2+} -устойчивые клеточные линии сои сорта Васильковская, которые нормально пролиферировали в течение нескольких пассажей (не менее четырёх) на селективной среде, перемещали в нормальные условия. После пассажа (30 дней) на контрольной среде B_5 Гамборга с модификациями [5] клеточные варианты переносили на селективные среды, содержащие соли морской воды или сульфат натрия в концентрациях, летальных для клеточных культур сои дикого типа. (Соли морской воды и Na_2SO_4 использовали для моделирования соответственно сульфатно-хлоридного и сульфатного засолений).

Устойчивость клеточных линий оценивали, измеряя относительный прирост биомассы каллуса (Δm) – стандартный показатель стабильного роста, используемый в клеточной селекции. (Δm) = $(m_k - m_n) / m_n$; где m_n и m_k – массы каллуса в начале и в конце пассажа, соответственно.

В клетках, растущих при засолении, проводили оценку содержания легкорастворимых белков. Для этого проводили электрофорез по Лэммли [8]. Для выделения белка измельчённый образец растительной ткани заливали 400мкл буфера для экстракции и оставляли на ночь. Экстракт фильтровали. Перед нанесением белковый экстракт кипятили в течение 3-х минут и наносили по 10-14 мкл. Буфер для экстракции содержал: глицерин – 11,0 мл; 10%-ный додецилсульфат натрия – 20,0мл; 1М трис рН-6,8 – 8,0мл; β - меркаптоэтанол – 5,0 мл с добавлением воды до 100,0 мл.

Электрофорез проводили в концентрирующем и разделяющем гелях.

Гель концентрирующий (15,0мл): 1М трис рН-6,8 – 1,875мл; 10%-ный додецилсульфат натрия – 0,15 мл; сополимеры: акриламид (30,0%) – 2,505 мл, метиленбисакриламид (1,0%) – 1,95 мл; H_2O – 8,4 мл; катализаторы: ПСА – 150,0 мкл; ТЭМЭД – 15,0мкл. Гель разделяющий (60,0мл): 1,5М трис рН-8,7 – 15,0 мл; 10%-ный додецилсульфат натрия – 0,60 мл; сополимеры: акриламид (30,0%) – 25,0мл, метиленбисакриламид (1,0%) – 6,2мл; H_2O – 13,0 мл; катализаторы: 10%-ный ПСА – 300,0 мкл, ТЭМЭД – 30,0 мкл. Электродный буфер (на 1,0л): трис – 3,0г; глицин – 14,4г; додецилсульфат натрия – 1,0г. Режим электрофореза: до вхождения в разделяющий гель – 30А, до конца пластины – 60А.

Результаты и обсуждение

Ba^{2+} -устойчивые клеточные линии сои сохраняли развитие в присутствии различных типов засоления. В таблице показаны данные относительного прироста биомассы культур сои.

Относительный прирост биомассы клеточных культур сои при культивировании в условиях засоления

Генотипы сои	Δm			
	B_5^* Гамборга	$B_5^* + Ba^{2+}$	$B_5^* + \text{мор. соль}$	$B_5^* + Na_2SO_4$
Васильк. №2	$2,00 \pm 0,28$	$1,33 \pm 0,40$	$0,98 \pm 0,24$	$1,86 \pm 0,19$
Васильк. №3	$5,25 \pm 0,25$	$2,58 \pm 0,26$	$0,98 \pm 0,11$	$2,65 \pm 0,03$
Васильк. №1	$3,38 \pm 0,17$	$6,03 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,20$	$2,74 \pm 0,21$
Васильк. дик. тип	$4,14 \pm 0,45$	Не росла	Не росла	Не росла

Как видно из таблицы относительный прирост биомассы устойчивых культур в присутствии засоления был ниже, чем в нормальных условиях. При этом наблюдались существенные различия, зависящие от типа засоления (морская соль или сульфат натрия). Однако, считать это событие результатом стресс-чувствительности, по нашему мнению не вполне корректно. Давно установлен факт снижения размера и объёма у устойчивых к солям клеток при культивировании в условиях засоления [1, 3, 4, 7]. Такие клетки вместо вытянутой формы имеют округлую компактную. Это адаптивная реакция, которая способствует установлению внутриклеточного осмотического баланса, соответствующего внешней ионной силе. Меньший объём клетки требует меньшего количества протекторных совместимых осмолитов [7, 10]. Ранее нами было показано, что в условиях засоления Ba^{2+} -устойчивые клеточные линии накапливают пролин [2]. При этом в клетках, растущих на фоне сульфатного засоления, уровень этой аминокислоты был ниже, чем в клетках, культивируемых в присутствии солей морской воды.

Поскольку Δm в обоих случаях положительный, можно предположить, что увеличение уровня свободного пролина происходило за счёт координации системы ферментов его синтеза/деградации. Известно, что пролин – это единственная аминокислота, управляющая процессами эндогенного накопления и регулирующая свой внутриклеточный уровень [9]. Поэтому различия (по абсолютной величине, но не по динамике накопления/убыли) содержания пролина также могут указывать на активную адаптацию к окружающей среде.

Дополнительным свидетельством в пользу высказанного предположения есть данные проведенного электрофореза белков (Рис.).

Как видно из данных рисунка устойчивые клеточные линии сои при культивировании в условиях засоления не отличались широким спектром растворимых белков. Данный факт отмечался и другими авторами [3]. Вероятно, исходя из условий культивирования (летальные концентрации засоления), данное событие было следствием адаптации к жёсткому стрессовому давлению. При этом по спектру белков не наблюдалось различий, зависящих от условий культивирования (тип засоления). Таким образом можно предположить, что на синтез белков оказывала большее влияние ионная

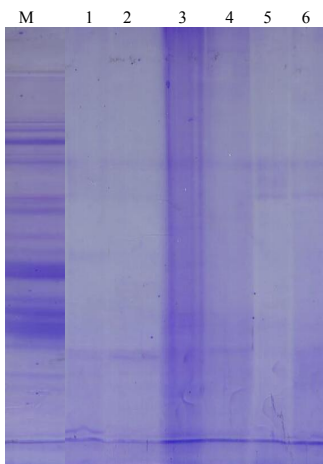


Рис. Электрофорез растворимых белков Va^{2+} -устойчивых клеточных линий сои УКЛ, сорта Васильковская, культивированных на фоне засоления: М – маркеры молекулярных масс; 1, 2 - Ва – УКЛ № 1; 3, 4 - Ва – УКЛ № 2; 5, 6 - Ва – УКЛ № 3; 1, 3, 5 – 1% Na_2SO_4 ; 2, 4, 6 – 1% морская соль;

сила среды, но не действие конкретного токсического аниона. Принимая во внимание различия в показателях содержания пролина, зависящие от состава селективных сред, можно корректно предположить, что пул пролина в клетках Va^{2+} -устойчивых линий обеспечивался синтезом *de novo*. В противном случае (при деградации пролин-содержащих протеинов) спектр растворимых белков также соответствовал бы конкретной среде. При этом уровень аминокислоты вполне обеспечивал синтетические потребности клетки (положительный Δm).

Кроме пролина в качестве совместимых осмолитов могут выступать и другие соединения, в частности сахароза [6]. С другой стороны, это соединение может регулировать активность генов деградации пролина [6]. Поэтому в нашем случае относительно невысокий уровень пролина в клетках, культивируемых в присутствии Na_2SO_4 , мог быть результатом регуляции генов пролиндегидрогеназы с сахарозой.

Однако в любом случае очевидно, что Va^{2+} -устойчивые клеточные линии сои выдерживают засоление. Более того, они активно адаптируются к окружающей среде, что свидетельствует в пользу их солеустойчивости.

Таким образом можно сделать выводы:

Отобранные на селективных средах с ионами бария клеточные линии сои характеризовались устойчивостью к летальным концентрациям засоления.

Общая солеустойчивость вариантов обеспечивается за счёт адаптации к конкретному типу засоления.

Литература

1. *Сергеева Л.Е.* Новая среда с ионами бария – альтернативная система для отбора солеустойчивых клеточных линий // Биотехнология. – 2002, № 2. – С.47-52.
2. *Сергеева Л.С., Михальська С.І., Порецька О.І.* Роль вільного проліну в підтриманні солестійкості клітинних ліній тютюну і сої, відібраних на середовищі з іонами барію // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – 40, №6. – С.532-537.
3. *Сидоров В.А.* Биотехнология растений. Клеточная селекция. – Киев: Наукова думка, 1990. – 260с.
4. *Binzel M.L., Hess F.D., Bressan R.A., Hasegawa P.M.* Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells // Plant Physiol. – 1988. – 86, №2. – P.607-614.
5. *Gamborg J.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirement of suspension cultures of soybean roots // Experim. Cell Res. – 1968, №50. – P.151-158.
6. *Hanson J., Hanssen M., Wise A. et al.* The sucrose regulated transcription factor bZIP 11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of *Asparagine Synthetase 1* and *Proline Dehydrogenase 2* // Plant J. – 2008. – 53. – P.935-949.
7. *Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha et al.* regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implication in plant growth and abiotic stress tolerance // Curr. Sci. – 2005. – 188. – P.424-438.
8. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P.680-685.
9. *Lehman S., Funck D., Szabados L., Rentsch D.* Proline metabolism and transport in plant development // Amino Acid. – 2010. – 4. – P.949-962.
10. *Schafleitner R., Gaudin A., Gutierrez Rosales R.O.* Proline accumulation and real time PCR expression analysis of genes encoding enzymes of proline metabolism in relation to drought tolerance in Andean potato // Acta Physiol. Plant. – 2007. – 27. – P.19-26.

Резюме

На селективных средах с ионами бария отобраны устойчивые клеточные линии сои. Эти варианты росли в присутствии летальных концентраций солей морской воды или сульфата натрия. Общая солеустойчивость сочетается с адаптацией к конкретному типу засоления.

На селективных середовищах з іонами барію відібрані стійкі клітинні лінії сої. Ці варіанти росли у присутності летальних концентрацій солей морської води або сульфату натрію. Загальна солестійкість поєднується із адаптацією до конкретного типу засолення.

On the selective medium with the addition of barium ions the resistant soybean cell lines were obtained. These variants grew at presence of the lethal doses of sea water salts or sodium sulfate. The total resistance combined with the adaptation to the individual type of salinity.

СОРОКА А.И.

*Институт масличных культур НААН Украины,
Украина, 70417, г. Запорожье, ул. Институтская, 1, э-почта: oilseed@mail.zp.ua*

ХАРАКТЕРИСТИКА ГАПЛОИДНЫХ И ДИГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОГО РАПСА, ПОЛУЧЕННЫХ ЧЕРЕЗ КУЛЬТУРУ ПЫЛЬНИКОВ

Получение гаплоидов методами андрогенеза и гиногенеза на сегодняшний день является одним из общепризнанных способов создания константных коммерческих линий ряда сельскохозяйственных культур [1-3]. Предполагается, что растения при использовании данного метода образуются из гаплоидных структур, вследствие чего они имеют гаплоидный набор хромосом. Часть растений, тем не менее, могут быть и удвоенными гаплоидами (иногда их еще называют «дигаплоидами») из-за спонтанного удвоения хромосом в культуре *in vitro*. Для последующей селекционной работы интерес представляют, как правило, удвоенные гаплоиды, которые визуалью не всегда представляется возможным отличать от гаплоидных растений.

Целью нашей работы было установить при помощи непрямых методов различия между гаплоидными и дигаплоидными растениями озимого рапса, полученными через культуру пыльников.

Материалы и методы

В качестве материала использовали гаплоидные и дигаплоидные растения озимого рапса, полученные в культуре *in vitro* при культивировании пыльников в лаборатории биотехнологии Института масличных культур НААН.

Для подсчета количества хромосом у полученных через культуру *in vitro* растений рапса готовили временные давленные препараты точек роста и оснований молодых листочков, используя в качестве красителя пропионолактоид [4].

Подсчет количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и измерение длины замыкающих клеток устьиц проводили в эпидермальной ткани наиболее развитых листьев, взятых с базальной части стебля. Материал фиксировали в ледяной уксусной кислоте и окрашивали 5%-ным раствором йода в йодистом калии [4]. У каждого растения также подсчитывали количество устьиц на единицу площади.

После начала цветения анализировали морфологические характеристики цветков, учитывая их диаметр, длину и ширину лепестка, а также длину пыльников.

Статистическую обработку полученных данных проводили согласно общепринятых методик, а оценку достоверности различий осуществляли по t-критерию Стьюдента [5].

Результаты и обсуждение

Полученные в культуре пыльников растения вначале анализировали на плоидность методом прямого подсчета количества хромосом в соматических клетках. Результаты анализа метафазных пластинок показали, что среди них были как растения с количеством хромосом около 19, так и с увеличенным в 2 раза количеством хромосом. Таким образом, популяция растений была представлена как гаплоидами, так и удвоенными гаплоидами.

В дальнейшем эти две группы растений сравнивали между собой, используя непрямые методы оценки. Анализировали ряд цитологических и морфологических характеристик (табл.).

Установлено, что гаплоидные растения характеризовались значительно меньшим количеством хлоропластов по сравнению с удвоенными гаплоидами. Их количество у гаплоидных растений варьировало от 13 до 14 штук на клетку, тогда как у удвоенных гаплоидов их было 19-21 штук на клетку. В целом, уменьшение количества хлоропластов в замыкающих клетках устьиц гаплоидов составило 29-37% по сравнению с удвоенными гаплоидами.

Таблица

Характеристика некоторых признаков у гаплоидных и дигаплоидных образцов рапса озимого

Признак	Гаплоид	Удвоенный гаплоид
Количество хлоропластов в замыкающих клетках устьиц, шт.	13,6±0,13*	20,3±0,15
Длина замыкающих клеток устьиц, мкм	16,5±0,10*	23,6±0,15
Количество устьиц на 1 мм ² , шт.	278,5±16,20*	181,0±5,53
Диаметр цветка, мм	12,6±0,23*	17,2±0,35
Длина лепестка, мм	9,5±0,49*	12,9±0,38
Ширина лепестка, мм	4,0±0,14*	6,5±0,21
Длина пыльника, мм	2,2±0,14*	4,0±0,18

* – отличия между гаплоидами и удвоенными гаплоидами существенны на 5%-ном уровне значимости.

Помимо хлоропластов у растений, полученных через культуру пыльников, анализировали и длину замыкающих клеток устьиц. Размер устьиц гаплоидных растений значительно отличался от удвоенных гаплоидов и был почти на треть меньше.

Также анализировали количество устьиц на единицу площади. У растений с гаплоидным набором хромосом их было почти в полтора раза больше чем у удвоенных гаплоидов. Скорее всего, это обусловлено более мелким размером эпидермальных клеток гаплоидов по сравнению с диплоидами.

Различия между растениями разной плоидности исследовали и на морфологическом уровне. У гаплоидных растений цветки были значительно

мельче. Как видно из таблицы, все элементы цветка, сформированные на растениях гаплоидного типа, были существенно меньше, чем у удвоенных гаплоидов. Диаметр цветка у гаплоидов по сравнению с удвоенными гаплоидами уменьшился в 1,4 раза, длина пыльников – в 1,8 раза, длина и ширина лепестков – в 1,6 раза.

Таким образом, с помощью непрямых методов оценки были установлены различия между гаплоидами и удвоенными гаплоидами озимого рапса как на цитологическом, так и на морфологическом уровнях. Это позволяет в ряде случаев визуально идентифицировать растения определенной плоидности.

Выводы

Гаплоиды озимого рапса по сравнению с удвоенными гаплоидами имеют меньший размер замыкающих клеток устьиц и меньшее количество в них хлоропластов. Кроме того, они характеризуются большим количеством устьиц на единицу площади.

Гаплоиды и удвоенные гаплоиды существенно различаются и по таким элементам морфологии цветка как его диаметр, размер лепестков и длина пыльников.

Литература

1. *Hu H., Zeng J.Z.* Development of new varieties via anther culture // Handbook of plant cell culture. – N.Y.: Macmillan, 1984. – 3. – P. 65-90.
2. *Morrison R.A., Evans D.A.* Haploid plants from tissue culture: New plant varieties in a shortened time // Biotechnology. – 1988. – 6. – P. 684-690.
3. *Ницше В., Венцель Г.* Гаплоиды в селекции растений. – М.: Колос, 1980. – 128 с.
4. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
5. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. – М.: Колос, 1979. – 406 с.

Резюме

Установлено, что гаплоиды озимого рапса, по сравнению с удвоенными гаплоидами, характеризуются меньшим количеством хлоропластов в замыкающих клетках устьиц и размером самих замыкающих клеток устьиц, и большим количеством устьиц на единицу площади. Гаплоиды также формировали цветки меньшего размера.

Встановлено, що гаплоїди озимого ріпака, порівняно з подвоєними гаплоїдами, характеризуються меншою кількістю хлоропластів в замикаючих клітинах продихів і розміром самих замикаючих клітин продихів та більшою кількістю продихів на одиницю площі. Гаплоїди також формували квітки меншого розміру.

It was found that haploids of winter rape, as compared to doubled haploids, were characterized by smaller number of chloroplasts in stomata guard cells and the size of stomata guard cells themselves, and bigger number of stomata per unit area. Haploids also developed flowers of smaller size.

СТАДНИЦЬКА Н.Є., ШВЕД О.В., ЧЕРВЕЦОВА В.Г., МОНЬКА Н.Я.,
ЛУБЕНЕЦЬ В.І., НОВІКОВ В.П.

Національний університет „Львівська політехніка”,
79013, м. Львів, вул. С. Бандери, 12, e-mail: vnovikov@polynet.lviv.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ *IN VITRO* ТІОСУЛЬФОНАТІВ ДЛЯ ЗАХИСТУ АГРОПРОДУКЦІЇ ВІД ФІТОПАТОГЕНІВ

При зберіганні сільськогосподарської продукції відбуваються різні зміни в її складі та якості. Головними збудниками псування є гриби (дріжджі, цвілі) та бактерії. Сильними фунгіцидними і бактерицидними властивостями володіють тіосульфонати - естери тіосульфокислот ($R-SO_2-S-R^1$), які за своєю будовою близькі до антибіотиків вищих рослин, зокрема до аліцину [1]. Вони достатньо стійкі при зберіганні й успішно можуть використовуватися в сільському господарстві для боротьби із захворюваннями рослин і втратами урожаю.

Естери тіосульфокислот здатні попереджати (біостійкість) або гальмувати (біоцидність) гнильні процеси. Ці властивості можна використовувати для профілактики і боротьби із псуванням плодово-овочевої продукції.

В умовах *in vitro* нами проведено мікробіологічні дослідження S-естерів 4-амінобензентіосульфокислоти, які є малотоксичними (наприклад, LD_{50} для S-етилового естеру 4-амінобензентіосульфокислоти становить 2500 мг/кг) і активними проти бактерій і міцеліальних грибів.

З плодів цитрусових, придбаних у торгівельній мережі міста Львова нами були виділені та ідентифіковані одні із збудників псування лимонів і мандаринів. Ними виявились міцеліальні гриби *Ramularia chelidonii* і *Bragmidium fragariae*, відповідно. Визначення антибіотичної активності S-естерів 4-амінобензентіосульфокислоти, яке проводилось методом дифузії в агар, показало, що виділені штами проявляють середню та високу чутливість до всіх досліджуваних естерів (табл. 1). Зони затримки росту досліджуваних мікроорганізмів при концентраціях діючих речовин 0,5% і 1% складала в середньому 25-30 мм.

Головними збудниками псування фруктів та овочів є гриби, зокрема представники родів *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* та інших фітопатогенних грибів, тому нами також виконано дослідження фунгіцидної активності S-етилового естеру 4-амінобензентіосульфокислоти (ЕТС). Мікробне навантаження становило $5 \cdot 10^5$ КУО/мл. В таблиці 2 представлено одержані результати.

Визначення оптимальних біоцидних і біостатичних концентрацій ЕТС проводили методом серійних розведень на тестових культурах бактерій та грибів. Отримані дані представлені в таблиці 3.

Таблиця 1

№	Речовина	Концентрація, %	Діаметр зон затримки росту, мм	
			Bragmidium fragariae	Ramularia chelidonii
1	S-аліловий естер 4-амінобензентіосульфокислоти	0,1	21±1	10±0,1
		0,5	27±2	20±2
		1,0	30±0,1	23±1
2	S-метиловий естер 4-амінобензентіосульфокислоти	0,1	21±1	0
		0,5	25±3	17±3
		1,0	28±2	24±4
3	S-етиловий естер 4-амінобензентіосульфокислоти	0,1	19±3	11±1
		0,5	26±0,1	23±1
		1,0	24±3	30±0,1

Таблиця 2

Концентрація, %	Діаметр зони затримки, мм					
	Aspergillus niger	Aspergillus terreus	Aspergillus fumigatus	Penicillium chrysogenum	Penicillium cyclopium	Paecilomyces varioti
0,1	0	15	0	20	18	20
0,3	25	20	22	25	20	20

Таблиця 3

Бактерії (мікробне навантаження 10 ⁶ КУО/мл)						Гриби (мікробне навантаження 5·10 ⁵ КУО/мл)				
Bacillus licheniformis	Bacillus mesentericus	Bacillus polymixa	Pseudomonas aeruginosa	Arthrobacter variabilis	Micrococcus	Aspergillus niger	Aspergillus terreus	Penicillium chrysogenum	Paecilomyces varioti	Cladosporium resinae
МБсК, мкг/мл						МФсК, мкг/мл				
15,6	62,5	15,6	31,2	15,6	7,8	125	62,5	62,5	31,2	15,6
МБцК, мкг/мл						МФцК, мкг/мл				
15,6	62,5	15,6	31,2	15,6	7,8	250	125	62,5	62,5	31,2

Для захисту насіння овочевих культур, зокрема, капусти, томатів, моркви, огірків на практиці застосовують еталонний біоцид похідне карбамінової кислоти (ТМТД). Нами досліджено методом серійних розведень, що використання ЕТС в аналогічних концентраціях є більш ефективним для захисту від пошкодження відповідною фітофторою, що представлено в таблиці 4.

Таблиця 4

Рослина, яку захищають	Вид мікроорганізмів (фітофтора)	Бактерицидна (БЦ) активність ТМТД, мг/мл	Бактерицидна (БЦ) активність ЕТС, мг/мл
Капуста	<i>Xantomonas campestris</i>	40	20
Томати	<i>Corynebacterium michiganense</i>	40	100
Морква	<i>Erwinia caratovora</i>	1000	100
Огірки	<i>Pseudomonas lachrymans</i>	200	40

Дані біоцидної активності свідчать про високу активність ЕТС відносно фітопатогенних бактерій та грибів і робить його перспективним для захисту насіння рослин, причому в невисоких концентраціях. На підставі результатів, отриманих *in vitro*, доцільно провести польові експерименти для урахування впливу факторів оточуючого середовища. Представлені в даному дослідженні тиосульфонати застосовувалися також для отримання біоцидних композицій полімерного типу [2], які проявляють антимікробну дію, величина якої залежала від типу тиосульфонатного фрагменту та природи полімеру, що може бути використано для створення захисного покриття насінневого фонду.

Одержані результати, підтверджують необхідність подальших досліджень по використанню S-естерів 4-амінобензентіосульфокислоти, як антибактеріальних засобів для захисту плодів від пошкодження міцеліальними грибами в період зберігання.

Для встановлення залежності структура-біологічна дія для S-естерів тиосульфокислот різної будови нами в першу чергу проводився прогнозований скринінг біологічної активності з використанням різних біоінформативних програм, який обов'язково згодом супроводжувався експериментальними мікробіологічними дослідженнями.

Для покращення проникності естерів тиосульфокислот через клітинні мембрани мікроорганізмів проводяться дослідження по створенню комплексних протимікробних препаратів на основі тиосульфонатів та синтетичних і природних поверхнево активних речовин.

Література

1. *Lubenets V., Vasylyuk S., Baranovych D., Komarovska O., Rayevska K., Zaichenko O., Novikov V.* The plant protection remedies of thiosulfonate type // *Chemicals in Agriculture and Environment*. – 2007. – V. 8. – P. 163-167.
2. *В.І. Лубенець, О.В. Лужецька-Швед, О.З. Комаровська, В.П. Новіков, Л.О. Кучеренко, В.Ф. Смірнов, Р.М. Толмачева.* Антимікробні властивості біологічно активних полімерів з тиосульфонатними фрагментами//*Фізіологічно активні речовини*. –№2(28), 1999. – С.101-106.

Резюме

Проведено мікробіологічні дослідження синтезованих нами естерів тиосульфокислот, які в дослідях *in vitro* на тестових культурах мікроорганізмів – збудників

псування фруктів та овочів – показали наявність високої біостатичної та біоцидної активностей. Експериментально встановлено взаємозв'язок між біологічною активністю і структурою одержаних естерів тіосульфокислот, що додатково підтверджується різними біоінформативними комп'ютерними програмами.

Проведены микробиологические исследования синтезированных нами эфиров тиосульфокислот, которые в опытах *in vitro* на тестовых культурах микроорганизмов – возбудителей порчи фруктов и овощей - показали наличие высокой биостатической и биоцидной активностей. Экспериментальным путем установлена связь между биологической активностью и структурой полученных эфиров тиосульфокислот, что дополнительно подтверждается разными биоинформативными компьютерными программами.

The microbiological investigations of tiosulfoacids esters synthesised by us in experiments *in vitro* on the test cultures of microorganisms - the spoilagers of fruits and vegetables were conducted. The presence of high biostatic and biocidal activities have shown. The connection between biological activity and structure of the obtained esters of tiosulfoacides was shown experimentally, which further confirmed by different bioinformativity computer programs.

**СУПРУН С.М.¹, ПАРХОМЕНКО Ю.М.¹, ДОНЧЕНКО Г.В.¹,
ХАРКЕВИЧ Е.С.,² СТЕПАНЕКО С.П.¹, СИДНИЧЕНКО И.В.², ЛЯСОТА В.П.,
²КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.¹**

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: sst@biochem.kiev.ua;

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАНУ, Украина, 03143 Киев ул. Заболотного 154;

³Белоцерковский национальный аграрный университет. Украина, 09117, Белая Церковь, Киевской обл. лл. Соборная 8/1.

ГРИБНОЙ ПРЕПАРАТ: ПИТАТЕЛЬНАЯ ЦЕННОСТЬ, ИСПЫТАНИЕ НА ЖИВОТНЫХ

Мицелиальные грибы (микромитеты) широко используются в различных отраслях народного хозяйства – защите окружающей среды, сельском хозяйстве, медицине. Они являются продуцентами многих природных биологически активных соединений, таких как протеины, витамины, жирные кислоты, а также некоторых уникальных соединений, химический синтез которых проблематичен и часто неэкологичен. В некоторых странах мира биотехнологии на основе грибной ферментации используются для получения пищевых и кормовых добавок [1,2], обогащенных протеином и биологически активными соединениями. От других богатых белком продуктов питания грибы выгодно отличаются низкой калорийностью и наличием пищевых волокон. Более того, грибы технологичны и нетребовательны к субстрату для их культивирования. Перечень атоксичных грибов продуцентов протеино-витаминовой биомассы, которые используются в производстве, довольно ограничен, поэтому поиск новых штаммов продуцентов такого

типа и совершенствование технологий получения на их основе протеино-витаминных продуктов является чрезвычайно актуальным.

Цель данного исследования - разработка биотехнологии получения белково-витаминного препарата на основе селекционированных штаммов микромицетов и испытание биологической активности полученного препарата на животных.

Материалы и методы

Работа проводилась с селекционированными нами ранее штаммами микромицетов: *Fusarium sambucinum*, который был отобран как активный продуцент витаминов РР (никотиновой кислоты), тиамина и пантотеновой к-ты и штамма *Mycelia sterilia* - продуцент белка и гидролитических ферментов. Штаммы депонированы и хранятся в коллекции культур Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. В лабораторных условиях оба штамма микромицетов выращивали на синтетической питательной среде Чапека с мелассой (1% по р.в.), в качестве источника углерода. Посевной материал (инокулят) готовили в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об./мин. в течение 24 часов. Ферментацию проводили при глубинном культивировании в колбах в течение 72 часов. По окончании ферментации биомассу отделяли от культуральной жидкости и высушивали. В полученных препаратах определяли содержание биологически активных соединений.

В производственных условиях ферментацию проводили со штаммом *Fusarium sambucinum* в ферментере емкостью 1,2 м³ на базе биотехнологического предприятия «ПП БТУ Центр», г. Ладыжин. Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм. в течение 30 мин и засевали 5%-ным инокулятом. Ферментация заканчивалась через 28-30 час. После фильтрации, высушивания и измельчения биомассы получали порошкообразную форму препарата, биологическая активность которой проверялась на животных. Определение содержания витаминов и других биологически активных веществ проводили согласно общепринятым методам [5,6], к примеру содержание NAD⁺ определяли с помощью алкогольдегидрогеназы [7]. Определение аминокислот проводилось на аминокислотном анализаторе ААА–339 (Чехия) [3]. Опыты по испытанию биологической активности препарата проводили в двух сериях на мышах по 10 особей. в каждой серии. Длительность экспериментов составляла 60 суток. Животные, содержащиеся на дефицитном по протеину рационе, дополнительно получали биопрепарат из расчета 0,36 и 0,9 г/особь один раз в сутки. Контролем служили мыши, которые содержались на дефицитном по протеину рационе. Для оценки влияния биопрепарата использовали такие критерии, как поведенческие реакции животных, потребление корма и воды, выживаемость, показатели периферической крови (количество лейкоцитов, эритроцитов, лейкоцитарная формула, свертываемость крови) и биохимические тесты: уровень белка в сыворотке крови и отдельных ее фракциях. морфострукту-

ра внутренних органов. Определение вышеуказанных показателей проводили общепринятыми методами согласно ветеринарным требованиям к доклиническим испытаниям. [4].

Результаты и обсуждение

Ранее нами были селекционированы штаммы, которые являются эффективными продуцентами витаминов, коферментов (*Fusarium sambucinum*), жирных кислот, комплекса литических энзимов (*Mycelia sterilia*) и других биологически активных продуктов. Изучены физиолого – биохимические свойства этих штаммов [5]. Было показано, что оба штамма активно продуцируют комплекс витаминов, наиболее активно - *Fusarium sambucinum*, в мицелии которого содержание никотиновой и пантотеновой кислот составляло 800-1200 и 1250-1400 мкг/г, соответственно, тиамин - 40 мкг/г, протеина - до 35% сухого веса. При совместном культивировании вышеуказанных штаммов в лабораторных условиях мы наблюдали ощутимое повышение содержания основных витаминов в полученной биомассе [6]. В биомассе, полученной при ферментации штамма *Fusarium sambucinum*, инденцифицировано 26 жирных кислот, причем довольно высокую долю составляют незаменимые жирные кислоты (около 70%) такие как олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая. Такое высокое содержание ненасыщенных жирных кислот отмечено в плодовых телах некоторых высших базидиальных грибов. Показано, что выход определенных витаминов и коферментов при ферментации может быть повышен за счет добавления в инкубационную среду предшественников их биосинтеза. Такой подход является целесообразным, если ставится задача разработки биотехнологии получения отдельных витаминов или коферментов. Однако вопрос о том, имеет ли смысл совместное выращивание грибов для получения протеино-витаминной биомассы, остается открытым. В данной работе приводятся данные по оценке выхода и качества протеина в мицелии обоих штаммов микромицетов, полученном при раздельном и совместном их культивировании. Данные по содержанию индивидуальных аминокислот в протеине мицелия грибов, культивируемых в различных условиях, приведены в таблице 1. Из этих данных видно, что при раздельном культивировании штаммов по общему выходу протеина (сумма аминокислот) преимущества имеет штамм *Fusarium sambucinum*, в его биомассе содержание истинного протеина составляет 276,8 мг на 1 г сухого мицелия, в то время как в мицелии *Fusarium sambucinum* - 165,5 мг на 1 г. По содержанию незаменимых аминокислот показатели также выше для мицелия *Fusarium sambucinum*. К сожалению, при совместном культивировании штаммов вышеуказанные показатели приближаются к показателям, характерным для *Mycelia sterilia*. Приведенные данные свидетельствуют о нецелесообразности совместного культивирования вышеуказанных штаммов, если нужно получить биомассу, обогащенную протеином и незаменимыми аминокислотами.

Таблица 1

Содержание аминокислот в мицелии грибов при различных условиях культивирования, мг на 1 г

Показатель	Раздельное и совместное культивирование штаммов в лабораторных условиях			Культивирование <i>F.sambucinum</i> в производственных условиях
	<i>F.sambucinum</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>F.sambucinum</i> + <i>Mycelia sterilia</i>	
Незаменимые аминокислоты				
Валин	15,09	11,56	20,33	36,80
Изолейцин	11,42	5,39	5,97	12,30
Лейцин	18,44	10,15	10,04	21,58
Лизин	19,01	10,60	12,81	22,77
Метионин	6,17	2,59	2,22	5,04
Треонин	15,40	11,49	10,01	17,17
Фенилаланин	11,10	5,80	5,87	7,77
Триптофан	-	2,73	-	3,1
Заменимые аминокислоты				
Аланин	19,67	9,96	10,70	19,71
Аргинин	15,17	10,82	12,73	18,12
Асп.к-та	21,66	15,38	15,29	22,71
Гистидин	7,69	5,81	5,01	8,67
Глицин	15,19	8,52	30,26	15,23
Глут.кисл.	52,84	37,24	36,03	57,37
Пролин	22,43	3,83	2,88	13,32
Серин	13,43	11,22	9,43	15,10
Тирозин	9,72	3,91	4,53	10,51
Цистин	2,44	1,26	1,67	1,31
Сумма	276,87	165,53	167,80	305,37

Для того, чтобы оценить питательные качества грибного протеина, мы провели сравнительный анализ содержания незаменимых аминокислот в протеине, содержащемся в биомассе, полученной при культивировании *F.sambucinum* в производственных условиях и в протеине некоторых продуктов (Табл.2).

Приведенные данные свидетельствуют, что по питательной ценности этот протеин выше протеина животного происхождения и не уступает протеину сои, но в отличие от последнего в нем не содержится ингибитора трипсина, избавиться от которого достаточно проблематично.

Партия грибной биомассы, наработанной путем ферментации штамма *F.sambucinum* в производственных условиях в ПП БГУ- Центре (г.Ладыжин) была передана для проведения испытаний как кормовой добавки в Белоцерковский национальный аграрный университет. В эксперименте с мышами

установлено, что при введении в корм биопрепарата общее состояние мышей было удовлетворительным, корм они поедали полностью, водопотребление обычное. Выживаемость животных в подопытных группах составила 100 %, прирост массы тела на 60 день составлял 10,3%. При исследовании морфологических показателей крови установлено активацию эритропоэза, увеличение уровня гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов у подопытных мышей находилось в пределах физиологической нормы. Свертывающая способность крови сохранялась без изменений.

Таблица 2

Содержание незаменимых аминокислот в протеине различного происхождения, мг на 1 г

Показатель	Мицелий <i>F.sambucinum</i> (получен в производственных условиях)	Мышечная ткань		Соя, зерно [7]
		Крупного рогатого скота [7]	Свинина [7]	
Валин	36,80	11,48	11,35	20,90
Изолейцин	12,30	9,39	9,70	18,10
Лейцин	21,58	16,24	15,38	26,70
Лизин	22,77	17,42	16,31	20,90
Метионин	5,04	5,88	4,78	5,60
Треонин	17,17	8,75	9,68	13,90
Фенилаланин	7,77	9,04	8,14	16,10
Триптофан	3,1	2,45	2,74	4,50
Сумма незаменимых.а.к.	126,53	80,65	78,08	126,70

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о том, что питательную ценность грибного протеина можно повысить путем подбора штамма и условий его культивирования. Протеин мицелия *F.sambucinum* по составу аминокислот, в том числе незаменимых, не уступает животному протеину и протеину сои, что дает основания рекомендовать его как сырье для пищевых и кормовых белковых добавок. Результаты испытания грибного препарата на лабораторных животных показали его благоприятное влияние на рост и развитие теплокровных животных, гематологические и биохимические показатели, что позволяет прогнозировать эффективность использования препарата в сельском хозяйстве.

Литература

1. *Hobbs Ch.* Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Botanica press. Santa Cruz, С.А. 1995. - 251 p.
2. *Беккер З. Е.* Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. - 260 с.

3. Байдалинова Л.С., Кривич В.С., Бахлюдина Л.П., Методические рекомендации и указания по газовой хроматографии жирных кислот. Калининград., 1977. – 33с

4. Коцюмбас І.Я. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів.– Львів: Тріада плюс, 2006. - 360с.

5. Гулямова Т.Г., Супрун С.М., Эланская И.А., Халмуратов А.Г. Продуцирование никотинамидадениндинуклеотида некоторыми микромицетами. Микробиол. журн.– 1991, 53, № 3. – С.25-30.

6. Донченко Г.В., Пархоменко Ю.М., Супрун С.М. и др. Спосіб одержання білково-вітамінного продукту на основі грибів *Fusarium sambucinum* IMF-100011 і *Micellia sterilia* (white) IMB F-100014. Патент на винахід №90403, 2010, Бюл. №8, Україна.

7. Химический состав пищевых продуктов. Справочные таблицы содержания аминокислот, жирных кислот, витаминов, макро- и микроэлементов, органических кислот и углеводов/ ред. д.м.н. М.Ф.Нестерин, д.т.н.И.М.Скурихин. – Москва: Пищевая промышленность, 1979. – 248 с.я

Резюме

Разработана биотехнология получения белково-витаминного препарата на основе штамма *Fusarium sambucinum* F-10011. Испытания грибного препарата на лабораторных животных свидетельствуют о возможном применении его в качестве кормовой и пищевой добавки.

Розраблена біотехнологія отримання білково-вітамінного препарату на основі штаму *Fusarium sambucinum*. Випробування грибного препарату на лабораторних тваринах свідчить про можливе застосування його в якості кормової та харчової добавки.

The biotechnology of obtaining of protein-vitamin preparation had been developed on the basis of culture of *Fusarium sambucinum* F-10011. Fungal preparation was testified on laboratory animals and was proved the possibility of its using for additions to food and forage.

**ТАНАСІЄНКО І¹., ФІНЮК Н²., МІТІНА Н²., ЗАІЧЕНКО О²., СТОЙКА Р.С. ²,
СМЕЦЬ А.І.¹, БЛОМ Я.Б¹**

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,

Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського 2а, e-mail: iratanasienko@gmail.com

² Інститут клітинної біології НАН України,

Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова 14/16, e-mail: nataliyafiniuk@gmail.com

ВИВЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ НАНОПОЛІМЕРІВ НА ОСНОВІ N,N-ДИМЕТИЛАМІНОЕТИЛМЕТАКРИЛАТУ ДЛЯ ПОДАЛЬШОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН

На сьогоднішній день існує велика кількість протоколів генетичної трансформації рослин, однак більшість із них базується на декількох основних підходах до привнесення чужорідної ДНК, зокрема, використанні представників роду *Agrobacterium* (*A.tumefaciens*/ *A.rhizogenes*), мікрочастинок вольфраму або золота, фізичного (зокрема, електоропорації) чи хі-

мічного (ПЕГ-індукованої трансформації) пошкодження клітин для полегшення проникнення послідовностей ДНК до клітин-мішеней. Принципово новим підходом для методів генетичної модифікації стало використання так званих «наночастинок/нанокompatитів», що дозволяють переносити чужорідний генетичний матеріал до геному організмів-реципієнтів завдяки утворенню комплексів між ДНК та носієм. Основна перевага використання наночастинок для трансформації рослин полягає у спрощенні власне процедури трансформації, оскільки комплекс ДНК-носії здатен переносити ген до клітин-мішеней без участі додаткових чинників, які пошкоджують рослинний матеріал і, як наслідок, погіршують процес регенерації повноцінних фертильних рослин. Як правило, полімерні нанокompatити (НК) виявляють кращу біологічну сумісність порівняно із НК на мінеральній основі. У більшості випадків різноманітні функціональні групи (гідро- та карбоксильні, аміно-, альдегідо-, епоксигрупи та інші) присутні на поверхні розроблених НК для сприяння відповідному хімічному зв'язуванню численних молекул спрямованої біологічної дії. Ковалентне приєднання цих молекул до НК необхідне, щоб попередити їх нецільове вивільнення і неконтрольовану біологічну дію. Часто для біофункціоналізації НК застосовують протеїни (імуноглобуліни, що розпізнають специфічні пептидні групи, або лектини, що визначають певні вуглеводні компоненти), які спрямовано взаємодіють із молекулами поверхні клітинних мембран (Fu et al., 2011).

З метою усунення бар'єрів некомпетентності клітин та збільшення частоти генетичної трансформації нами досліджено властивості розробленого полімерного носія полі-ДМАЕМ (N,N-диметиламіноетилметакрилату) та комплексу ДНК-носії, а також визначено його токсичність. Враховуючи одержані дані, буде проведено генетичну трансформацію протопластів модельного об'єкту *Nicotiana tabacum L.* із застосуванням полімерних нанокompatитів полі-ДМАЕМ.

Матеріали та методи

Плазмідна ДНК. Для вивчення комплексу ДНК-наночастинка використовували бінарний вектор rGreen 0029. Плазміда містила послідовність гена мембранного білка протеїнозберігаючих вакуоль (tonoplast intrinsed protein - α -TIP), злитого із репортерним геном YFP (yellow fluorescent protein) під контролем 35S промотору та *nos*-термінатору, а також селективний маркерний ген *hptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину.

Перевірка зв'язування ДНК з нанополімером. 1% водний розчин полімеру типу БГ-2 розчиняли у 20 мМ розчині Tris-HCl у концентраціях від 0,0001% до 0,1%. До отриманих розчинів БГ-2 додавали 1 мкг плазмідної двоспіральної ДНК. Отриману суміш інкубували протягом 15-25 хв при кімнатній температурі. На наступному етапі додавали 2 мкл 5х буферу для нанесення (50 % гліцерин, 2,5х ТВЕ буфер, бром феноловий синій). Отри-

мані 13 мкл реакційної суміші переносили у лунки 1% агарозного гелю і проводили електрофорез протягом 40-50 хв при 75В.

ДНК-протекторні властивості нанополімеру. Комплекси ДНК/нанополімер готували в 20 мМ Tris-HCl з використанням 1 мкг плазмідної ДНК (pGLG578) і 1 мкл нанополімеру БГ-2 в загальному об'ємі 9 мкл буферу. Аліквоти 11 мкл інкубували при кімнатній температурі протягом 25 хв та піддавали дії ДНКази I в буфері (10 мМ Tris-HCl pH 7,5, 150 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂) протягом 30 хв при 37 °С. Для зупинки дії ДНКази додавали 6 мкл буфера (рівні об'єми 0,5 М ЕДТА, 2 М NaOH і 0,5 М NaCl), а надалі зразки фарбували 2 мкл 5х буфера для нанесення. Отримані суміші піддавали електрофорезу при 75 В протягом 40-50 хв. ДНК в гелі візуалізували, використовуючи трансільмінатор (MascoVue УФ-20 Hoefer) і фотографували.

Приготування компетентних клітин *E.coli* та їх трансформація. Для накопичення плазмідної ДНК використовували компетентний штамп бактерії *Escherichia coli* DH5α. Приготування компетентних клітин та їх наступну трансформацію плазмідною ДНК проводили за методикою, розробленою раніше (Inoue et al., 1990).

Виділення плазмідної ДНК. Плазмідну ДНК (pGreen 0029) із трансформованої бактеріальної культури *E.coli* штаму DH5α виділяли за класичною методикою (Lee & Rasheed, 1990). Ізольовану ДНК (робоча концентрація 1мкг/мкл) зберігали при температурі -20°С.

Виділення протопластів. Для виділення протопластів використовували вирощені в умовах *in vitro* рослини *N. tabacum*. Протопласти виділяли відповідно до раніше розробленої нами методики (Yemets et al., 2000).

Визначення токсичності полімерних носіїв полі-ДМАЕМ. На пластико-ві чашки Петрі діаметром 35 мм наносили краплини суспензії протопластів об'ємом 300-400 мкл кожна та інкубували із 1%-ним розчином полімерного носію полі-ДМАЕМ (N,N-диметиламіноетилметакрилату) типу БГ-2 у кількостях: 1, 10, 20, 30, 40 мкл протягом 20 хв. Надалі додавали 1,5 мкл середовища 8p (Kao & Michayluk, 1975) та залишали на добу при температурі 24°С та 16-годинному фотоперіоді. Вплив наночастинок BG-2 візуалізували під люмінесцентним мікроскопом Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина).

Результати та обговорення

Для проведення робіт із генетичної модифікації рослин попередньо було синтезовано ряд нанорозмірних полімерних систем для доставки нуклеїнових кислот на основі полі-ДМАЕМ-VER та ОМС, а також оптимізовано протокол їх очистки. Для встановлення найефективнішої системи нанополімерних носіїв були перевірені їх ДНК- зв'язувальні властивості. Результати інкубації носіїв із плазмідною ДНК (від 200 пн до 10 000 пн) детектували в 1%- агарозному гелі. Після закінчення електрофорезу спостерігали два типи смуг (рис. 1): одна з них практично не рухалась, що свідчить про стабільність зв'язування носія із плазмідною ДНК і, як наслідок, втра-ту електричного заряду.

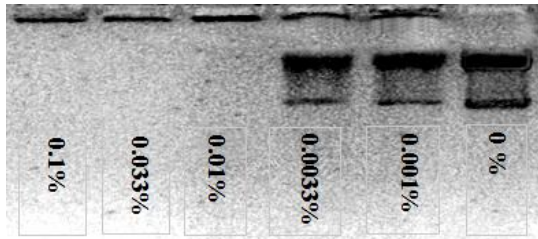


Рис. 1. Результати зв'язування плазмідної ДНК із різними концентраціями нанополімеру БГ-2

Другий тип смуг – рухома ДНК, що не зв'язалася з полімером. Результати проведених досліджень демонструють перспективність полімеру типу БГ-2, який характеризується найкращими ДНК-зв'язувальними властивостями. Даний нанополімер затримував електрофоретичний рух ДНК при концентрації 0,01% на 1 мкг ДНК.

У зв'язку із тим що, функціонування систем рестрикції-модифікації у реципієнтних клітинах є однією з основних причин неефективної трансформації, необхідно було визначити стійкість ДНК до розщеплення нуклеазами в комплексі носій-ДНК (рис. 2).

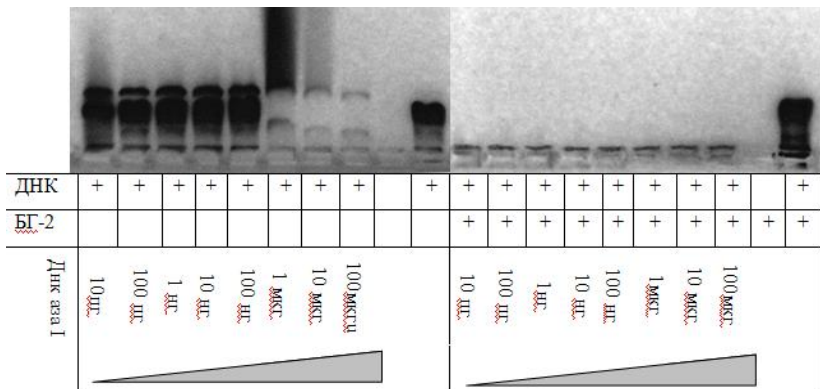


Рис. 2. Результати перевірки ДНК протекторних властивостей нанополімеру БГ-2

Таким чином, було підтверджено ДНК-протекторні властивості нанополімеру, про що свідчить стабільність плазмідної ДНК у комплексі із нанополімером типу БГ-2 після дії ДНКазу І в концентрації 0,1 U на 1 мкг ДНК.

Для адаптації системи доставки нуклеїнових кислот на основі полі-ДМАЕМ у протопласти рослин нами було використано векторну конструк-

цію pGreen 0029. Даний вектор з YFP дозволяє швидко (протягом доби) візуалізувати за допомогою флуоресцентної або конфокальної лазерної скануючої мікроскопії процес перенесення чужорідної ДНК до рослинних клітин за наявністю жовтого сингалу лише у трансгенних клітинах. Наявність селективного маркерного гену *hptII* додатково дозволяє відбирати трансформовані клітини на середовищі із антибіотиком канаміцином як селективним агентом.

Для адаптації методу генетичної трансформації протопластів з використанням полімерних носіїв нами попередньо було напрацьовано у великих об'ємах плазмідну ДНК. Для цього було приготовано компетентні клітини *E.coli* штаму DH5 α та проведено їх трансформацію. Із даного штаму було ізольовано ДНК для подальшої трансформації протопластів за участю носіїв БГ-2. Також було досліджено цитотоксичний ефект полімерних носіїв полі-ДМАЕМ на протопласти *N. tabacum*. Для визначення токсичності наночастинок типу БГ-2 до щойно ізольованих протопластів додавали 1, 10, 20, 30 та 40 мкл 1%-ного розчину носіїв, тобто 10, 100, 200, 300 та 400 мкг полімерних носіїв типу БГ-2, та інкубували протягом 20 хв. Після цього протопласти переносили у середовище 8p і культивували їх протягом доби. Ефект впливу відповідних концентрацій досліджуваних носіїв визначали через добу після початку культивування клітин. Життєздатність клітин контролювали візуально за допомогою люмінесцентного мікроскопу Axioskop 40 (Carl Zeiss, Німеччина). Слід відмітити, що повноцінні життєздатні протопласти, в подальшому здатні формувати клітинну стінку, мають сферичну форму, в той час як клітини із пошкодженою мембраною деформуються. Для підрахунку статистичної достовірності отриманих результатів для кожної концентрації носія аналізували по 300 клітин. Нами було встановлено лінійну залежність життєздатності протопластів *N. tabacum* від концентрації полімерних носіїв типу BG-2, з яким інкубували клітини тююну (Рис.3).

Було продемонстровано, що додавання 10 мкг речовини до суспензії протопластів суттєво не впливає на життєздатність клітин, в той час як привнесення 100 мкг полімерних носіїв типу БГ-2 призводило до загибелі 15% клітин (Рис.3). У разі подальшого підвищення концентрації БГ-2 спостерігали поступове зниження кількості повноцінних життєздатних протопластів сферичної форми. Так, при додаванні 200 мкг відповідних носіїв фіксували загибель клітин на рівні 33%, а при культивуванні протопластів із 300 мкг частинок БГ-2 життєздатність клітин знижувалась майже у два рази (52%). Після додавання 400 мкг полімерних носіїв полі-ДМАЕМ БГ-2 спостерігали загибель 77% протопластів.

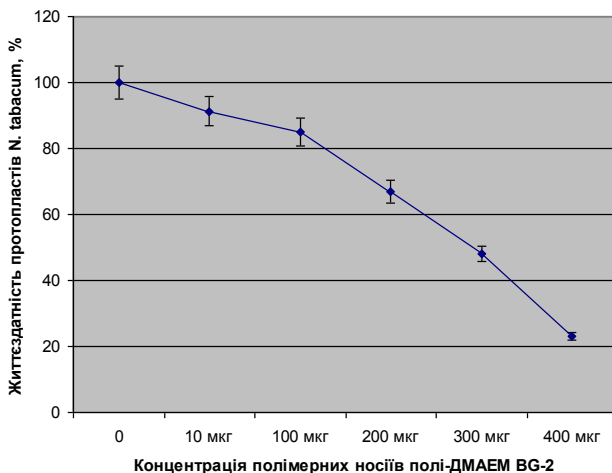


Рис.3. Залежність життєздатності протопластів *N. tabacum* від концентрації полімерних носіїв полі-ДМАЕМ БГ-2

Отже, результати проведених досліджень свідчать про негативний вплив високих концентрацій полімерних носіїв полі-ДМАЕМ типу БГ-2 на мембрани ізольованих із *N. tabacum* протопластів та їх життєздатність. З огляду на це, для трансформації протопластів *N. tabacum* чужорідними генами рекомендовано використання 10-100 мкг носіїв типу БГ-2.

Робота була виконана в рамках наукового проекту (№35/11) «Використання ефективних олігоелектролітних систем доставки генів в клітини для генетичної трансформації рослин» цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України „Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”.

Література

1. Kao K.N., Michayluk M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // *Planta*. - 1975. - Vol. 126. - P.105-110
2. Lee SY, Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // *Biotechniques*. - 1990. - vol. 9, №6. - P.676-679.
3. Yemets A.I., Kundel'chuk O.P., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Rudas V.A., Gleba Y.Y., Blume Y.B. Transfer of amiprothosmethyl resistance from a *Nicotiana glauca* mutant by somatic hybridisation // *Theor Appl Genet*. - 2000. - vol. 100. - P.847-857
4. Fu C., Sun X., Liu D., Chen Z., Lu Z., Zhang N. Biodegradable Tri-Block Copolymer Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine)(PLA-PEG-PLL) as a Non-Viral Vector to Enhance Gene Transfection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011; 12(2):1371-1388.

Резюме

Використання наночастинок для трансформації рослин є надзвичайно перспективним новітнім напрямком у біотехнології. Привнесення чужорідної ДНК до організмів-реципієнтів за участю наночастинок дозволяє спростити процедуру трансформації, оскільки комплекс ДНК-носії здатен переносити ген інтересу до клітин-мішеней без участі додаткових стресових факторів, які пошкоджують рослинний матеріал і, як наслідок, погіршують процес регенерації повноцінних рослин.

Использование наночастиц для трансформации растений чрезвычайно перспективное направление биотехнологии. Привнесение чужеродной ДНК в организмы-реципиенты с участием наночастиц позволяет упростить протокол трансформации, поскольку комплекс носитель-ДНК способен доставлять ген интереса к клеткам-мишеням без участия дополнительных стрессовых факторов, повреждающих растительный материал и, как следствие, ухудшающий процесс регенерации полноценных растений.

Nanoparticles usage for plant transformation is highly promising biotechnological approach. Foreign DNA transfer into the recipient organism *via* nanoparticles allows to simplify the transformation protocol. The carrier-DNA complex is able to deliver the gene of interest to the target cells without extra stress factors that damage the plant material and, therefore, decrease the regeneration potential of fertile plants.

ТРЕГУБ М.С., САХНО Л.А.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148
e-mail: sakhno@icbge.org.ua*

ОСОБЕННОСТИ РОСТА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА С ГЕНОМ *sup11A1* ЦИТОХРОМА P450_{SCC} В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА

Рапс является третьей в мире (после пальмы и сои [1]) масличной культурой по количеству производимого масла. В Украине его выращивали в 2010 году на площади 862,5 тыс. га, средняя урожайность достигала 17,04 ц/га, получено 1 млн. 469 тыс. 700 т семян [2]. Рапсовое масло используют для пищевых целей, в косметике, в химической промышленности, для производства биотоплива.

Селекция рапса направлена в первую очередь на повышение урожайности, масличности, улучшение качества масла. Кроме того, немаловажной в связи с меняющимися климатическими условиями является такая характеристика растительного материала как устойчивость к стрессовым факторам различного происхождения.

Нами были созданы трансформированные линии рапса, которые несли в своем ядерном геноме ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка [3]. Все биотехнологические линии характеризовались устойчивостью к обработке гербицидом BASTA в условиях

теплицы за счёт экспрессии гена *bar*, который присутствовал в конструкции в качестве селективного. Некоторые трансформанты накапливали повышенное количество суммарного растворимого белка в листьях и семенах. Антиоксидантная активность тканей листьев у них возрастала. С помощью газовой хромато-масс-спектрометрии было показано, что общее количество жирных кислот в семенах трансформантов T₂ поколения оставалось на уровне контроля. Количество основной жирной кислоты в масле рапса – олеиновой – возрастало на 6% (до 72,67 моль%), количество линоленовой уменьшалось на 30-40% (до 3,89 моль%) [4]. Анализ прорастания семян трансгенных линий рапса при повышенной (+26°C) температуре выявил отличия между проростками в накоплении биомассы, длине корней и гипокотилей, активности одного из ферментов антиоксидантной системы растений – супероксиддисмутазы (СОД) [5].

Газовая хроматография показала и различия у полученных трансгенных растений в жирнокислотном составе мембранных липидов листьев [6]. Это даёт возможность предположить об изменениях проницаемости клеточных мембран и, как следствие – об изменённом ответе на внешние воздействия.

Целью данной работы было изучение реакции растений рапса, несущих в ядерном геноме ген *cup11A1* цитохрома P450_{SCC} на осмотический стресс в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве исследуемого материала использовали поддерживаемые в асептических условиях растения ярового рапса (*Brassica napus* L.) сорта Мария (тип “00”) селекции Национального аграрного университета УААН (контроль) и трансформанты второго поколения с геном *cup11A1* – растения линий T₂1a, T₂2в и T₂11. Растения выращивали в условиях термальной комнаты (16/8 фотопериод, +23°C) в течение двух недель в пробирках Sigma 25×150 мм (Sigmawave™) с 5мл жидкой питательной среды MS [7], в которую перед автоклавированием добавляли соответствующее количество маннитола (0,1 М/л, 0,2 М/л, 0,5 М/л) для моделирования осмотического стресса.

Определение массы растений проводили на весах Pioneer™ PA413C (Ohaus Corporation, США). Коэффициент устойчивости к маннитолу рассчитывали по формуле $R = \Delta M_C / \Delta M_O$, где ΔM_C – прирост биомассы на среде с маннитолом, ΔM_O – прирост биомассы на среде без маннитола.

Определение количества суммарного растворимого белка (СРБ) в листьях рапса осуществляли с помощью микрометода Бредфорда [8]. Анализировали образцы на фотометре BioPhotometer (Eppendorf, Германия).

Определение активности супероксиддисмутазы проводили с использованием метода фотохимического окисления нитроголубого тетразолия согласно [9].

Статистическая обработка результатов проводилась оценкой разности средних (*t*-критерий Стьюдента) [10]. Проводили три независимых эксперимента в трех повторностях. При измерениях количеств формазана для определения СОД активности было 9 повторностей.

Результаты и обсуждение

Влияние разного осмотического давления среды культивирования на рост растений рапса изучали, оценивая такие параметры как биомасса, количество СРБ и активность СОД.

Показано, что в варианте без маннитола трансгенные линии с геном *sup11A1* достоверно не отличались между собой по биомассе. Однако они достоверно превышали контрольную по исследуемому параметру (рис.1, А). Введение маннитола в питательную среду угнетающе действовало как на контрольные, так и на трансформированные растения. При концентрации маннитола 0,1 М/л значительно (на треть) снижалась продуктивность трансгенных линий. Разница между накоплением биомассы при росте на среде с 0,2 М/л маннитола и на среде с 0,1 М/л маннитола была незначительной. Увеличение содержания маннитола до 0,5 М/л достоверно снижало количество биомассы у контрольной линии по сравнению с количеством биомассы на среде без маннитола. Трансгенные линии также замедляли свой рост в условиях осмотического стресса. Однако выделялась линия Т₂1а, у которой, хотя и снижалась сырая масса по сравнению с таковой на среде без маннитола на 33%, но количество биомассы равнялось количеству биомассы у контрольной линии в условиях без действия стресса. Таким образом, растения рапса линии Т₂1а с геном *sup11A1* сохраняли способность к накоплению биомассы в условиях осмотического стресса (0,5м/л маннитола), сравнимому с таковым при росте контрольной линии без стрессового фактора.

Анализ коэффициента устойчивости к маннитолу (рис.1, Б) показал, что при осмотическом давлении, создаваемом 0,1М/л маннитола, наиболее устойчивым оказывался исходный сорт. При повышении давления до 0,2 М/л маннитола одинаковую устойчивость проявляли исходная линия и линия Т₂1а. При содержании маннитола, равного 0,5 М/л, самой устойчивой становилась линия Т₂1а, а две другие трансгенные линии были менее устойчивы к осмотическому стрессу, чем исходная линия.

Суммарный растворимый белок в растениях рапса с геном *sup11A1* в контрольном варианте опыта достоверно выше, чем в исходной линии. На средах с маннитолом СРБ трансгенных линий падал до уровня контрольных растений. Дальнейшее увеличение осмотического давления, вызванное маннитолом (0,2 М/л и 0,5 М/л), не приводило к изменениям в содержании белка у контрольной и трансгенных линий, за исключением уменьшения СРБ у линии Т₂11 при 0,5 М/л маннитола (рис.1, В).

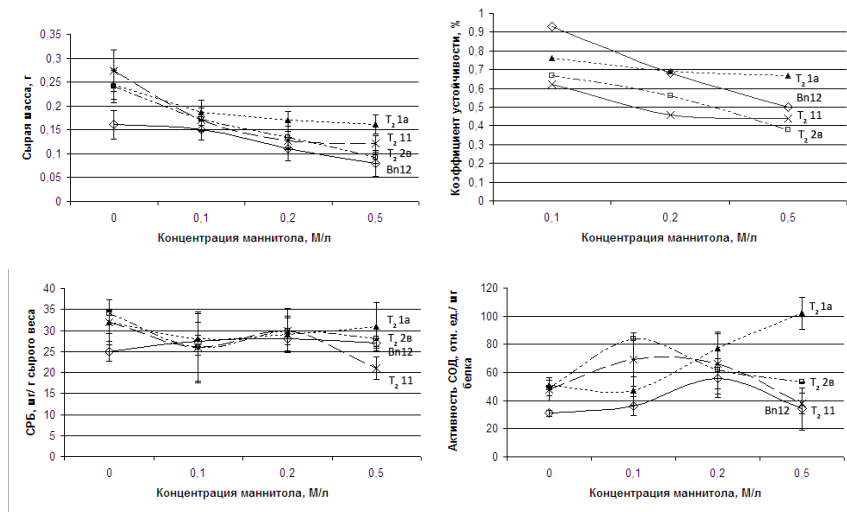


Рис.1 Характеристика роста растений рапса в условиях осмотического стресса, вызванного маннитолом: А - Биомасса; Б – Коэффициент устойчивости, В – Суммарный растворимый белок; Г – Активность супероксиддисмутазы. * – различия достоверны по сравнению с контролем при P<0,05

Активность СОД в тканях листа растений рапса с геном *sup11A1* в варианте опыта без осмотического стресса была выше, чем у растений контрольной линии. При повышении осмотического давления (до 0,1 М/л маннитолола) она существенно возрастала у трансгенных линий, особенно стремительно у линии T₂2в. При увеличении содержания маннитолола в среде до 0,2 М/л активность СОД в трансгенных линиях была сравнима с контрольной. При этом она начинала заметно повышаться у линии T₂1а. Эта же линия выделялась и по увеличению активности СОД при концентрации маннитолола в среде, равной 0,5 М/л, хотя у других линий в этих условиях активность СОД падала (рис. 1, Г).

Следует отметить, что при высоком осмотическом давлении среды (0,5 М/л маннитолола) линия рапса T₂1а характеризовалась наиболее высоким по сравнению с другими трансгенными и контрольной линией коэффициентом устойчивости к маннитолу. Активность СОД в тканях листа этой линии продолжала расти, в то время как у других она падала после повышения на средах с 0,2 М/л маннитолола. Наиболее устойчивая к осмотическому стрессу, вызванному маннитолом, линия характеризовалась самой высокой активностью СОД в наиболее жёстких условиях. Похожую картину наблюдали и на проростках трансгенного арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующего цитозольную Cu/Zn супероксиддисмутазу лапчатки *Potentilla atrosanguinea* [11] в условиях солевого (NaCl) стресса.

Выводы

Осмотический стресс, смоделированный введением маннитола в среду выращивания, угнетал рост как контрольных, так и трансгенных растений рапса. Растения с геном *sup11A1* в норме наращивали большую биомассу, накапливали большее количество суммарного растворимого белка и характеризовались повышенной активностью супероксиддисмутазы по сравнению с контролем. Увеличение осмотического давления среды приводило к уменьшению биомассы растений, снижению суммарного растворимого белка у трансгенных линий, изменяло активность супероксиддисмутазы у всех линий. Выделена линия T₂1a, которая при осмотическом стрессе (0,5 М/л маннитола) характеризовалась приростом биомассы, специфичным для контрольной линии в условиях без стресса.

Работа финансировалась в рамках целевой комплексной программы научных исследований НАН Украины “Биомасса как топливное сырье” (“Биотоплива”), проект №0111U004455.

Литература

1. <http://faostat.fao.org/site/636/default.aspx#ancor>.
2. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>.
3. Сахно Л.А., Морзун Б.В., Кваско Е.Ю., Кучук Н.В. Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения // Биотехнологія. – 2010. – Т.3, № 5. – С. 74-82.
4. Sakhno L.O., Ostapchuk A.M., Klochko V.V., Kuchuk M.V. Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450_{SCC} *sup11A1* gene// Advances in research and technology of rapeseed oil. Monograph – part III. Editor-in-Chief Edward Szlyk. - Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń. – 2011. - P. 55-59.
5. Сахно Л.А. Особенности прорастания семян растений рапса, экспрессирующих ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения// Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т.9, № 2. – С. 253-259.
6. Сахно Л.А., Остапчук А.Н., Ключко В.И., Банникова М.А., Кучук Н.В. Изменения в составе жирных кислот у трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения// Фактори експериментальної еволюції організмів. – Збірник наукових праць, за ред. Кунаха В.А. – Київ: Логос. – 2010. – Т.9. - С.327-331.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* - 1962.– V. 15.– P. 473-497.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal.Biochem.* – 1976. – V.72, N 2. – P.248 – 254.
9. Beyer W.F., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity some large consequences of minor changes in conditions// *Anal. Biochem.* – V. 161, N2. - 1987. – P. 559 – 566.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия // М.: Высш.школа. – 1990. – 352 с.

11. Gill T., Kumar S., Ahuja P.S., Sreenivasulu Y. Over-expression of *Potentilla* superoxide dismutase improves salt stress tolerance during germination and growth in *Arabidopsis thaliana* // J Plant Genet & Transgenics. – 2010. - V.1, N1. – P. 1-10.

Резюме

Осмотический стресс, смоделированный введением маннитола в среду выращивания, угнетал рост как контрольных, так и трансгенных растений рапса. Растения с геном *sup11A1* в норме наращивали большую биомассу, накапливали большее количество суммарного растворимого белка и характеризовались повышенной активностью супероксиддисмутазы по сравнению с контролем. Повышение осмотического давления среды приводило к уменьшению биомассы растений, снижению суммарного растворимого белка у трансгенных линий, изменяло активность супероксиддисмутазы у всех линий. Выделена линия T₂1a, которая при осмотическом стрессе (0,5 М/л маннитола) характеризовалась приростом биомассы, специфичным для контрольной линии в условиях без стресса.

Осмотичний стрес, змодельований додаванням манітолу в середовище вирощування, пригнічував ріст як контрольних, так і трансгенних рослин ріпаку. Рослини з геном *sup11A1* в нормі нарощували більшу біомасу, накопичували більшу кількість сумарного розчинного білку і характеризувались підвищеною активністю супероксиддимутази в порівнянні з контролем. Підвищення осмотичного тиску середовища призводило до зменшення біомаси рослин, знижувало сумарний розчинний білок у трансгенних ліній, змінювало активність супероксиддимутази у всіх рослин. Виділено лінію T₂1a, яка при осмотичному стресі (0,5 М/л манітолу) характеризувалась приростом біомаси, специфічним для контрольної лінії в умовах без стресу.

Osmotic stress, modeled by the introduction of mannitol in the culture medium, inhibited the growth of both control and transgenic rapeseed. Plants with *sup11A1* gene normally formed larger biomass, accumulated more total soluble protein and were characterized by increased superoxide dismutase activity compared with control ones. Enlargement the medium osmotic pressure led to a decrease in plant biomass of all analysed plants and total soluble protein in transgenic lines, alter the superoxide dismutase activity in all plants. Line T₂1a was revealed which characterized by biomass production during osmotic stress (0.5 M / L mannitol) equal to the control one in a stress-free conditions.

ТРЕТЬЯКОВА И.Н., ПАК М.Э.

Учреждение российской академии наук. Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск 660036. Красноярск, Академгородок, строение 50, Институт леса, culture@ksc.krasn.ru

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ *IN VITRO* У ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ

Соматический эмбриогенез – уникальная способность растительных клеток передавать имеющиеся у них генетическую информацию и давать начало новым организмам, является одним из перспективных направлений в биотехнологии микрореклонального размножения в культуре *in vitro*. Соматический эмбриогенез – це унікальна здатність рослинних клітин передавати наявні в них генетичну інформацію та давати початок новим організмам, є одним з перспективних напрямків в біотехнології мікрореклонального розмноження в культурі *in vitro*.

тический эмбриогенез - асексуальный способ размножения у голосеменных растений – был открыт 26 лет назад у *Picea abies* (Chalupa, 1985; Nakman et al., 1985). В настоящее время с помощью соматического эмбриогенеза осуществляется изучение морфогенетических программ (детерминация, дифференцировка, дедифференцировка и компетентность), а также проводится массовое тиражирование высокопродуктивных, устойчивых к фитопатогенам генетически улучшенных форм хвойных растений (Klimaszewska et al., 2001; Park, 2002; Lelu-Walter et al., 2008).

Среди хвойных, представители рода *Larix* являются наиболее распространенными лесообразующими древесными видами на территории России (Ирошников, 2004). Занимая обширный ареал, виды рода *Larix* обладают чрезвычайно высокой пластичностью вегетативных и генеративных органов, что отличает лиственницу от других представителей семейства *Pinaceae* (Третьякова и др., 2006). Благодаря пластичности виды *Larix* хорошо вводятся в культуру *in vitro*. Соматический эмбриогенез был получен у *L. decidua* (von Aderkas et al., 1990), *L. kaempferri* (Lelu-Walter, Pagues, 2009) и гибридов *L. x occidentalis*, *L. x eurolepis* (*L. decidua* x *L. kaempferri*) (Klimaszewska, 1989; von Aderkas et al., 1990; Lelu, 1994), *L. x marscinlinsii* (*L. kaempferri* x *L. decidua*) (Lelu-Walter, Pagues, 2009). Первая работа по инициации соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской была опубликована нами в 2008 году (Белоруссова, Третьякова, 2008). В ней впервые было показано становление соматических клеток зародыша под влиянием гормонов на путь эмбриогенеза при инициации и пролиферации морфогенного каллуса.

Однако, несмотря на активные исследования по соматическому эмбриогенезу у лиственницы сибирской, регенерация растений путем соматического эмбриогенеза все еще остается не решенной для данного вида. Критическим моментом явился процесс вызревания соматических зародышей, на котором эмбриональное развитие останавливается.

Цель настоящей работы заключалась в получении клеточных линий и цитозмбриологическом контроле процесса соматического зародышей лиственницы сибирской.

Материал и методы

Объектом исследований служили деревья лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), произрастающие на территории дендрария Института леса СО РАН (г. Красноярск) и в районах Хакасии.

В качестве материала для индукции соматического эмбриогенеза были взяты изолированные зиготические зародыши на стадии глобулярного зародыша, инициации и развития семядолей с июля по август в 2007-2011 гг. Семена стерилизовали 5% спиртовым раствором йода, промывали в стерильной дистиллированной воде, мегагаметофиты обрабатывали перекисью водорода, извлекали зародыши и переносили их на разработанную нами питательную среду АИ (патент). В качестве регуляторов роста использова-

ли 2.4-Д (2 мг/л) и БАП (1 мг/л). В среду добавляли агар – 7 г/л. В охлажденную питательную среду после автоклавирования добавляли L-глутамин и аскорбиновую кислоту. Культивирование проводили в темноте при $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Для пролиферации каллуса и образования эмбриональной массы (ЭМ) применяли базовую среду, с уменьшенной концентрацией цитокининов (0.5 мг/л) и сахарозой (20 г/л). Пересадки на свежую питательную среду проводили каждые 2 нед. Кусочки активно растущей эмбриональной массы, весом 100-300 мг переносили на безгормональную базовую АИ среду с активированным углем (10 г/л) и повышенным содержанием сахарозы (34 г/л) для остановки пролиферации и перехода соматических зародышей к вызреванию. Экспланты культивировали в течение одной недели на свету малой интенсивности ($10\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) при 16-ти часовом фотопериоде. Эксперименты по созреванию соматических зародышей выполняли на базовой среде АИ, содержащей сахарозу (40-60 г/л), АБК (16-32 мг/л), ИМК (0.2 мг/л) и ПЭГ (5-10%) в различных вариациях. В качестве желирующего агента использовали Gelrite (3-4 г/л). Культивирование осуществляли на свету малой интенсивности ($20\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$) при 16-ти часовом фотопериоде, при $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Для прорастания соматических зародышей листовницы использовали базовую питательную среду АИ, свободную от растительных регуляторов роста, дополненную активированным углем (1г/л). Полученные растения-регенеранты помещали в увлажненную эпокочву (вермикулит:торф=1:1).

Для проведения цитологического анализа использовали давленные препараты, окрашенные сафранином с добавлением метиленового синего. Просмотр образцов осуществляли на микроскопе «МИКРОМЕД-6». Для статистической обработки данных использовали программу Microsoft Excel 2003.

Результаты и обсуждение

Морфологические наблюдения за формированием каллуса у листовницы сибирской показали, что его индукция происходила на 8-14-е сутки культивирования. Образование каллуса шло по всей поверхности экспланта. Каллус имел белый цвет и рыхлую или либо твердую структуру. На 25-35 сутки культивирования у 20% эксплантов листовницы сибирской на среде с уменьшенным содержанием цитокининов в каллусе наблюдалось образование эмбриональной массы.(ЭМ)

Высокая пролиферационная активность ЭМ была отмечена у генотипа 1С, у которого в разные годы (2009-2011) было получено семь клеточных линий (Кл) из них шесть в результате свободного опыления, а седьмая в результате контролируемого опыления генотипов 1С x 2С.

Полученные Кл листовницы сибирской отличались между собой по пролиферационной активности, а также по количеству незрелых соматических зародышей внутри ЭМ. За шесть нед. культивирования суммарный вес ЭМ от одного экспланта у разных Кл листовницы сибирской составил

от 24 до 80г. За 10 нед. культивирования вес ЭМ достигал 570г, у Кл 1-7 он составил меньшую величину. Число соматических зародышей в 100 мг ЭМ варьировало от 210 шт (Кл3) до 410 шт (Кл7). Спада пролиферационной активности ЭМ у Кл лиственницы сибирской в течение двух- трех лет культивирования не происходило. За 1 год культивирование вес ЭМ составил 3.5 кг. В длительно пролиферирующей ЭМ (более трех лет) число соматических зародышей уменьшилось до 250 шт.

Цитозэмбриологический контроль соматического эмбриогенеза показал, что формирование ЭМ у всех клеточных линиях шло одинаково и начиналось с удлинения клеток экспланта и их неравного деления. Именно неравное деление клеток явилось ключевым моментом, запускающим весь процесс соматического эмбриогенеза. В результате, происходило образование эмбриональной трубки с прилегающей на другом конце эмбриональной инициальной. Подобно зиготическому эмбриогенезу, эмбриональная инициаль претерпевала последовательные деления и формировалась глобула зародыша. Ранние соматические зародыши состояли из эмбриональных (меристематических клеток округлой формы) и суспензорных (сильно вытянутых) клеток. Через 30-40 дней в ЭМ каллусов лиственницы сибирской обнаруживались соматические зародыши на ранних стадиях эмбрионального развития (глобулярные и торпедообразные зародыши).

Введение каллусов с ЭМ лиственницы сибирской на среду АИ, содержащую 32мг/л АБК, 10% ПЭГ, 40 г/л сахарозы и 4 г/л Gelrite показало, что зародыши приобретали торпедообразную структуру. Происходила дифференциация тканей зародыша. Через две недели культивирования соматические зародыши увеличивались в размерах. Длина их составила 0.7, ширина 0.4 мм. Происходили закладка и формирование семядольного кольца. На 50 сутки культивирования на среде для созревания соматические зародыши достигали размера 1.1 – 1.5 мм, имели хорошо выраженную биполярную структуру тела зародыша и полностью сформированные семядоли.

При перенесении соматических зародышей с хорошо развитыми семядолями на безгормональную среду АИ для прорастания через 7-10 дней культивирования происходило удлинение гипокотили и развитие семядолей. Еще через несколько дней наблюдалось развитие корешка (на свету гипокотиль и корешок приобретали красный оттенок) Появление эпикотилия происходило через две-три недели культивирования на среде для прорастания. Соматические зародыши с хорошо развитым корешком и эпикотилем мы считали полноценными растениями и переносили в эпокочву, где происходил рост соматических сеянцев.

В проведенных нами исследованиях способностью к формированию ЭМ обладали 3% генотипов лиственницы сибирской. Влияние генотипа также наблюдалось при переходе к созреванию соматических зародышей. В наших экспериментах у полученных клеточных линий лиственницы сибирской соматические зародыши активно созревали, формируя полноцен-

ные растения. Ранее, в литературе указывалось, что соматический эмбриогенез у видов хвойных идет под строгим генетическим контролем. Только экспланты отдельных деревьев-доноров обладают способностью образовывать соматические зародыши и растения (MacKay et al., 2006; Pullman, 2007; Carnerous et al., 2009). Следовательно, эмбриогенные клеточные культуры можно получить только с ограниченного числа деревьев. Не исключено, что такими деревьями – донорами могут быть индивидуумы с высоким репродуктивным потенциалом

Таким образом, нами впервые на среде АИ были получены семь клеточных эмбриогенных линии лиственницы сибирской, способных длительное время (более трех лет) продуцировать массовые соматические зародыши и растения. Морфогенетическая программа развития зародышей регулировалась фитогормонами. Запуск ассиметричного деления шел под действием ауксина и цитокинина в определенных концентрациях и разным их соотношении друг с другом. При формировании глобулярных зародышей концентрация цитокининов уменьшалась в 2 раза. Переход к стадии дифференциации и запрограммированной клеточной смерти суспензора осуществлялся на безгормональной среде АИ. Стадия вызревания соматических зародышей лиственницы зависела от присутствия АБК в питательной среде, а также снижения осмотического потенциала питательной среды, которое обычно достигается путем повышения концентрации сахарозы или желирующего агента, или применением полиэтиленгликоля (Stasolla et al, 2003).

Таким образом, в России нами впервые были получены пролиферирующие клеточные линии, а также соматический эмбриогенез и растения – регенеранты у лиственницы сибирской. Процесс созревания соматических зародышей успешно шел на среде АИ, дополненной АБК, ИМК, ПЭГ и Gel-gite.

Исследования были проведены в рамках выполнения научно-исследовательской работы «Генетические исследования лиственницы сибирской» по тематическому плану Сибирского федерального университета.

Литература

1. Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. 2008. Т.39, № 2. С. 1-10.
2. Ирошников А.И. Вицы России. Биоразнообразие и селекция. М.: ВНИИЛМ. 2004. 182с..
3. Третьякова И.Н., Баранчиков Н., Буглова Л.В., Белоруссова А.С., Романова Л.И. Особенности формирования генеративных органов лиственницы сибирской и их морфогенетический потенциал // Успехи современной биологии 2006. Т. 126. № 5. С. 472-480.
4. Carneros E., Celestino C., Klimaszewska K., Park Y.-S., Toribio M., Bonga J.M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2009. V.98. P.165-178

5. *Chalupa W.* Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) // Karst. Com. Inst. For. Cech. 1985. V. 14. P. 57-63.

6. *Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S.* The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce) // Plant Sci. 1985. V. 38. P. 53-59.

7. *Klimaszewska K., Park Y.S., Overton C., MacEacheron I., Bonga J. M.* Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. // *In vitro* Cell. Dev. Biol.–Plant. 2001. V. 37 P. 392-399.

8. *Lelu M.A., Klimaszewska K., Charest P.J.* Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix* // Can. J. For. Res. 1994. V. 24. № 1. P. 100-106.

9. *Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K.* Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2008. V.92. P. 31–45.

10. *Lelu-Walter M-A., P^ˆagues L.E.* Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinii*). Perspectives for breeding // Ann. For. Sci. 2009 V.66 P. 104 -114.

11. *MacKay J.J., Becwar M.E., Park Y.-S., Corderro L.P., Pullman G.S.* // Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and

12. *Park Y.S.* Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations // Ann. For. Sci. 2002.V. 59. P. 651-656.

13. *Pullman G.S., Skryabina A.* (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. Plant Cell Rep 26: 873–887.

14. *Stassola C., van Zyl L., Egertsdotter D.,W., Sederoff R.* The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos // Plant physiology. 2003. V. 131. P. 49-6

Резюме

В результате различных манипуляций со средой, под действием регуляторов роста, а также желирующих и осмотических агентов у лиственницы сибирской получены длительно пролиферирующие эмбриогенные клеточные линии, в которых шло образование соматических зародышей, а затем растений- регенерантов. Успех соматического эмбриогенеза зависел от генотипа дерева донора.

The long proliferative cell lines of *Laris sibirica* were getting as a result of different manipulation with medium under influence of growth regulators, gelatins and osmotic agents. In whose lines formation of somatic embryos and plantlets is occurred. The success of somatic embryogenesis is due to of tree-genotypes.

ФЕДОРЧУК В.В., ЄМЕЦЬ А.І.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123, Україна. E-mail: nikafedorchuk@gmail.com

ВИКОРИСТАННЯ ІНГІБІТОРУ Ca^{2+} -КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНкіНАЗ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АГРОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН

Застосування методів генетичної інженерії рослин дозволяє, змінюючи їх геном, отримувати нові сорти рослин зі стійкістю до різних біотичних та абіотичних факторів. Проте, незважаючи на велику кількість методів переносу рекомбінантної ДНК в рослинні клітини, як прямих, так і опосередкованих, отримання фертильних трансформованих рослин залишається складним та довготривалим процесом. Відомо, що різні сорти рослин і, навіть експланти одного і того ж сорту, потребують підбору індивідуальних умов трансформації. Отже, на сьогоднішній день, вдосконалення методів генетичної трансформації та пошук нових методів підвищення ефективності отримання трансгенних рослин залишається актуальним питанням.

Нещодавно було показано, що використання інгібіторів серин-треонінових протеїназ та протеїнофосфатаз під час агробактеріальної трансформації значно підвищує ефективність трансформації ембріодів сосни білої [1]. Зокрема, було встановлено, що при додаванні трифлюоперазину в концентрації 150 мкМ до середовища для ко-культивування із агробактерією частота трансформації експлантів збільшувалась у 2.5 рази у порівнянні з контрольними зразками. Було зроблено припущення, що трифлюоперазин інгібує Ca^{2+} -кальмодулін-залежну стимуляцію 3'-5' фосфодіестерази циклічних нуклеотидів яка, в свою чергу, відіграє важливу роль в захисних реакціях рослини під час агробактеріальної інфекції.

Відомо, що протеїнази є ферментами, які каталізують реакцію перенесення кінцевого залишку фосфату із АТФ на залишки серину, треоніну та тирозину білкової молекули [2], а інгібітори відповідних типів протеїназ є ефективним методом встановлення їх функціональної ролі. Таким чином, на сьогодні актуальним питанням залишається дослідження впливу інгібіторів різних типів протеїназ на ефективність трансформації рослин.

В даній роботі нами було досліджено вплив різних концентрацій інгібітору серин/треонінових протеїназ, зокрема Ca^{2+} -кальмодулін залежної протеїнази, на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації дводольних рослин.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були листові експланти асептичних рослин тютюну (*Nicotiana tabacum*). Стерилізацію насіння проводили в 5%-му розчині гіпохлориду натрію з наступним триразовим відмиванням у стерильній дистильованій воді. Далі пророщування насіння та вирощування рос-

лин проводили на без гормональному середовищі МС [3] протягом одного місяця.

Для встановлення регенераційного потенціалу попередньо пошкодженні листові диски тютюну висаджували на середовище МС, що містило 1 мг/л 6-бензилоамінопурина (Sigma, США) та 0,1 мг/л нафтилоцтової кислоти (Sigma, США). Для цього на кожен чашку Петрі висаджували по п'ять листових дисків, загалом було проаналізовано 125 експлантів. Ефективність регенерації визначали через три тижні після початку культивування як співвідношення експлантів, на яких відбувалася регенерація пагонів, до загальної кількості висаджених експлантів.

Для агробактеріальної трансформації використовували експланти молодих листочків *N. tabacum* розміром 1,5-2,5 см². Для дослідження впливу інгібіторів протеїнкіназ на підвищення ефективності агробактеріальної трансформації у роботі використовували інгібітор Са²⁺-кальмодулін залежної протеїнкінази, трифлюоперазин (Sigma, США), який додавали до середовища для ко-культивування із агробактерією. Маточний розчин інгібітору (10 мМ) готували у дистильованій воді та зберігали в морозильній камері при -20°C. В роботі було вивчено вплив широкого діапазону концентрацій трифлюоперазину: від 10 до 300 мкМ. Також було протестовано тривалість обробки інгібітором: від 10 хв до 48 год. Для агробактеріальної трансформації було використано штам LBA4404, що містив векторну конструкцію pBIN20, яка несе селективний маркерний ген *nptII*, що забезпечує стійкість до канаміцину. Всі експерименти було проведено в трьох повторностях.

Результати та обговорення

Оскільки ефективність генетичної трансформації, зокрема, агробактеріальної, залежить від типу експлантів певного виду рослин, обраних для роботи, та їх здатності до ефективної регенерації пагонів чи повноцінних рослин, нами попередньо було оцінено регенераційний потенціал листових експлантів тютюну. Було встановлено, що ефективність регенерації пагонів з листових дисків становить 97 %. В середньому на кожному окремому експланті *in vitro* формувалося 4 рослини-регенеранти.

Нами було проведено серію експериментів по підборі умов агробактеріальної трансформації штамом LBA4404, що містив векторну конструкцію pBIN20, та визначено найбільш ефективну методику генетичної трансформації. Для цього було підібрано відповідну оптичну щільність агробактерії та тривалість її ко-культивування з екплантами. Було встановлено, що найефективніший час ко-культивування вихідного матеріалу з бактерією становить 48 год, при цьому частота регенерації пагонів з експлантів на селективному середовищі, яке містило 50 мг/л канаміцину, досягала 90%

В наступній серії експериментів було досліджено вплив різних концентрацій інгібітору Са²⁺-кальмодулін-залежної протеїнкінази, трифлюоперазину, на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Було виявлено, що трифлюоперазин в високих мікромолярних концентра-

ціях (200 та 300 мкМ) призводив до некрозу листових дисків тютюну через 7 діб після трансформації, тоді як після додавання до середовища для кокультивування трифлюоперазину в більш низьких концентраціях: 50, 100 та 150 мкМ, частота трансформації складала 50, 40 та 20% відповідно у порівнянні із контролем.

Нами було встановлено, що найбільш ефективними концентраціями інгібітору протеїнкінази для підвищення ефективності агробактеріальної трансформації листових експлантів тютюну був трифлюоперазин в концентраціях 10 та 25 мкМ. Показано, що частота трансформації за його використання підвищувалася до 98 %, тоді як у контролі цей показник був в межах 90%. На наступному етапі досліджень планується підтвердити трансгенну природу регенерованих рослин за допомогою молекулярно-біологічного аналізу з використанням методу ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції).

Висновки. У результаті проведених експериментів нами було продемонстровано, що використання інгібітору серин-треонінових протеїнкіназ, зокрема, трифлюоперазину, може суттєво підвищувати ефективність агробактеріальної трансформації листових експлантів *N. tabacum*.

Робота була виконана в рамках наукового проекту (№33/10А) „Покращення ефективності трансформації рослинних клітин, опосередкованої *Agrobacterium tumefaciens*, за допомогою інгібіторів протеїнкіназ” цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України „Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”.

Література

1. Tang W., Lin J., Newton R. Okadaic acid and trifluoperazine enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in eastern white pine // Plant Cell Rep. – 2007. – Vol. 26. – P. 673 – 683
2. Wang H., Chevalier D., Larue C., Cho S.K., Walkera J.C. The protein phosphatases and protein kinases of *Arabidopsis thaliana* // Arabidopsis Book. – Rockville, 2007. – P. 1–38.
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

Резюме

Досліджено вплив різних концентрацій інгібітору Ca^{2+} -кальмодулін залежної протеїнкінази, трифлюоперазину, на ефективність агробактеріальної трансформації листових експлантів *Nicotiana tabacum*. Встановлено, що додавання трифлюоперазину в концентраціях 10 та 25 мкМ до середовища для кокультивування із агробактерією призводить до підвищення частоти трансформації до 98 %.

Исследовано влияние разных концентраций ингибитора Са-кальмодулин зависимой протеинкиназы, трифлюоперазина, на эффективность агробактериальной трансформации листовых эксплантов *Nicotiana tabacum*. Установлено, что добавление трифлюоперазина в концентрациях 10 и 25 мкМ в среду для кокультивирования с агробактерией приводит к повышению частоты трансформации до 98 %.

The influence of different concentrations of inhibitor of Ca-calmodulin dependent protein kinase, trifluoperazine, on efficacy of *Agrobacterium*-mediated transformation of

leaf explants of *Nicotiana tabacum* was investigated. It was established that the addition of 10 and 25 μM trifluoperazine into the medium for co-cultivation with *Agrobacterium* led to increasing the transformation rate up to 98%.

**ФОМЕНКО Т.И., КУЗОВКОВА (ЛЕНЕЦ) А.А., БЕРДИЧЕВЕЦ Л.Г.,
РЕШЕТНИКОВ В.Н.**

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: fioraia@nm.ru

ЭФФЕКТ РАЗНОУРОВНЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ β -1,4-ГЛЮКАНАЗЫ В ЛИСТОВЫХ ТКАНЯХ *NICOTIANA TABACUM* НА КАЛЛУСОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ И МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ

Благодаря использованию растений-мутантов и трансгенных растений, в последние 20 лет значительно продвинулось понимание механизмов различных физиологических процессов растений, например, фотосинтеза и индуцированной резистентности к патогенам [1]. Вместе с тем, на трансгенных растениях удобно исследовать и проблему влияния чужеродного гена как на генотип и фенотип растения в целом, так и на изменение экспрессии отдельных растительных генов. Подобные работы единичны и поэтому весьма актуальны. Трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие бактериальный ген *cel7*, явились удобной моделью не только для изучения механизмов устойчивости растений к грибам [2], но и влияния на трансген гетерологичного окружения. Целью наших исследований был анализ экспрессии бактериальной β -1,4-глюканазы в листовых тканях табака, а также оценка ее влияния на фитогормональный статус растения и, как следствие, на их каллусогенную активность и морфогенный потенциал. Каллусная ткань растений представляет собой совокупность недифференцированных клеток, которые в определенных условиях могут дать начало клонам дифференцированных клеток. Это означает, что клетки каллусной ткани являются носителями определенных эпигенетических изменений в геноме, отличных от таковых в дифференцированных клетках, и экспрессия трансгена в таких условиях может модифицироваться.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 3 линии трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие бактериальный модифицированный ген *cel7* из анаэробной грамположительной термофильной бактерии *Clostridium thermocellum*. Ген кодирует фермент β -1,4-эндоглюканазу. В растениях ре2 ген *cel7* контролируется слабым конститутивным промотором Tr2⁺ гена нопалинсинтетазы и сильным конститутивным промотором 35S вируса мозаики цветной капусты, а также последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. В линии ре3 ген *cel7* об-

ладает слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтетазы и последовательностью, кодирующей сигнальный пептид экстенсина моркови. Растения re4 несут ген *cel7* под слабым конститутивным промотором Tr2' гена нопалинсинтетазы. Данные растения были получены к.б.н. Василевко В.Т. под руководством проф. Пирузян Э.С. на базе Института молекулярной генетики РАН (г. Москва) [2]. Растения *in vitro* выращивали на 1/2 среде Мурасиге – Скуга (МС) при температуре 22°C, освещенности 4 тыс. лк. Световой день – 16 ч. Для анализов использовали листья 40-дневных растений. Каллусообразование из листовых эксплантов инициировали на средах МСА (1мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП), МСВ (3мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП) и RМКУ (1мг/л αНУК, 1мг/л кинетина), основу которых составляла среда МС. Активно растущие каллусы переносили на среду для индуцирования органогенеза – среда МС с 0,1 мг/л ИУК и вариациями БАП (2 мг/л – среда МС1, 1 мг/л БАП – среда МСII). Культивирование проводили в течение 4-х недель в термостате при 24,5°C. Частоту регенерации оценивали каждую неделю. Экспрессию в растительных тканях бактериального гена *cel7* тестировали по уровню активности его белкового продукта методом выявления в полиакриламидном геле изоформ глюканаза по Schwarz et al. [3] с нашими модификациями.

Результаты и обсуждение

Наши наблюдения и проведенный анализ морфометрических параметров растений-рекомбинантов показали, что трансгенные растения отличались замедленным в сравнении с контролем ростом. Очевидно, что такие морфо-физиологические изменения были опосредованы активной экспрессией трансгена в геноме табака. Действительно, в листьях табака re2 и re3 обнаружены глюканазы, термостабильные при +80°C и проявляющие максимальную активность при +60°C, что характерно исключительно для термостабильного бактериального модифицированного фермента. При этом активность глюканазы на мг внесенного в гель белка в линии re3 была существенно выше, чем у рекомбинантов re2. Контрольные растения, а также линия re4 не проявляли глюканазную активность при данных условиях тестирования даже при 20-кратном увеличении концентрации белка в пробе. Понятно, что контрольные растения табака не должны обладать бактериальной термостабильной глюканазной активностью, а растительные глюканазы при данной температуре полностью ингибируются. Одной из вероятных причин отсутствия в растениях линии re4 активности β-1,4-глюканазы может быть замолкание трансгена. Данный феномен отмечен с конца 80-х - начала 90-х годов, при создании первых трансгенных растений. Позже было установлено, что феномен замолкания генов, хотя и может наследоваться при половом размножении и последующем развитии семени, является обратимым и может находиться под контролем факторов развития [4].

Известно [5], что продуктами гидролиза глюканаз являются олигосахарины, которые в концентрациях 10⁻⁶ М способны имитировать

действие ауксинов, в частности, увеличивать активность целлюлаз, стимулировать растяжение клеточной стенки и удлинение растения, индуцировать ризогенез. Возможные изменения в эндогенном балансе трансгенных растений, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы, нами были проанализированы с помощью физиологического теста. Листовые экспланты контрольных и 3-х линий рекомбинантов культивировали на среде МС, не содержащей гормонов. После 4 недель культивирования на листовых эксплантах всех типов растений наблюдалось образование корней. При этом, частота ризогенеза в контроле (66,7%) была в 2 раза выше, чем у линии ре2 (33,3%), и сравнима с таковой у линии ре4. В то же время линия ре3 характеризовалась более интенсивной инициацией ризогенеза (на 73,3%), чем контроль. Полученные данные являются неоднозначными. Можно предположить, что у линии ре3, отличающейся самой высокой глюканазной активностью, эндогенный баланс несколько сдвинут в сторону ауксинов, и наблюдаемое усиленное корнеобразование может быть вызвано стимулирующим эффектом олигосахаридов, продуктов гидролиза бактериальной глюканазы. Линия ре2, по-видимому, обладает особым фитогормональным статусом, определяющим существенное снижение ризогенеза по сравнению с контролем и линией ре3, при том, что характеризуется довольно высокой бактериальной глюканазной активностью. Линия ре4, которая не проявляет бактериальной активности β -1,4-глюканазы, возможно, вследствие замолкания гена, имеет тот же фитогормональный фон, что и контрольные растения.

Обратимость замолкания трансгена была выявлена нами при анализе экспрессии трансгена *cel7* в дедифференцированной (калусной) ткани, полученной из листовых дисков от растений линии ре4. В отличие от листовой ткани, в каллусах линии ре4 (при 20-ти-кратном концентрировании белка) была обнаружена активность термостабильных бактериальных глюканаз. Следует отметить, что калусная ткань линий ре2 и ре3 сохраняла данную активность. Что касается каллусогенной активности листовых эксплантов трансгенных растений при культивировании на разных селективных средах, то у линий ре3 и ре4 на средах RMKU и MCA она была сравнима с таковой контрольных, тогда как прирост калусной массы на листовых дисках ре2 был достоверно ниже. Добавление в среду культивирования МСВ 3 мг/л ИУК (против 1 мг/л ИУК в MCA и 1 мг/л α НУК RMKU) способствовало увеличению каллусогенной активности как в контрольном варианте, так и у линии ре3. В то же время у линий ре2 и ре4 наблюдалась более низкая, чем в контроле каллусогенная активность. Таким образом, особый фитогормональный статус рекомбинантов ре3 никак не сказался на их каллусогенной активности по отношению к контролю, даже при увеличении в 3 раза содержания ауксинов в среде. При этом линия ре2 при всех исследуемых концентрациях экзогенных ауксинов демонстрировала ингибирование инициации каллусообразования, что косвенно может говорить

об очень низком содержании в клетках ре2 эндогенных ауксинов, который даже вкуче с экзогенными фитогормонами был недостаточен для нормального каллусообразования. Линия ре4 с нестабильной экспрессией гена *cel7* характеризовалась такой же нестабильной каллусогенной активностью на средах с разной концентрацией ауксинов.

Интересно, что активность бактериальной глюканазы, индуцированная в трансформантах ре4 при каллусогенезе, сохранялась, но на низком уровне, и в редифференцированных клетках адвентивных побегов, образованных при переносе каллуса со среды RMKU на морфогенные среды МС1 и МСII. Адвентивные побеги ре2 и ре3 также проявляли данную активность. Что касается уровня морфогенного потенциала исследуемых трансгенных растений табака, то после недели культивирования во всех вариантах, включая контроль, наблюдалось нарастание каллусовой массы без инициации побегообразования, что связано с накоплением в клетках ауксина при наращивании каллуса. Через 2 недели культивирования на каллусных тканях контроля и трансформантов отмечена регенерация побегов, но частота регенерации была не одинаковой и зависела как от типа растения, так и от среды культивирования. Так, при культивировании каллусных тканей на среде МС1 только у линии ре3 частота регенерации не отличалась от контрольного варианта и составляла 14,3%, тогда как у остальных линий трансгенных растений морфогенная активность была значительно выше (до 33,4%). Подобная зависимость наблюдалась и через 3 недели культивирования на фоне общего увеличения морфогенной активности. Через 4 недели культивирования на среде МС1 частота регенерации линии увеличилась до 95%, и у линий ре2 и ре3 она была выше, а у линии ре4 ниже, чем в контроле. Данный факт подтверждает особый фитогормональный статус трансгенных растений табака. Об этом факте говорит и изменение морфогенной активности каллусных тканей трансформантов при увеличении в среде культивирования концентрации БАП до 2 мг/л. Увеличение содержания в среде экзогенного цитокинина повлияло на морфогенную активность как контрольного, так и трансгенных растений табака, экспрессирующих ген бактериальной β -1,4-глюканазы. Частота регенерации в контроле через 2 недели культивирования на среде МСII была в 1,5 раза выше, чем на среде МС1.

У трансформантов наблюдали обратную зависимость. Морфогенная активность у линии ре2 в течение всего периода культивирования на среде МСII была ниже, чем на среде МС1. У линии ре4 на начальном этапе культивирования частота регенерации на среде МСII была выше, чем на среде МС1, и выше, чем в контроле, но через 4 недели культивирования наблюдалась обратная зависимость. Морфогенная активность каллусной ткани линии ре3 на среде МСII через две недели культивирования была ниже, чем на среде МС1. При дальнейшем культивировании на среде МСII частота регенерации у этой линии постепенно увеличивалась и достигала 100%, как

и в контрольном варианте. Таким образом, на среде с более высоким содержанием цитокинина у всех исследуемых трансформантов отмечена общая тенденция снижения морфогенной активности каллусов.

Выводы

В ходе тестирования активности бактериального гена *cel7* в гетерологичном окружении обнаружен феномен эпигенетической регуляции экспрессии трансгена в одной из линий трансгенных растений табака, в линии ре4. Какие именно эпигенетические изменения произошли сначала в геноме листовых, а потом каллусных клеток табака, мы можем только предполагать. Возможно, репрессия гена *cel7* в растениях табака обусловлена присутствием множественных копий трансгена и гомологичных ему последовательностей в растительных генах, которые могут взаимодействовать между собой, образуя гибридную ДНК, и таким образом корепрессировать друг друга. Другой способ репрессии генов определяется хроматиновым состоянием генных локусов, в которые встраивается трансген, и их позицией в хромосоме и/или ядре. В этом огромная роль принадлежит процессам модификации гистонов. Существует и пост-транскрипционная репрессия генов [6].

Разноуровневая экспрессия бактериальной β -1,4-глюканазы в листовых тканях табака сказалась на фитогормональном статусе этих тканей и далее, как следствие, отразилась на их каллусогенной активности и морфогенном потенциале. Особым фитогормональным фоном обладают все исследуемые линии трансформантов. У линии ре3 фитогормональный баланс сдвинут в ауксиновую сторону, что объясняет усиленное корнеобразование у этих растений. При этом каллусогенная активность не отличалась от контрольной. Измененный фитогормональный статус трансформантов ре2 (вероятно, с низким содержанием эндогенных ауксинов) привел к ингибированию ризогенеза и каллусообразования. Линия ре4 с нестабильной экспрессией гена *cel7* характеризовалась такой же нестабильной каллусогенной активностью на средах с разной концентрацией ауксинов и уровнем ризогенеза, характерным для контроля. Частота регенерации адвентивных побегов на каллусных тканях трансформантов на морфогенных средах была не одинаковой и зависела как от типа растения, так и от среды культивирования. Морфогенная активность линии ре3 на среде с 1 мг/л цитокинина была сравнима с контролем, а линий ре 2 и ре 4 значительно выше. Увеличение содержания в среде экзогенного циткинина повлияло на морфогенную активность растений, увеличив частоту регенерации в контроле и уменьшив – в трансгенных растениях.

Литература

1. Бурьянов Я.И. Успехи и перспективы генно-инженерной биотехнологии растений // Физиология растений.– 1999.– Т.46, №6.– С.930-944.

2. *Василевко В.Т.* Модель переноса гена бактериальной полиглюкангидролазы (b-1,4-глюканаза) в растения табака как способ защиты растений от фитопатогенов / Диссерт. на соискан. уч. степ. канд. био. наук.– Минск.– 2002.–84 с.

3. *Schwarz W.H., Bronnenmeier K., Grabnitz F., Staudenbauer W.L.* Activity staining of cellulases in polyacrylamide gels containing mixed linkage b-glucans // *Analytical biochemistry.*– 1987.– V.164.– P.72-77.

4. *Flavell R.B.* Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication // *PNAS USA.*– 1994.– V.91.– P.3490-3496.

5. *Fry S.C.* Cellulases, hemicelluloses and auxin-stimulated growth: a possible relationship // *Physiol.Plantar.*– 1989.– V.75.– P.532-536.

6. *Назаренко С.А.* Эпигенетическая регуляция активности генов и ее эволюция // Из книги: Эволюционная биология. Материалы II Международной конференции “Проблема вида и видообразование”.– Томск: Томский государственный университет.– 2002.– Т. 2.– С. 82-93.

Резюме

Исследовано влияние гетерологичного окружения на экспрессию в растениях трансгена, кодирующего бактериальную β -1,4-глюканазу. Дана оценка каллусогенной активности и морфогенного потенциала листовых тканей табака с измененным фитогормональным статусом.

The influence of heterological environment on the expression of the transgene coding bacterial β -1,4-glucanase in plants is investigated. The estimation of callusogenic activity and morphogenic potential of tobacco leaf tissues with the changed phytohormonal status is given.

**ЮРКОВА И.Н., БУГАРА И.А., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., ТАЙКОВА В.П.,
ЧМЕЛЕВА С.И., СИДЯКИН А.И.**

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского,
Украина, 95007, Симферополь, пр. Вернадского, 4, e-mail: nanosilver@rambler.ru*

КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ *ASTRAGALUS DASYANTHUS* (PALL.) КАК ИСТОЧНИК ОРГАНИЧЕСКОГО СЕЛЕНА

Астрагал шерстистоцветковый *Astragalus dasyanthus* Pall. является ценным лекарственным растением, произрастающим в дикой природе. Некогда широко распространенный в степных и лесостепных районах Украины вид сегодня занесен в Красную книгу Украины, Европейский Красный список и Красный список Международного Союза охраны природы [1]. Все части растения содержат тритерпеновые гликозиды, флавоноиды, полисахариды, дубильные вещества, аминокислоты, витамины, а также макро- и микроэлементы. Важной особенностью этого вида, так же как и других видов рода *Astragalus*, является способность избирательно накапливать органически связанный селен (селенметионин) в больших количествах (до 15 г Се/кг а.с.в.).

Спектр действия селена в организме широк. Он выполняет каталитическую, структурную и регуляторную функции, взаимодействует с вита-

минами, участвует в окислительно-восстановительных процессах, обмене жиров, белков и углеводов является сильнейшим антиоксидантом, препятствует развитию онкологии, аллергии, воспалительных процессов [2]. Основными путями поступления селена в организм являются продукты животного и растительного происхождения, к которым относятся растения-концентраторы селена. Самая высокая биодоступность селена в составе различных растительных источников [3].

Однако во многих регионах, в том числе в Украине, в почвах сельскохозяйственного назначения фиксируется дефицит селена [4]. Этот дефицит увеличивается по мере внесения в почву серосодержащих удобрений. Из растений-концентраторов селена первое место занимают виды рода *Astragalus*, к которому относится астрагал шерстистоцветковый, внесенный в государственную Фармакопею как официальное лекарственное растение [5]. В связи с этим актуальным является получение клеточной биомассы астрагала, обогащенной биологически доступными формами органического селена.

Целью настоящей работы было исследование ростовых характеристик и закономерностей накопления селена в длительно пассированных культурах астрагала шерстистоцветкового.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили калусные культуры астрагала шерстистоцветкового *Astragalus dasyanthus* Pall. III-IV пассажа. При выполнении работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [6]. Калусные культуры IV пассажа выращивали в течение 13 недель на модифицированной агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной фитогормонами (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой – 2,0 мг/дм³, 6-бензиламинопурином – 0,5 мг/дм³, кинетином – 0,5 мг/дм³ [7]) и селеном. Источником селена в питательных средах служил селенит натрия (Na₂SeO₃) «ч.д.а.» в концентрациях 5-20 мг Se/дм³. В первой серии калусные культуры III пассажа пассировали на питательную среду, содержащую селен в тех же концентрациях, что и в предыдущем пассаже: контроль (без селена), 5, 10 и 15 мг Se/дм³; во второй – использован метод повышения концентрации селена. В этой серии калусные культуры астрагала пассировали на питательную среду, содержащую на 5 мг Se/дм³ больше, чем в предыдущем пассаже: 5 мг Se/дм³ => 10 мг Se/дм³, 10 мг Se/дм³ => 15 мг Se/дм³, 15 мг Se/дм³ => 20 мг Se/дм³.

Каллус культивировали в условиях термостатируемого помещения при 25 °С, относительной влажности воздуха 65-70 %, освещенности 2-3 тыс. люкс и 16-часовом фотопериоде [8].

Ростовой индекс определяли морфометрическим методом по отношению среднего объема полученного каллуса к объему транспланта на 1-ю, 4-ю, 7-ю, 10-ю и 13-ю недели культивирования.

Содержание селена в каллусной биомассе, высушенной до абсолютно сухого веса (а.с.в.), определяли в конце эксперимента (13-я неделя культивирования) на атомно-абсорбционном спектрометре фирмы Perkin-Elmer.

Полученные данные обработаны статистически с использованием стандартного пакета статистики в Microsoft Office.

Результаты и обсуждение

Как показали предыдущие исследования, индукция каллусогенеза обнаруживалась только при использовании в качестве эксплантов молодых листьев астрагала шерстистоцветкового (рис. 1), при этом частота каллусообразования достигала 100% [8]. Условия внесения селена в питательную среду селена оказывало значительное влияние на закономерности роста каллусных культур астрагала. При пассировании каллуса на питательные среды с постоянной концентрацией селена снижение ростового индекса наблюдалось только при концентрации селена 15 мг/дм³ (рис. 2, кривая 4) до 10-й недели культивирования, а к 13-й недели значение ростового индекса в варианте 15 мг Se/дм³ превышало контрольное (рис. 2, кривые 1 и 4).



Рис. 1. Каллусная культура астрагала шерстистоцветкового, индуцированная в культуре *in vitro* молодых листьев

Максимальный прирост биомассы отмечался во второй серии при ступенчатом увеличении концентрации селена с 10 до 15 мг/дм³ (рис. 2, кривая 6).

Как видно из приведенных результатов, устойчивость каллусных культур астрагала шерстистоцветкового к высоким концентрациям селена (15 – 20 мг/дм³) резко повышалась начиная с 7-й недели культивирования (рис. 2, кривые 3-6).

Тормозящее воздействие селена на рост наблюдалось лишь при пассировании каллуса на среду, содержащую 20 мг Se/дм³, к концу 13-й недели эксперимента (рис. 2, кривая 7).

Результаты исследования влияния условий внесения селена в питательные среды на ростовые характеристики, хорошо согласуются с резуль-

татами концентрирования селена каллусной биомассой астрагала шерстистоцветкового. Увеличение концентрации селена в питательной среде приводило к увеличению концентрирования селена каллусной биомассой как в первой, так и во второй сериях. Однако при ступенчатом увеличении концентрации селена этот эффект был наиболее выражен, особенно в варианте 20 мг Se/дм³. В этом случае содержание селена в биомассе каллуса увеличилось в 74 раза по сравнению с контролем (небольшое количество селена в контроле объясняется его присутствием в качестве примесей в солях, используемых для приготовления питательной среды). Накопление селена в каллусных культурах при его концентрации в питательной среде 15-20 мг Se/дм³ достигало 321,7-348,3 мг Se/кг а.с.в.

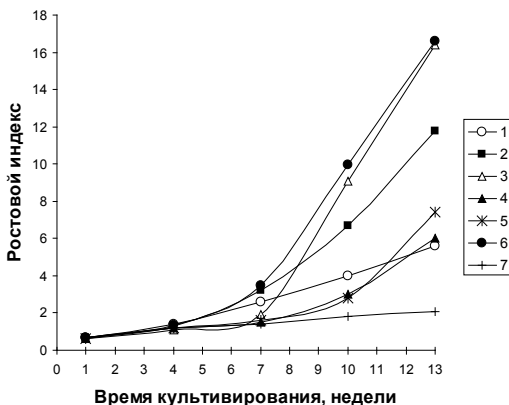


Рис. 2. Динамика роста каллусных культур астрагала шерстистоцветкового в зависимости от условий внесения селена в питательную среду: 1— контроль (без Se); 2 — 5 мг Se/дм³; 3 — 10 мг Se/дм³; 4 — 15 мг Se/дм³; 5 — 10 мг Se/дм³ (в предыдущем пассаже — 5 мг Se/дм³); 6 — 15 мг Se/дм³ (в предыдущем пассаже — 10 мг Se/дм³); 7 — 20 мг Se/дм³ (в предыдущем пассаже — 15 мг Se/дм³)

Выводы

1. Исследованы ростовые характеристики и закономерности накопления селена в длительно пассируемых каллусных культурах астрагала шерстистоцветкового.
2. Показано, что при ступенчатом увеличении концентрации селена значительно повышается концентрирование селена и ростовая активность каллусных культур.
3. Показано, что каллусные культуры астрагала шерстистоцветкового способны многократно концентрировать селен из питательной среды, содержащей до 20 мг Se/дм³ (IV), при одновременном повышении ростовой активности.

Литература

1. *Акімов І.К.* Червона книжка України. – Глобалконсалтинг, 2009. – 1536 с.
2. *Ермаков В.В.* Биологическое значение селена / В.В. Ермаков, В.А. Ковальский. – М., 1974. – 189 с.
3. *Давидова О. С.* Фізіолого-біохімічні та стреспротекторні функції селену в рослинах / О. С. Давидова., В.А. Вещицкий, П.П. Яворівський // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. – Т.41, № 2. – С. 109-122.
4. *Серегина И.И.* Биологическая роль селена в растениях / И.И. Серегина, Н.Т. Ниловская // Агрохимия. – 2002. – № 10. – С. 76-85.
5. Государственная фармакопея Украины. – Харьков, 2008. – 617 с.
6. *Калинин Ф.Л.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наук. думка, 1986. – С. 34-36.
7. Пат. № 36368 Украина, МПК⁶ С 12 N 5/04. Спосіб культивування калусної тканини астрагала шерстистоквіткового (*Astragalus dasyanthus* Pall.) / Бугара І. О., Юркова І. М., Бугара О. М.; заявитель и патентообладатель Таврический нац. ун-т. - № 200805928: заявл. 07.05.08; опубл. 27.10.08. Бюл. № 20.
8. *Бугара И.А.* Получение и цитологический анализ каллусных культур астрагала шерстистоцветкового (*Astragalus dasyanthus* Pall) / И.А. Бугара, И.Н. Юркова, А.М. Бугара // Ученые записки Таврич. нац. ун-та. Серия «Биология, химия». – 2008. – Т. 21(60), № 2. – С. 9-14.

Резюме

Исследованы ростовые показатели и закономерности накопления селена в каллусных культурах *Astragalus dasyanthus* в зависимости от концентрации селена в питательной среде. Показано, что при ступенчатом увеличении концентрации селена значительно повышается степень концентрирования селена и ростовая активность.

Досліджено ростові показники та закономірності накопичення селену у калусних культурах *Astragalus dasyanthus* в залежності від концентрації селену в живильному середовищі. Показано, що при ступінчастому збільшенні концентрації селену значно підвищується ступінь концентрування селену і ростова активність.

The regularities of selenium accumulations in callus cultures of *Astragalus dasyanthus* of selenium concentration in culture medium was depending. The stepped increase of selenium concentration in culture medium significantly increased the degree of concentration of selenium and the growth activity was shown.

З М І С Т

ЗАГАЛЬНА, МОЛЕКУЛЯРНА ТА БІОХІМІЧНА ГЕНЕТИКА

АДАМОВСКАЯ В.Г., МОЛОДЧЕНКОВА О.О., СИЧКАРЬ В.И., САГАЙДАК Т.В., ЛАВРОВА Г.Д., ХОРСУН И.А., ТИХОНОВ П.С. ПОЛИМОРФИЗМ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА 7S И 11S ГЛОБУЛИНОВ СЕМЯН СОИ	3
АНДРЕЕВ И.О. КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ КАК МОДЕЛЬ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ	7
АНТОНЮК М.З., МИХАЙЛИК С.С., ТЕРНОВСЬКА Т.К. МІНЛИВІСТЬ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИМИ СПЕКТРАМИ ГЛІАДІНІВ	13
БАРАНОВ Ю.О., СЛІЩУК Г.І., ВОЛКОВА Н.Е., СИВОЛАП Ю.М. ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНА <i>SHRUNKEN1</i> КУКУРУДЗИ	18
БАСКЕВИЧ М.И. ІЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ В ЭВОЛЮЦИИ БЛИЗКИХ ВИДОВ <i>SICISTA</i> (RODENTIA, DIPODOIDEA)	22
БІЛОУСОВ О.О., КОЗЕРЕЦЬКА І.А., КАТАНАЄВ В.Л. MINIATURE ЯК ГІПОТЕТИЧНИЙ БЛОК-РЕГУЛЯТОР VURSICON/RICKETS СИГНАЛЬНОГО КАСКАДУ В КРИЛОВОМУ ЕПІТЕЛІЇ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	28
ВАГИН Ю. В. СИНТЕЗ НЕОДАРВИНИЗМА И ГЕНЕТИКИ РАЗВИТИЯ: УКРЕПЛЕНИЕ ПОЗИЦИЙ	34
ВАСИЛЕНКО О. П., ПРОНИНА О. В., РУШКОВСКИЙ С. Р. ЗАВИСИМОСТЬ ИНДУКЦИИ ЭФФЕКТА «СВИДЕТЕЛЯ» ОТ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК	38
ВОЛКОВА Н.Е., ФИЛИПОНЕНКО Н.С., КОСТЕНКО В.В., ВОРОБЬЁВА Л.И. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КОМПОНЕНТОВ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ ВЫБОРОК ИЗ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> УКРАИНЫ РАЗНЫХ ЛЕТ И ПРОИЗВОДНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЛИНИЙ	43
ГОРЕНСКАЯ О. В., КОМАРОВА Е. В. ІЗМЕНЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ ИМАГО ДРОЗОФИЛЫ ПРИ ГОЛОДАНИИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ КОФЕИНА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА	48
ГОРЯЧКИНА О.В. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ ИЗ МОНГОЛИИ	52

ДЕРІЙ С.І., ТИТАРЕНКО Л.М., СПРЯГАЙЛО О.А. ФОРМУВАННЯ ПРОФЕСІЙНОЇ КОМПЕТЕНТНОСТІ СТУДЕНТІВ НА ЗАНЯТТЯХ З ГЕНЕТИКИ	57
ДИКУН М.О., СІРАНТ Л.В., ЗАВАЛЬНА Г.В., ПОЧИНОК В.М. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГІБРИДІВ СОНЯШНИКА ЗА ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНИМИ СПЕКТРАМИ ГЕЛІАНТИНІВ	62
ДМИТРИЕВ А.П., КРАВЧУК Ж.Н., ДЯЧЕНКО А.И. УЧАСТИЕ НАДФН-ОКСИДАЗНОЙ И КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛЬНЫХ СИСТЕМ В ИНДУЦИРОВАННИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА У РАСТЕНИЙ	66
ЕВДОКИМЕНКО К., СЕРГА С.В., КОЗЕРЕЦЬКА І.А. LTR- ГЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> УКРАИНЫ	71
ЖУК О.И. ЭВОЛЮЦИОННОЕ СТАНОВЛЕНИЕ СИСТЕМ КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО РОСТА	75
ЗАДОРОВНА О.А. ВИЯВЛЕННЯ АЛЕЛІВ ГЕНА RF_1 У ЛІНІЙ СОНЯШНИКУ ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ	80
КАРПОВА І.С., КОВАЛЕНКО Е.О., ПОВЕЛИЦЯ Ю.А., ГЕТЬМАН К.І., САЩУК О.В., ЛУКАШ Л.Л., ПІДГОРСЬКИЙ В.С. ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМУ МОРФОЛОГІЧНИХ ВАРІАНТІВ ПРОДУЦЕНТА ЛЕКТИНУ – ШТАМУ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ІМВ В-7014 З ВИКОРИСТАННЯМ ПРАЙМЕРІВ ДО ПОВТОРЮВАНИХ ВОХ- ЕЛЕМЕНТІВ	84
КЛИМЕНКО В.В., ЛЫСЕНКО Н.Г. ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ШУМ И ОВОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ	89
КЛИМЕНКО В.В., ПРОХОРОВА Е.А., ТИГУНЦОВА А.Е., ЛЯН ХАОЮАНЬ ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПОЛИПЛОИДИЗАЦИИ ПАРТЕНОЗИГОТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА	94
КОЗУБ Н.О., СОЗІНОВ І.О., СОЗІНОВ О.О. ВПЛИВ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ ЗЕРЕН F_1 НА ЧАСТОТУ ПЕРЕДАЧІ ЖИТНЬОЇ 1ВL/1RS ТРАНСЛОКАЦІЇ ЧЕРЕЗ ГАМЕТИ У М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ	99
КОЛЕСНИК О.О., ЧЕБОТАР С.В., ХОХЛОВ О.М., ЦЕВМА В.М., СИВОЛАП Ю.М. ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ОПИСУ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ СОРТІВ ПШЕНИЦІ	104
КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., БУЦЕНКО Л.М. ВИВЧЕННЯ СКЛАДУ ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ РОСЛИН ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ	113

КОСТЕНКО В.В., ТОЛОКНЕЕВА А. А., ГЛЯНЬКО Е.В., ВОРОБЬЕВА Л.И. АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ АЛЛЕЛЕЙ ЛОКУСА WHITE И ГЕНЕТИЧЕСКОГО ФОНА НА ФОРМИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ КОМПОНЕНТОВ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	118
КОЦАРЕНКО Е.В., ЛЫЛО В.В., МАЦЕВИЧ Л.Л., ЛУКАШ Л. Л. ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА РЕПАРАТИВНОГО ЭНЗИМА MGMT В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	123
КУНАХ В.А. ДЕЩО ПРО ПЛАСТИЧНІСТЬ ГЕНОМУ ЯК ОСНОВУ АДАПТИВНОСТІ РОСЛИН	128
КУНДА-ПРОНЬ І.В., КОЗЕРЕЦЬКА І.А. , ПРОЦЕНКО О.В., ДЕМІДОВ С.В. СПОНТАННИЙ МУТАЦІЙНИЙ ПРОЦЕС У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> УКРАЇНИ	134
ЛІСОВСЬКА Т.П., ВОЙТЮК В.П., КУЗЬМІШИНА І.І., СТРАТУ Л.С. РЕКОМБІНАЦІЙНІ І РЕПАРАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ ДВОХ МЕЙОТИЧНИХ МУТАНТІВ ТОМАТУ	139
МАЛЕЦКИЙ С.И. ГЕОМЕТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАСЛЕДСТВЕННОСТИ У РАСТЕНИЙ.	144
МАМЕДОВА А.Д. ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ ЛИСТА ГЕТЕРОЗИСНЫХ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ И ИХ ИСХОДНЫХ ФОРМ	150
МАТВЕЕВСКИЙ С.Н., КОЛОМИЕЦ О.Л. ПОЛОВОЙ ДИМОРФИЗМ В ПРОФАЗЕ І МЕЙОЗА У ВИДОВ С РАЗНЫМИ ТИПАМИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА	155
МИСЮРА А.К., КЛИМЕНКО В.В. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЗРЕЛОГО НЕОПЛОДОТВОРЕННОГО ЯЙЦА И УСПЕШНОСТЬ ПАРТЕНОКЛОНИРОВАНИЯ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА	160
МИХЕЕВ А.Н. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ УСИЛЕНИЕ МУТАЦИОННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ, ПОВЫШАЮЩЕЕ РАЗРЕШАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ ЕСТЕСТВЕННОГО ОТБОРА	165
ПАСТЕРНАК С. Л., АНДРИЕВСКИЙ А. М. ЧАСТОТЫ ВСТРЕЧАЕМОСТИ И ЭКСПРЕССИЯ АЛЛЕЛЕЙ ЛОКУСА <i>β-EST</i> В ЛАБОРАТОРНОЙ ПОПУЛЯЦИИ <i>DROSOPHILA MERCATORUM</i>	170
ПІСКУН Р.П., МОЛЧАН І.М., КОЛОМІЄЦЬ Н.Г., ВАЩУК А.А., ШЕВЧУК Т.І., ГОРБАТЮК С.М. ЕПІГЕНЕТИЧНІ ПРИНЦИПИ ЕВОЛЮЦІЇ – ІСТОРІЯ І СУЧАСНІСТЬ	175

РОГОЖИН Е.А., АНДРЕЕВ Я.А., КОРОСТЫЛЕВА Т.В., СЛАВОХОТОВА А.А., ИСТОМИНА Е.А., ЕГОРОВ Ц.А., ГРИШИН Е.В., ОДИНЦОВА Т.И.	
СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЗАЩИТНЫЕ ГЕВЕИНО-ПОДОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ПШЕНИЦЫ (<i>TRITICUM KHARAE</i>)	180
РОНИН Е.И., КОРОЛЬ А.Б.	
ГЕНЕТИЧЕСКОЕ КАРТИРОВАНИЕ С УЧЁТОМ ПОЛОВЫХ РАЗЛИЧИЙ В РЕКОМБИНАЦИИ	184
САМАТАДЗЕ Т.Е., АМОСОВА А.В., СУСЛИНА С.Н., ЗАГУМЕННИКОВА Т.Н., БЫКОВ В.А., ЗЕЛЕНИН А.В., МУРАВЕНКО О.В.	
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КАРИОТИПОВ ТРЕХ ВИДОВ <i>MACLEAYA</i>	189
САФРОНОВА Л.Д., ЧЕРЕПАНОВА Е.В., СЕРГЕЕВ Е.Г.	
АНАЛИЗ ХРОМОСОМ НА РАННЕЙ СТАДИИ ПЕРВОГО ДЕЛЕНИЯ МЕЙОЗА У СОБОЛЯ <i>MARTES ZIBELLINA</i>	194
СОЗИНОВ И.О., КОЗУБ Н.О., КАРЕЛОВ А.В., СОЗИНОВ О.О.	
МУТАЦІЇ ЗА ГЛІАДИНОВИМИ ЛОКУСАМИ, ІНДУКОВАНІ ГАММА- ОПРОМІНЕННЯМ ЗЕРЕН F_1 М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ	198
СТРАШНЮК В.Ю., ШАКИНА Л.А., МАРЧЕНКО А.Ю.	
СТЕПЕНЬ ПОЛИТЕНИИ ГИГАНТСКИХ ХРОМОСОМ У <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> MEIG. В СВЯЗИ С РАЗЛИЧИЯМИ ПО ГЕНОТИПУ И ЧАСТОТОЙ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ЛЕТАЛЕЙ	204
ТИМЧУК С.М., ЛАРИНЦЕВА Н.В., ПОЗДНЯКОВ В.В., АНЦИФЕРОВА О.В., ХАРЧЕНКО Ю.В., ХАРЧЕНКО Л.Я.	
ВМІСТ І СКЛАД ТОКОФЕРОЛІВ В ЗЕРНІ ЕНДОСПЕРМОВИХ МУТАНТІВ КУКУРУДЗИ	208
ЭЙГЕС Н.С., ВОЛЧЕНКО Г.А., ВОЛЧЕНКО С.Г., ДЕЛОНЕ Н.Л.	
АНАЛИЗ ПРИЗНАКА ВЫСОКИХ АДАПТИВНЫХ СВОЙСТВ НА ГЕНЕТИЧЕСКОМ И ФЕНОТИПИЧЕСКОМ УРОВНЯХ	213

ЕКОГЕНЕТИКА

БОЛТІНА І.В., ВЕРГОЛЯС М.Р., ПОВ'ЯКЕЛЬ Л.І., ЗЛАЦЬКИЙ І.А., ЗАВАЛЬНА В.В., КОВАЛЕНКО О.В., ВАСЕЦЬКА О.П., ЗАСЦЬ Є.Р., СЕМЕНОВА А.Ю.	
КОМПЛЕКСНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКОСТІ ВОДИ РІЗНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ	219
ГЕРМАН Е.Ю., БАЕВА Т.И., ВИНОКУРОВА Л.В., ШЕСТОПАЛОВА Н.Г.	
ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ И СПЕКТРА ХРОМОСОМНЫХ МУТАЦИЙ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ РАДИОАДАПТИВНОГО ОТВЕТА ИНБРЕДНЫХ И ГЕТЕРОЗИСНЫХ РАСТЕНИЙ <i>HELIANTHUS ANNUUS</i> L.	224

ДЬОМІНА Е.А., МИХАЙЛЕНКО В.М. ОСОБЛИВОСТІ КОМБІНОВАНОГО ВПЛИВУ ОКСИДУ АЗОТУ ТА ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ НА РОЗВИТОК ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ: ДОЗА-ЕФЕКТ, КОНЦЕНТРАЦІЯ-ЕФЕКТ	229
КОНОВАЛОВ В. С. КОНЦЕПЦІЯ ЕКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОБУСЛОВЛЕННОСТИ РЕПРОДУКТИВНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ МУЖСКОГО НАСЕЛЕНИЯ ЗАПАДНОЙ И ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ	233
КОПЫТЧУК Т.Е., СЕЧНЯК А.Л. ВЛИЯНИЕ ОСТАТОЧНЫХ ДОЗ ГЕРБИЦИДОВ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ.	237
КОРШИКОВ И.И., ТКАЧЕВА Ю.А. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА ДВУХ ВИДОВ ХВОЙНЫХ В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕННОЙ СРЕДЫ	242
КРАВЕЦ Е.А. ЦИТОМИКСИС КАК ФОРМА КЛЕТОЧНОГО (ПРЕДМЕЙОТИЧЕСКОГО) ОТБОРА У РАСТЕНИЙ С НАРУШЕННЫМ ГОМЕОСТАЗОМ	247
МАРТИНЕНКО О.І., КИРИЛЕНКО Т.К., СТЕПАНІЮГІН А.В., ЮРКЕВИЧ Л.Н., АДАМЧУК-ЧАЛА Н.І., ПЛОДНІК Д.П., ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А.І. ДЕТЕРМІНАЦІЙНІ ЗМІНИ ПЕРЕБІГУ ПРОЦЕСУ НУКЛЕЇНОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ У КЛІТИНАХ ЛИСТКІВ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ ІЗАТІЗОНУ	252
МАШКИНА О.С., КАРПЕЧЕНКО Н.А. РАЗМНОЖЕННЫЙ <i>IN VITRO</i> КЛОН МИКСОПЛОИДНОГО ТОПОЛЯ СЕРЕЮЩЕГО (<i>POPULUS CANESCENS</i> SM.) КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ К НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ УСЛОВИЯМ ПРОИЗРАСТАНИЯ	256
СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В., ТАШЕВ А.Н., ЕФРЕМОВА Т.Т. АДАПТИВНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ХВОЙНЫХ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ ПРОИЗРАСТАНИЯ	262
ШЕВЦОВА Н. Л. ВИКОРИСТАННЯ ГЕНЕТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ВИЩІХ ВОДЯНИХ РОСЛИН У РАДІОЕКОЛОГІЧНОМУ МОНІТОРИНГУ ВОДОЙМ.	267
ШИЛІНА Ю.В., МОРОЗ Ю.І., ГУЩА Н.І., МОЛОЖАВА О.С. РАДІАЦІЙНО-ІНДУКОВАНА ЕКСПРЕСІЯ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ БАКТЕРІЙ <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ЯК НЕСПЕЦИФІЧНА АДАПТИВНА РЕАКЦІЯ	272

ЯКИМЧУК Р.А.

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ ВПЛИВУ ПРИРОДНИХ РАДІОНУКЛІДІВ
ХВОСТОСХОВИЩ УРАНОПЕРЕРОБНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ. 277

HEINZE В.

PHYLOGEOGRAPHY AND THE CONSEQUENCES OF INTROGRESSION FOR
FUNCTIONAL GENOMICS IN A PAIR OF HYBRIDIZING EURASIAN ASPEN,
POPULUS TREMULA AND *P. ALBA*. 281

МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА І ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., РОЖНОВА Н.А.

SSAP И SCAR МАРКЕРЫ АПОМИКСИСА У ФОРМ *BOECHERA*
СЕМЕЙСТВА *BRASSICACEAE* 286

ГРИШИН С.Ю., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я.

АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ДНК-МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ
К АНТРАКНОЗУ ANTJM1, ANTJM2 У РОССИЙСКИХ И БЕЛОРУССКИХ
СОРТОВ ЛЮПИНА УЗКОЛИСТНОГО (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* (L.)) 291

ДУПЛИЙ В.П., МАТВЕЕВА Н.А., ШАХОВСКИЙ А.М., КИЩЕНКО Е.М.

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ГЕНА *rbcL* МОХООБРАЗНЫХ АНТАРКТИКИ
SANIONIA GEORGICOUNCINATA И *WARNSTORFIA FONTINALIOPSIS* 296

**КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ЛЕВИНА Т.А.,
КРИНИЦЫНА А.А., ЖУЧЕНКО А.А.**

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ И ИНТРОГРЕССИИ ГЕНОВ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЖВИДОВЫХ ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ
ТОМАТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ РЕКОМБИНАЗУ
RECA ESCHERICHIA COLI. 301

**ЛЕМЕШ В.А., МОЗГОВА Г.В., ГРУШЕЦКАЯ З.Е., ТРУХАНОВЕЦ Н.Л.,
ПИЛЮК Я.Э., БАКАНОВСКАЯ А.В., ЗЕМЦОВА Л.В., САМАТАДЗЕ Т.Е.,
АМОСОВА А.В., МУРАВЕНКО О.В.**

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОМ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ХРОМОСОМНЫХ
И ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА
РАПСА (*BRASSICA NAPUS* L.) 306

ПАНЧУК І.І., КАСІЯНЧУК Р.М., ВОЛКОВ Р.А.

ВПЛИВ ІОНІВ ЗАЛІЗА НА ТРАНСКРИПЦІЮ ГЕНІВ *APX* АРАБІДОПСИСУ. . 311

СИВОЛАП Ю.М.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ГЕНОМА И МАРКИРОВАНИЕ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ . . . 315

ВЕТЕКНТИН А., INDA L., CATALAN P.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE PGIC GENES IN THE FAMILY
ROACEAE. 320

HASTEROK R.

FISH-ING NUCLEAR GENOMES: GLITTERS AND SHADOWS OF MODERN
PLANT CYTOGENETICS 321

**LESNIEWSKA K., SZALEGA A., LUSINSKA J., BETEKHTIN A.,
BOROWSKA N., BREDA E., WOLKO B., HASTEROK R.**
PHYLOGENETIC RELATIONS IN THE *LUPINUS* GENUS –
A CYTOMOLECULAR APPROACH 323

**WOLNY E., LESNIEWSKA K., PIERCHALA K., CHMURA A.,
SIWINSKA D., IDZIAK D., LANGDON T., HASTEROK R.**
CYTOGENETIC STUDIES ON *KOELERIA* AND *SESLERIA* SPECIES 324

ГЕНЕТИКА І СЕЛЕКЦІЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

**АХТЕМОВА Г.А., ЧЕБОТАРЬ В.К., ШТАРК О.Ю., ЩЕРБАКОВ А.В.,
БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**
ЭНДОФИТНЫЕ БАКТЕРИИ РАСТЕНИЙ: БИОРАЗНООБРАЗИЕ И
ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЗНАЧИМОСТЬ 326

БІЛЯВСЬКА Л.О., ПІДЛІПСЬКА В.А., МУКВИЧ М.С.
СТВОРЕННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ ДЛЯ ВІДБОРУ АКТИВНИХ ВАРІАНТІВ
STREPTOMYCES AVERMITILIS УКМ АС-2160 ПІСЛЯ НГ-МУТАГЕНЕЗУ . . . 330

ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., ЛАВРЕНЧУК В.Я., МАЦЕЛЮХ Б.П.
БАГАТОСТУПЕНЕВА СЕЛЕКЦІЯ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ
ПО ЛІКОПІНУ МУТАНТІВ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 4LCP 334

**ГОРБАЛЬ Л.О., МИРОНОВСЬКИЙ М.Л., РАБИК М.В.,
МАКІТРИНСЬКИЙ Р.П., ОСТАШ І.С., ГРУБСЬКИЙ Я.П.,
КЛИМИШИН Д.О., ГРЕНЬ Т.П., ЦИПК О. В., ЛОПАТНЮК М.М.,
МУТЕНКО Г.В., ГРОМИКО О.М., ОСТАШ Б.О., ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М.,
БЕХТОЛЬД А., ФЕДОРЕНКО В.О.**
РЕГУЛЯТОРНІ ГЕНИ АКТИНОМЦЕТІВ: НОВІ ІНСТРУМЕНТИ ДЛЯ
ВИВЧЕННЯ БІОСИНТЕЗУ АНТИБІОТИКІВ І КОНСТРУЮВАННЯ ЇХНІХ
ПРОДУЦЕНТІВ 339

**ГРИЦАЙ Р.В., ГНАТЮК Т.Т., ОЛІЙНИК Т.М., ЗАХАРЧУК Н.А.,
СЛОБОДЯН С.О., ПАТИКА В.П.**
ІДЕНТИФІКАЦІЯ НОВИХ ШТАМІВ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ СОЇ
З СИМПТОМАМИ ІРЖАВО-БУРОЇ ПЛЯМИСТОСТІ 344

ДРАГОВОЗ І.В., ЛЕОНОВА Н.О.
СИНТЕЗ АУКСИНІВ І ЦИТОКІНІНІВ РИЗОБІЯМИ СОЇ З РІЗНОЮ
СИМБІОТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ 349

**ЖУКОВ В.А., ЖЕРНАКОВ А.И., СУЛИМА А.С., ТИТОВ В.С.,
ФЕДОРИНА Я.В., ШТАРК О.Ю., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**
СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ В ИЗУЧЕНИИ СИМБИОЗОВ ГОРОХА
ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.) 354

КЛОЧКО В.В., ЗЕЛЕНА Л.Б., ЧУГУНОВА К.О., АВДЄЄВА Л.В. АНАЛІЗ ФЕНАЗИНОВОГО КОМПЛЕКСУ У ШТАМІВ <i>PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AUREOFACIENS</i> УКМ В-111 І УКМ В-306	358
КОЦЬ С.Я. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСПОЗОНОВЫХ МУТАНТОВ МЕДЛЕННОРАСТУЩИХ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ СОИ	362
КРЮЧКОВА Л.О., ДРАГОВОЗ І.В., ЛАПА С.В., АВДЄЄВА Л.В. АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>VACILLUS</i> ЩОДО ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРОМІЦЕТІВ	368
ЛЕОНОВА Н.О., ДАНКЕВИЧ Л.А. ЕКЗОГЕННІ АУКСИНИ ФІТОПАТОГЕННИХ ТА БУЛЬБОЧКОВИХ БАКТЕРІЙ	371
ЛУТЧЕНКО В.А., ПОЛЩУК Л.В., МАЦЕЛЮХ Б.П. МУТАЦІЇ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗНОГО ОПЕРОНА У <i>STREPTOMYCES GLOBISPORUS</i> 1912	376
ОСТАШ Б. О., ЖУ Л., МАКТРИНСЬКИЙ Р. П., ОСТАШ І. С., ЗАБУРАННИЙ Н. В., ГРОМИКО О. М., РОР Ю., УОКЕР С., ФЕДОРЕНКО В. О. КОМБІНАТОРНИЙ БІОСИНТЕЗ ПРИРОДНИХ СПЛУК У АКТИНОМІЦЕТІВ: НОВІ НАПРЯМИ	382
ПЕТРАЧКОВА Т.А., ПРОНИНА О.В., ШЕПЕТА Ю.Б., РУШКОВСКИЙ С.Р. ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ <i>cdc13-1</i> НА СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	386
ПОЛЩУК Л.В., ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., ЛУК'ЯНЧУК В.В. ДОСЛІДЖЕННЯ СИНТЕЗУ КАРОТИНОЇДІВ <i>Crt⁺</i> ТА <i>Lcp⁺</i> -МУТАНТАМИ <i>STREPTOMYCES GLOBISPORUS</i> 1912	391
ПОЛЩУК Л.В., ЛУК'ЯНЧУК В.В. АНАЛІЗ ФЕНОТИПОВИХ ОЗНАК ТРАНСФОРМАНТІВ <i>STREPTOMYCES GLOBISPORUS</i> 1912–Б/П.	396
РОЙ А.О., ХАРКЕВИЧ О.С. ХІТИНОЛІТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ <i>VACILLUS</i> СОНН, ЦО ПЕРСПЕКТИВНІ ДЛЯ СТВОРЕННЯ БІОПРЕПАРАТІВ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА.	401
ШТАРК О.Ю., ЖУКОВ В.А., ОВЧИННИКОВА Е.С., ДАНИЛОВА Т.Н., ФЕДОРИНА Я.В., ГРИШИНА О.А., КРАШЕНИННИКОВА А.С., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ І.А. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АРБУСКУЛЯРНОЙ МИКОРИЗЫ У БОБОВЫХ	405

БІОТЕХНОЛОГІЇ В СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ ТА МЕДИЦИНІ

БАВОЛ А.В., МОРГУН Б.В., НІТОВСЬКА І.О., РУДАС В.А., ДУБРОВНА О.В. ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ПШЕНИЦІ З ВИКОРИСТАННЯМ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР, ОТРИМАНИХ З АПКАЛЬНОЇ МЕРИСТЕМИ ПАГОНА.....	411
БАЖИНА Е.В. РЕПРОДУКТИВНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ПИХТЫ СИБИРСЬКОЇ И СОХРАНЕНИЕ ЕЕ ГЕНОФОНДА В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	416
БЕЛОКУРОВА В.Б., КИЩЕНКО Е.М. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ ТРАНСГЕННЫХ КОРНЕЙ <i>ACHILLEA LINGULATA</i> WALDST. & KIT	421
БЛИНСЬКА О. В., ТИМЧУК С. М., ДЕРЕБІЗОВА О. Ю. ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ МЕТОДОМ КУЛЬТУРИ ПИЛЯКІВ <i>IN VITRO</i> ПРИ ВИКОРИСТАННІ ЯК ГЕЛЕУТВОРЮВАЧІВ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ЗЕРНОВИХ КРОХМАЛІВ ГОРОХУ З РІЗНИМ ВМІСТОМ АМІЛОЗИ.....	426
БЛИНСЬКА О. В., СОКОЛЬНІКОВА Я. М. ГЕНОТИПНІ ОСОБЛИВОСТІ КЛОНАЛЬНОГО МІКРОРОЗМНОЖЕННЯ РІПАКУ (<i>BRASSICA NAPUS L.</i>)	432
БЛЯВСЬКА Л.О., ПЕТРЕНКО Т.В., КОЗИРИЦЬКА В.Є., ГУТИНСЬКА Г.О. НОВИЙ КОМПЛЕКСНИЙ АВЕРМЕКТИВМІСНИЙ БІОПРЕПАРАТ АСКОЛЬДІЯ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА.....	437
БОРОДАЙ В.В. МОРФО- И КАЛЮСОГЕНЕЗ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ КАРТОФЕЛЯ УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	442
ВИДРИНСЬКА О.К., ШВЕД О.М., ГУБРІЙ З.В., НОВІКОВ В.П. БІОЧИЩЕННЯ СТОКІВ ЗГІДНО ПРИНЦИПІВ СТАЛОГО РОЗВИТКУ	447
ГЕРАСИМЕНКО І.М., КАЗАНЦЕВ А.А., МАЗУР М.Г., КИЩЕНКО Е.М., ШЕЛУДЬКО Ю.В. СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ.....	451
ГОНЧАР О.М., ТУГАЙ Т.І., ТУГАЙ А.В., ЛОПАТЬКО К.Г., АФТАНДІЛЯНЦ Є.Г., ПАТИКА М.В. ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРЕПАРАТІВ НАНОЧАСТИНОК МЕТАЛІВ	456
ГРОВОВА О.Н. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ВЫРАЩИВАНИЯ БИОМАССЫ ШТАММА ЖЕНЬШЕНЯ <i>PANAX GINSENG</i> С. А. МЕУ (СЕМ. ARALIACEAE).....	461

ДЕРКАЧ К. В., АБРАІМОВА О. Є., ЧЕРНОУСОВА Н. М., СМЕТАНІН В. Т., САТАРОВА Т. М. ОПТИМІЗАЦІЯ РЕГЕНЕРАЦІЙНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ЗАРОДКОВОЇ ПЛАЗМИ ЛАНКАСТЕР	465
ЗАЙЦЕВА О.И., ЛЕМЕШ В.А. МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В КУЛЬТУРЕ ЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ТРИТИКАЛЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.	471
ЗАХАРУК О.А., АНОПРІЄНКО О.В., ВАГІНА І.М., СТРОКОВСЬКА Л.І. ЛОКАЛІЗАЦІЯ БАКУЛОВІРУСНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ В РІЗНИХ ОРГАНАХ МИШІ ПРИ ВВЕДЕННІ РЕКОМБІНАНТНИХ БАКУЛОВІРУСІВ І ТРАНДУКОВАНИХ ФЕТАЛЬНИХ ФІБРОБЛАСТІВ.	475
ЗІНЧЕНКО М.О., ДУБРОВНА О.В., БАВОЛ А.В. ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ	480
КАМЕНЧУК О.П., БОБИК Л.В., КУРЧІЙ Б.О. СИНТЕЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ГРИБАМИ РОДУ <i>ACREMONIUM SPP.</i>	487
КАРПЕЧЕНКО К.А., ВЕПРИНЦЕВ В.Н., КОНДРАТЬЄВА А.М., КАРПЕЧЕНКО І.Ю., ЗЕМЛЯНУХИНА О.А., КАРПЕЧЕНКО Н.А. ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> КИЗИЛЬНИКА ДАММЕРА (<i>COTONEASTER DAMMERII C.K. SCHNEID.</i>)	492
КВАСКО Е. Ю., МАТВЕЄВА Н. А., ШАХОВСКИЙ А. М. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНДИВИЯ <i>CICHORIUM ENDIVIA L.</i> ВЕКТОРАМИ С ГЕНОМ ИНТЕРФЕРОНА $\alpha 2B$ ЧЕЛОВЕКА	496
КЛЯЧЕНКО О.Л., КРИЛОВСЬКА С.А. ОСОБЛИВОСТІ КАЛЮСОГЕНЕЗУ РІЗНИХ ГЕНОТИПІВ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ (<i>BETA VULGARIS L.</i>): ПЕРЕДУМОВИ СЕЛЕКЦІЇ З ПІДВИЩЕННЯ АДАПТИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ.	500
КОВАЛЕВА Л.В., ВОРОНКОВ А.С., ТИМОФЕЄВА Г.В., РАКИТИН В.Ю. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОРАСТАЮЩЕГО <i>IN VITRO</i> МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА ПЕТУНИИ: УЧАСТИЕ ЭТИЛЕНА	504
КОВБАСЕНКО Р.В., ОЛІЙНИК Т.М., ДУЛЬНЄВ П.Г., ДМИТРІЄВ О.П ОПТИМІЗАЦІЯ ЖИВИЛЬНИХ СУМІШЕЙ ДЛЯ ІНТРОДУКЦІЇ ПАСЛЬОНОВИХ КУЛЬТУР <i>IN VITRO</i> ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ НАНОЧАСТИНОК	509
КОВТУН С.І., ЩЕРБАК О.В., ЗЮЗІОН А.Б., ТРОЦЬКИЙ П.А., ГАЛИЦЬКА Т.В. ВИКОРИСТАННЯ НАНОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ ЕФЕКТИВНОГО ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ СВИНЕЙ <i>IN VITRO</i>	513

КОМІСАРЕНКО А.Г., БРОННІКОВА Л.І., СЕРГЄЄВА Л.Є., МИХАЛЬСЬКА С.І., ТИЩЕНКО О.М.	
РІВЕНЬ ПРОЛІНУ ТА ТОЛЕРАНТНІСТЬ ДО ВОДНОГО ДЕФІЦИТУ РЕГЕНЕРАНТІВ СОНЯШНИКА, ТРАНСФОРМОВАНИХ З ВИКОРИСТАННЯМ ШТАМУ LBA4404(pBi2E)	518
КОНВАЛЮК І.І., ДРОБИК Н.М., МЕЛЬНИК В.М., ТВАРДОВСЬКА М.О., КРАВЕЦЬ Н.Б., КУНАХ В.А.	
RAPD- ТА ISSR- АНАЛІЗ КУЛЬТУРИ ТКАНИН І ОРГАНІВ <i>GENTIANA LUTEA</i> L. У РІЗНИХ УМОВАХ ВИРОЩУВАННЯ	523
КОРНЯ Т.М., ЗАМБРИБОРЦІ І.С., ЛОБАНОВА Е.И., ШЕСТОПАЛ О.Л., ДОБРОВА А.А.	
ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ <i>EUSTOMA GRANDIFLORUM</i> SHINN	528
КРАСНОВ М.С., АГИЛЬОН-ГУТИЕРРЕС Д.Р., РЫБАКОВА Е.Ю., ЯМСКОВА В.П., БУРЛАКОВА О. В., ЯМСКОВ И.А., ГОЛИЧЕНКОВ В. А.	
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕМБРАНОТРОПНЫХ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ НА РЕГЕНЕРАТЫ КОНЕЧНОСТЕЙ АМФИБИЙ	533
КРУГЛОВА А.Е.	
КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ <i>IN VITRO</i> ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ БОРЕЦА СЕВЕРНОГО <i>ACONITUM SEPTENTRIONALE</i> KOELLE	538
КРУГЛОВА Н.Н.	
К ВОПРОСУ О ВЫЯВЛЕНИИ АВТОНОМНОСТИ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ	542
КУЗНЕЦОВА О.В., МАЛИНОВСКАЯ Н.В.	
ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВЫСШЕГО БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА <i>PLEUROTUS OSTREATUS</i> НА ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ	547
КУЗЬМИНА Н.С., СТРЕЛКОВА М.А., СЛЕПЯН Л.И., КИРИЛЛОВА Н.В.	
ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ШТАММЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ARALIACEAE	552
ЛАВРИНЕНКО Ю.О., БАЛАШОВА Г.С., КОТОВА О.І.	
ВПЛИВ ТРИВАЛОСТІ ФОТОПЕРІОДУ, ТЕМПЕРАТУРИ ТА АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ІНДУКЦІЮ УТВОРЕННЯ МІКРОБУЛЬБ КАРТОПЛІ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	556

ЛЕНИВКО С.М., ЕРЧАК Н.П., КОВАЛЕНКО В.В. ВЛИЯНИЕ КРЕМНИЙОРГАНИЧЕСКОГО КОМПОНЕНТА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ В КУЛЬТУРЕ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ ОЗИМЫХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ	561
МАЙСТРЕНКО О.М., ЛУЧАКІВСЬКА Ю.С., МАТВЄЄВА Н.А. НАКОПИЧЕННЯ ПОЛІФРУКТАНІВ СУСПЕНЗІЙНИМИ ТА КАЛУСНИМИ КЛІТИННИМИ КУЛЬТУРАМИ, КУЛЬТУРОЮ „БОРОДАТИХ” КОРЕНІВ ТА ОРГАНАМИ РОСЛИН ТОПІНАМБУРУ (<i>HELLANTHUS TUBEROSUS L.</i>)	566
МАТВЄЄВА А.Ю., КУРЧИЙ В.М., СИРАНТ Л.В., МОРГУН Б.В., ТИЩЕНКО Е.Н. ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ШТАММОМ GV3101 (pICH5290)	571
МАТВЄЄВА Н.А., ШАХОВСКИЙ А.М., КОМАРНИЦКИЙ И.К., КВАСКО Е.Ю., КИЩЕНКО Е.М. СОЗДАНИЕ РАСТЕНИЙ ТАБАКА С ГЕНОМ <i>hTert</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	577
МИХАЛЬСКАЯ С.И., АДАМЕНКО Н.И., МОРГУН Б.В., ТИЩЕНКО Е.Н. РЕГЕНЕРАЦИЯ <i>IN VITRO</i> ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ ПРИ <i>AGROBACTERIUM</i> -ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ	581
НІТОВСЬКА І.О., ДУПЛІЙ В.П., РУДАС В.А., АБРАЇМОВА О.С., САТАРОВА Т.М., МОРГУН Б.В. ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ ТРАНСФОРМАЦІЇ КАЛЮСНИХ ЛІНІЙ КУКУРУДЗИ ЗА ДОПОМОГОЮ ДЕТЕКЦІЇ ТРАНЗІЄНТНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНА БЕТА-ГЛЮКУРОНІДАЗИ	587
ПАВЛОВА М.К. РАИСА ГЕОРГИЕВНА БУТЕНКО – УЧЕНЫЙ, ПЕДАГОГ И ДРУГ	592
ПОЛЯКОВА Л.В., ЖУРОВА П.Т. ВЛИЯНИЕ ФЛАВОНОЛОВ НА РАЗВИТИЕ И УКОРЕНЕНИЕ ЭКСПЛАНТОВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i>	596
СЕРГЕЕВА Л.Е., БРОННИКОВА Л.И., ДЫКУН М.О., СИРАНТ Л.В. КОМБИНИРОВАННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ СОИ, ОТОБРАННЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ С КАТИОНАМИ БАРИЯ	601
СОРОКА А.И. ХАРАКТЕРИСТИКА ГАПЛОИДНЫХ И ДИГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ ОЗИМОГО РАПСА, ПОЛУЧЕННЫХ ЧЕРЕЗ КУЛЬТУРУ ПЫЛЬНИКОВ	606
СТАДНИЦЬКА Н.Є., ШВЕД О.В., ЧЕРВЕЦОВА В.Г., МОНЬКА Н.Я., ЛУБЕНЕЦЬ В.І., НОВІКОВ В.П. ДОСЛІДЖЕННЯ <i>IN VITRO</i> ТІОСУЛЬФОНАТІВ ДЛЯ ЗАХИСТУ АГРОПРОДУКЦІЇ ВІД ФІТОПАТОГЕНІВ.	609

СУПРУН С.М., ПАРХОМЕНКО Ю.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ХАРКЕВИЧ Е.С., СТЕПАНЕКО С.П., СИДНИЧЕНКО И.В., ЛЯСОТА В.П., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.	
ГРИБНОЙ ПРЕПАРАТ: ПИТАТЕЛЬНАЯ ЦЕННОСТЬ, ИСПЫТАНИЕ НА ЖИВОТНЫХ	612
ТАНАСИЄНКО І., ФІНЮК Н., МІТІНА Н., ЗАІЧЕНКО О., СТОЙКА Р.С., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я.Б.	
ВИВЧЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТІ НАНОПОЛІМЕРІВ НА ОСНОВІ N,N-ДИМЕТИЛАМІНОЕТИЛМЕТАКРИЛАТУ ДЛЯ ПОДАЛЬШОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН	617
ТРЕГУБ М.С., САХНО Л.А.	
ОСОБЕННОСТИ РОСТА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ РАПСА С ГЕНОМ <i>СУР11А1</i> ЦИТОХРОМА P450 _{SCC} В УСЛОВИЯХ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА	623
ТРЕТЬЯКОВА И.Н., ПАК М.Э.	
БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ И СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ <i>IN VITRO</i> У ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ	628
ФЕДОРЧУК В.В., ЄМЕЦЬ А.І.	
ВИКОРИСТАННЯ ІНГІБІТОРУ CA ²⁺ -КАЛЬМОДУЛІН-ЗАЛЕЖНИХ ПРОТЕЇНКІНАЗ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АГРОБАКТЕРІАЛЬНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН	634
ФОМЕНКО Т.И., КУЗОВКОВА (ЛЕНЕЦ) А.А., БЕРДИЧЕВЕЦ Л.Г., РЕШЕТНИКОВ В.Н.	
ЭФФЕКТ РАЗНОУРОВНЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ β-1,4-ГЛЮКАНАЗЫ В ЛИСТОВЫХ ТКАНЯХ <i>NICOTIANA TABACUM</i> НА КАЛЛУСОГЕННУЮ АКТИВНОСТЬ И МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ	637
ЮРКОВА И.Н., БУГАРА И.А., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., ТАЙКОВА В.П., ЧМЕЛЕВА С.И., СИДЯКИН А.И.	
КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ <i>ASTRAGALUS DASIANTHUS</i> (PALL.) КАК ИСТОЧНИК ОРГАНИЧЕСКОГО СЕЛЕНА	642

МОНОГРАФІЯ

ДОСЯГНЕННЯ І ПРОБЛЕМИ
ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦІЇ
ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОСТИЖЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ
ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ

Том 4

Коректура авторів

Комп'ютерна верстка *Кожмана С. Я.*

Художнє оформлення обкладинки *Музиченка Є. Ю.*

Підписано до друку 30.05.2012. Формат 60×84 ¹/₁₆. Папір офс. № 1.
Гарнітура “Таймс”. Друк офс. Ум. друк. арк. 38,4. Обл.-вид. арк. 41,0.
Наклад 300. прим. Зам. 280.

Видавництво “ЛОГОС”

Свідоцтво ДК № 201 від 27.09.2000 р.

01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-60-03