

Національна академія наук України
Національна академія аграрних наук України
Національна академія медичних наук України
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

**ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

Збірник наукових праць

ТОМ 12

Присвячено

150-річчю від дня народження В.І. Вернадського

Київ

ЛОГОС – 2013

УДК 575.8+631.52+60](082)
ББК 28.04я43+45.3я43+41.3я43+42-3я43
Ф18

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Кунах В.А. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ (головний редактор); Дробик Н.М. – д-р біол. наук, професор (заст. головного редактора); Блюм Я.Б. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Гродзинський Д.М. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Дубровна О.В. – д-р біол. наук; Єльська Г.В. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Кучук М.В. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Лукаш Л.Л. – д-р біол. наук, професор; 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; Радченко В.Г. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Сиволап Ю.М. – д-р біол. наук, академік НААНУ; Сідоров В.А. – д-р біол. наук, чл.-кор. НАНУ; Созінов О.О. – д-р біол. наук, академік НАНУ

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол №6 від 28 травня 2013 р.)

Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / Ф 18 НАН України, НААН України, НАМН України, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Логос, 2003–2013.

Т. 12: присвяч. 150-річчю від дня народження В.І. Вернадського. – 2013. – 370 с.: іл. – укр., рос., англ. – бібліогр. у кінці ст.

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для цього видання, присвяченого 150-річчю від дня народження В.І. Вернадського.

В оглядових і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямків вивчення особливостей еволюції в біосфері, еволюційної екології та екогенетики, еволюції геномів у природі та експерименті, застосування клітинних, генних та молекулярних біотехнологій, а також історії біології.

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

Адреса редакції:

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ 03680. e-mail: kunakh@imbg.org.ua, <http://www.utgis.org.ua>

Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ № 20100-9900Р від 08.07.2013

© Українське товариство генетиків
і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2013

ДО ЧИТАЧІВ І АВТОРІВ ЗБІРНИКА – З НАГОДИ 10-РІЧЧЯ ВИХОДУ
В СВІТ ПЕРШОГО ТОМУ

Десять років тому Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова (УТГіС) опублікувало перший збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів» (К.: Аграрна наука, 2003. – 464 с.). Збірник відразу привернув до себе увагу як читачів, так і авторів. У ньому 216 авторів із України, Росії, Білорусії і Німеччини опублікували 96 статей з шести наукових розділів (табл. 1–3). Тому Президія УТГіС прийняла рішення продовжити видання, до якого увага весь час зростала, і збірник став щорічним. З 2008 року почало виходити два томи щорічно, об'єм кожного з яких складав понад 28 умовних друкарських аркушів.

Збірник започатковано на самому злеті підвищеної уваги до проблем біології, біомедицини, біотехнологій і еволюції органічного світу. Про досягнення в цих напрямках науки, зокрема, про розшифровку геному людини і найважливіших сільськогосподарських рослин і тварин, успіхи в генній терапії, клонування вищих ссавців, відкриття стовбурових клітин та вирощування для медицини на їх основі тканин та окремих органів людини, створення і застосування у виробництві трансгенних рослин і тварин тощо, практично щодня говорили і говорять не лише солідні і авторитетні засоби масової інформації, але й так звані бульварні газети. Пояснення цьому явищу лежить на поверхні – у суспільному розвитку настала ера біології. Насамперед це стосується розвитку молекулярної біології та молекулярної генетики і створення на їхній основі по суті нової галузі знань – генетичної інженерії. Уже сьогодні успіхи біологічних наук досягли того рівня, коли можна говорити про їх визначальний вплив на рівень якості життя людини, перш за все на її здоров'я, тривалість повноцінного творчого життя і (прогностично) про можливе безсмертя людини як індивідуума.

Завданням новоствореного збірника було висвітлення теорії, стану і проблем, методів і результатів досліджень в галузі генетики, селекції та сучасної біотехнології, а також впливу цих

наук на розвиток теорії еволюції та суміжних напрямків біології, медичних і сільськогосподарських наук. Велика увага приділяється також дослідженню генетичних ресурсів і вивченню та збереженню біологічного різноманіття. Важливе місце в збірнику займають питання та шляхи практичного використання досягнень генетики, селекції і біотехнології у сільському господарстві, медицині та деяких галузях промисловості, зокрема біотехнологічної. На його сторінках друкуються матеріали експериментальних досліджень, оглядові та практичні статті з теорії еволюції; про клітинні та молекулярні основи сучасної біотехнології, генетичної інженерії та генної терапії; молекулярні основи спадковості і мінливості організмів; проблеми і методи регуляції спадкової мінливості та реалізації генетичної інформації; останні досягнення в галузі як теоретичних основ селекції, так і її практичних досягнень тощо. Значне місце в збірнику надається висвітленню завдань впровадження генетико-селекційних, молекулярно-біологічних і біотехнологічних методів у практику селекційної роботи з тваринами, рослинами і мікроорганізмами, використання генетичних і генно-інженерних методів у галузі генетики людини, а також ефективності цих методів (табл. 3).

Важливим завданням збірника також є висвітлення внеску видатних учених, перш за все – вітчизняних, у названі наукові напрями світової науки. Кожен збірник присвячено ювілейній даті одного чи кількох учених, або ж ювілею видатної події у науці, наприклад ювілейній даті від часу заснування Української академії наук (нині – Національна академія наук України) (табл. 4). Цей, дванадцятий, том збірника присвячено 150-річчю від дня народження видатного природознавця зі світовим ім'ям, одного із засновників-організаторів Української академії наук і її першого президента академіка В.І. Вернадського, а 13-й том – 95-річчю від часу заснування Української академії наук.

Таблиця 1. Відомча приналежність авторів статей збірника «Фактори експериментальної еволюції організмів»

Рік	Том	Кількість статей, що надійшли до друку, шт.				Всього статей*
		Академічні установи	Вищі навчальні заклади	Установи аграрної науки	Інші наукові заклади	
2003	б/н	31	5	43	11	96
2004	2	32	13	30	4	77
2006	3	70	34	45	4	143
2008	4	44	28	17	20	99
	5	46	19	41	9	106
2009	6	45	31	24	4	92
	7	62	18	14	20	92
2010	8	47	33	30	5	105
	9	66	24	15	18	106
2011	10	63	44	45	9	128
	11	60	29	21	26	117

*Примітка. Окремі статті представлено кількома авторами із різних наукових установ.

Таблиця 2. Результати кількісного аналізу публікацій у збірнику

Рік	Том	Об'єм ум. Д. а.	Кількість статей	Кількість авторів	Кількість статей з країни, шт.*				
					Україна	Росія	Білорусь	інші країни СНД	країни «далекого зарубіжжя»
2003	б/н	27,0	96	216	81	14	3	–	1
2004	2	24,3	77	191	61	7	4	–	2
2006	3	39,8	143	447	106	21	8	–	8
2008	4	28,8	99	309	64	28	7	–	–
	5	29,6	106	342	77	19	11	2	1
2009	6	28,2	80	270	57	22	7	2	1
	7	29,6	92	341	70	24	1	–	–
2010	8	29,1	105	288	60	37	4	2	2
	9	30,9	106	402	68	33	6	–	7
2011	10	38,2	128	421	70	45	11	7	8
	11	34,6	117	433	85	31	3	–	3

*Примітка. Окремі статті представлено кількома авторами із різних країн.

Таблиця 3. Розподіл статей збірника за науковими розділами

№ розділу	Рік видання, том, назва розділу	Статті, шт.
2003, б/н		
1.	Генетико-біотехнологічні прийоми розширення генетичної мінливості рослин і тварин	17
2.	Спеціальна генетика господарсько-корисних ознак рослин і тварин	23
3.	Використання фундаментальних досліджень у практичній селекції	23
4.	Сучасні методи біотехнології у створенні нового покоління сортів і гібридів у культурних рослин	12
5.	Використання молекулярних маркерів та трансформаційних технологій у селекції й відтворенні рослин і тварин	6
6.	Методи мікроклонального відтворення цінних генотипів рослин та їхнє зберігання в культурі <i>in vitro</i>	10

2004, т. 2		
1.	Загальні питання еволюції рослин і тварин	8
2.	Еволюція рослинних геномів <i>in vitro</i>	5
3.	ДНК-технології: нове в еволюції генів і геномів	3
4.	Молекулярна екологія тварин і рослин	5
5.	Популяційно-генетичні наслідки екологічних катастроф на прикладі Чорнобиля	6
6.	Генетично-модифіковані організми	5
7.	Нове у методах оцінки селекційного генетичного матеріалу і генетика мікроорганізмів	29
8.	Оцінки сорто- і породоресурсів	13
2006, т. 3		
1.	Еволюція геномів у природі та експерименті	13
2.	Молекулярна структура та організація геномів	19
3.	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	35
4.	Експериментальний мутагенез	10
5.	Механізми взаємодії та експресії генетичних систем	12
6.	Технології <i>in vitro</i>	20
7.	Біотехнології у медицині та сільському господарстві	30
8.	Питання викладання генетики, еволюції та біотехнології	2
2008, т. 4		
1.	Загальні питання еволюції	11
2.	Еволюція геномів у природі та експерименті	17
3.	Молекулярна структура та організація геномів	18
4.	Механізми взаємодії та експресії генетичних систем	29
5.	Генетика людини та медична генетика	22
6.	Питання викладання генетики, еволюції та біотехнології	2
2008, т. 5		
1.	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	53
2.	Технології <i>in vitro</i> : проблеми та перспективи	20
3.	Біотехнології в медицині і сільському господарстві	33
2009, т. 6		
1.	Загальні питання еволюції	7
2.	Еволюція геномів у природі та експерименті	15
3.	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	33
4.	Прикладна генетика і селекція	37
2009, т. 7		
1.	Молекулярна структура та організація геномів	17
2.	Механізми взаємодії та експресії генетичних систем	6
3.	Технології <i>in vitro</i> : проблеми та перспективи	18
4.	Біотехнології у сільському господарстві та медицині	17
5.	Генетика людини та медична генетика	22
2010, т.8		
1.	Загальні питання еволюції	6
2.	Еволюція геномів у природі та експерименті	11
3.	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	43
4.	Прикладна генетика і селекція	45
2010, т.9		
1.	Молекулярна структура та організація геномів	14
2.	Механізми взаємодії та експресії генетичних систем	12
3.	Технології <i>in vitro</i> : проблеми та перспективи	16
4.	Біотехнології у сільському господарстві та медицині	38
5.	Генетика людини та медична генетика	23
6.	Питання викладання генетики, еволюції та біотехнології	3

2011, т. 10		
1.	Структура і функції хромосом	18
2.	Проблеми екогенетики	14
3.	Аналіз та оцінка генетичних ресурсів	47
4.	Прикладна генетика і селекція	48
2011, т. 11		
1.	Еволюція геномів у природі та експерименті	22
2.	Молекулярна структура та організація геномів	15
3.	Біотехнології у сільському господарстві та медицині	54
4.	Генетика людини та медична генетика	25

Таблиця 4. Визначні дати і ювілеї вчених, яким присвячені окремі випуски збірника

2003 б/н	120-річчю від дня народження А.О. Сапегіна 100-річчю від дня народження Д.О. Долгушина 100-річчю від дня народження О.С. Мусійка
2004 т. 2	125-річчю від дня народження В.Я. Юр'єва 120-річчю від дня народження І.І. Шмальгаузен 105-річчю від дня народження В.П. Зосимовича
2006 т. 3	100-річчю від дня народження С.М. Гершензона 100-річчю від дня народження П.К. Шкварнікова
2008 т. 4, т. 5	90-річчю від часу заснування Української академії наук
2009, т. 6 т. 7	200-річчю від дня народження Чарльза Роберта Дарвіна 125-річчю від дня народження І.І. Шмальгаузен
2010 т. 8, т. 9	110-річчю від дня народження Теодосія Григоровича Добжанського
2011, т. 10 т. 11	120-річчю від дня народження Л.М. Делоне 90-річчю від дня народження Р.Г. Бутенко
2013, т. 12 т. 13	150-річчю від дня народження В.І. Вернадського 95-річчю від часу заснування Української академії наук

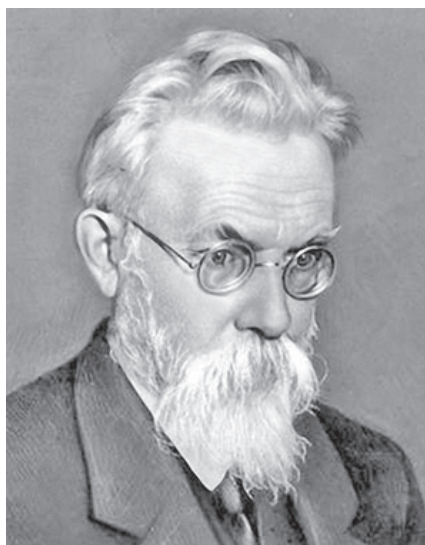
Редколегія і я, як головний редактор, розраховуємо і на подальше зростання активної участі читачів і авторів у роботі збірника і одноіменної Міжнародної конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів», сподіваємося, що дослідники систематично братимуть участь у дискусіях, які щороку проводяться за матеріалами публікацій у збірнику на Міжнародній конференції. Це сприятиме поглибленому обговоренню не тільки оригінальних теоретичних наукових робіт, а й прикладних питань, які цікавлять широкий загал, а також проблем, що стосуються подальшого розвитку біотехнологій, однієї з яких є селекція. (Згадаймо, що, за визначенням М.І. Вавилова, «селекція – це ево-

люція, що спрямовується волею людини». Очевидно, не меншою мірою це визначення стосується й сучасної біотехнології).

Ми чекаємо від Вас, шановні автори і читачі збірника «Фактори експериментальної еволюції організмів», а також учасники одноіменної Міжнародної (вже восьмої!) конференції, рекомендацій, конкретних порад та побажань, які будуть прийняті з увагою та вдячністю. Привітаємо ж один одного з початком другого десятиліття виходу Нашого збірника, виходом у світ його 12-го і 13-го томів і початком VIII Міжнародної конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів».

Головний редактор збірника
Президент Українського товариства генетиків і селекціонерів імені М.І. Вавилова
член-кореспондент НАН України
В.А. Кунах

В.І. ВЕРНАДСЬКИЙ: ПОГЛЯД ЧЕРЕЗ СТОЛІТТЯ



(1863–1945 pp.)

Серед синів українського народу однією з наймасштабніших постатей є вчений-енциклопедист, природознавець, мислитель світового рівня – Володимир Іванович Вернадський. Він здобув визнання як основоположник наукових напрямів і нових наук про Землю, творець революційного вчення про біосферу, організатор і перший президент Української Академії наук, геніальний теоретик, який визначив магістральний шлях пізнання Всесвіту і законів розвитку цивілізації. Авторитет ученого був незаперечним як в Російській імперії, а потім – у Радянському Союзі, де він жив та працював, так і за їх межами. Про це свідчить, зокрема, обрання його академіком Імператорської Академії наук, Академії наук України, Академії наук СРСР, Паризької і Чехословацької Академії наук, почесним членом Асоціації наук Великої Британії та багатьох інших авторитетних зарубіжних наукових товариств [4].

Рід Вернадських має глибокі українські корені. Його предок Верна під час визвольної війни українського народу 1648-1654 pp. виступав на боці козаків, діти служили в козацтві старшинами.

Дід майбутнього вченого – Василь Іванович – закінчив медичний факультет Московського університету і служив військовим лікарем, отримав дворянський титул і відтоді став писатися Вернадським, брав участь у походах О.В. Суворова, після чого поселився в Києві, де народився батько В.І. Вернадського, Іван Васильович (1821–1884 pp.). Батько Володимира очолював кафедру політичної економії у Київ-

ському університеті імені Святого Володимира, з переїздом до Москви – викладав політекономію і статистику в Московському університеті ім. М. Ломоносова. Згодом сім'я перебралася до Петербурга, де Іван Васильович займав посаду професора Головного педагогічного інституту. Саме в Петербурзі 12 березня 1863 р. у сім'ї Вернадських народився син Володимир [3].

Значна частина життя В.І. Вернадського була пов'язана з Україною. Через чотири роки після народження Володимира батьки переїхали до Харкова. Сім'я часто відвідувала родичів на Полтавщині. Провів одне літо Володя і в садибі українського письменника Г. Квітки-Основ'яненка.

Під впливом батька Володимир віддав перевагу природознавству, що й стало приводом для вступу на фізико-математичний факультет. У званні кандидата наук він закінчує фізико-математичний факультет Петербурзького університету і залишається в ньому для підготовки професорського звання. Брав участь в одному з петербурзьких гуртків, де вирували дискусії, суперечки. «Упрямый украинец, себе на уме», – так висловилася якимось про В.І. Вернадського одна з учасниць гуртка. Читання творів українських письменників, знайомство з побутом українців, мабуть, і дали йому привід висловити обурення про циркуляр, який забороняв у Росії друк українською мовою, такими словами: «Що це значить? Як це і для чого?». З наукових джерел відомо, що змолоду В.І. Вернадський був небайдужим до історії України [7], зокрема, читав присвячені цій тематиці польські книги, написав статтю «Угорська Русь з 1848 р.».

На час першої російської революції В.І. Вернадський – вже відомий професор, а також прихильник вільнодумства, борець за демократію. Урядовим органам, які збирали агентурні повідомлення про вчених, зрозуміло, громадська активність В.І. Вернадського не подобалась. На знак протесту проти урядової політики професор залишає Московський університет ім. М. Ломоносова і переїжджає до Петербурга, продовжуючи там свою політичну і наукову діяльність. Перебіг революційних подій спонукає його до праці в Тимчасовому уряді Росії в ранзі товариша міністра, члена ЦК партії кадетів.

Після Жовтневого перевороту В.І. Вернадський не здає позицій і підписує звернення, в якому були й такі слова: «...зусиллями народу буде покладено кінець пануванню насильників». За наказом В.І. Леніна та Й.В. Сталіна

почалося переслідування тих, хто підписав звернення. В.І. Вернадський переїжджає у Полтаву. У квітні 1918 р. до влади приходять гетьман П. Скоропадський, проголошується Українська держава. В.І. Вернадського запрошують до Києва. Тут він очолив Комісію з організації Академії наук і Української національної бібліотеки, а також комісію з питань вищої школи. З Москви до Києва переїжджає понад 20 відомих вчених. «Декілька днів не писав, – читаємо в щоденнику, – а між тим у ці дні йшла інтенсивна робота і думки, й діяльності, особливо у зв'язку з вищою школою і Академією наук. Я якось відчуваю, як глибше і сильніше я охоплюю всю цю область життя і одержую можливість прояву в ній своєї волі, своєї думки» (з щоденника).

Цікаве листування з приводу створення Академії наук між М.С. Грушевським і В.І. Вернадським. Учений був прихильником створення Академії наук в Україні на зразок Петербурзької Академії наук. М.С. Грушевський писав з цього приводу: «Ви знаєте, що у нас тепер немає достатньої кількості вчених-українців за межами українознавства. Отже, ми повинні звернутися до росіян. Мине ще чимало часу, доки сили ці у нас з'являться». Позиція В.І. Вернадського була такою: «Важливо створити сильний центр наукових досліджень українського народу, його історії, його мови, природи України. Звичайно, треба вести ці дослідження в найширшому загальнолюдському масштабі. Треба якнайшвидше створювати кафедри і лабораторії, інститути, які спочатку, можливо, й будуть зайняті росіянами. Але становище скоро зміниться, бо посади в Академії виборні. Дуже скоро заявлять про себе місцеві сили».

13 вересня 1918 р. на засіданні комісії за доповіддю В.І. Вернадського було ухвалено заснувати щорічні асигнування на наукові роботи, експедиції та ін. Комісія подбала про Ботанічний сад Києва, про створення Геодезичного інституту, розробила Статут Академії наук. У жовтні 1918 р. В.І. Вернадського обирають першим президентом Української Академії наук (УАН). Фізико-математичне відділення Академії прийняло тематику В.І. Вернадського – почалося створення біогеохімічної лабораторії. Першим відкриттям було повідомлення про наявність в організмі мишей нікелю. Геохімічне дослідження рослин стало основою гіпотези, що в землі є вже відомі тоді 87 хімічних елементів.

З приходом більшовиків становище УАН погіршилося. В.І. Вернадський захворів на висипний тиф і всю зиму 1919-1920 рр. лікувався. Подальший життєвий шлях В.І. Вернадського

складається так: 1920 р. – обирається ректором Таврійського університету, 1921 р. – повертається у Петроград, де призначений директором Радієвого інституту, 1922-1926 рр. – відрядження до Франції на запрошення Сорбонни для читання лекцій з геохімії. З поверненням у Ленінград видає монографії «Біосфера», «Нариси з геохімії», організовує відділ живої речовини в АН СРСР, створює Комісію з вивчення важкої води і головує в ній. У 1935 р. переїжджає до Москви; бере участь в організації ряду наукових комісій, працює над проблемою «життя в космосі». У роки війни був евакуйований у Борове Кокчетавської області. У 1944 р. видав останню працю «Декілька слів про ноосферу».

Різномановна творча спадщина В.І. Вернадського привертає увагу багатьох вчених світу. Важливе місце в його діяльності займали, зокрема, *мінералогія* і *кристалографія*. Серед основних завдань мінералогії В.І. Вернадський розглядає питання генезису мінералів: «Мінералогія являє собою хімію земної кори. Вона ставить завдання вивчення як продуктів природних хімічних процесів, так званих мінералів, так і самих процесів. Вона вивчає зміни продуктів і процесів у часі в різних природних умовах земної кори. Вона досліджує взаємні природні асоціації мінералів (їх парагенезис) і закономірності в їх утворенні». В.І. Вернадський дослідив історію виникнення в земній корі важливих мінералів, визначив хімічний склад і фізико-хімічні умови утворення багатьох з них. «Геохімія – наука двадцятого століття, – писав В.І. Вернадський, – вона могла виникнути лише після появи сучасного наукового уявлення про атоми і хімічні елементи, але корені її сягають глибоко в минуле науки... Геохімія науково вивчає хімічні елементи, тобто атоми земної кори і наскільки можливо – всієї планети. Вона вивчає їх історію, їх розподіл і рух у просторі – часі, їх генетичне на нашій планеті співвідношення». Все життя працював В.І. Вернадський над проблемами *радіогеології*. Він писав: «Зараз можна і потрібно говорити про новостворену науку – *радіологію*, науку про радіоактивні властивості нашої планети, про те, що відбувається в ній, про її властиві, особливо радіоактивні явища. Ця нова галузь знань перебуває у швидкому становленні і повинна зараз бути освоєна і продумана і теоретично, і практично. Бо вона не тільки має для нас глибоке значення, оскільки зв'язує з новою фізикою і новою хімією – в конкретній земній ситуації – науці про життя і про нас самих, але й тому, що вона дає в руки людини нові шляхи і нові форми оволодіння природою, нову

силу»[2].

В.І. Вернадський – також творець нового наукового напрямку, який пізніше переріс у самостійну науку – *біогеохімію*: «Я впевнений в тому, що в основі геології лежить хімічний елемент – атом і що в навколишній природі – в біосфері – живі організми відіграють першочергову, можливо головну роль. Виходячи з цих ідей, виникли в нас і геохімія і біогеохімія».

В.І. Вернадський – основоположник *вчення про біосферу*, яке має величезне науково-практичне значення. Воно є основою пізнання законів розвитку природи, зокрема «колиски» людської цивілізації – Землі; розробки заходів, необхідних для її охорони від негативних природно-техногенних змін, та їх передбачення. Це необхідно сучасній людині, щоб вижити на планеті, забезпечити майбутнє своїм нащадкам. Адже, як писав великий Гете: «Люди підкоряються законам природи навіть тоді, коли діють проти них».

У системі біокосмічних поглядів В.І. Вернадського ключове положення займає поняття *живої речовини* – сукупності всіх рослинних і тваринних організмів планети. Завдяки введенню цього поняття був досягнутий, щонайменше, подвійний ефект. По-перше, були залишені поза увагою, різні псевдотеоретичні і спекулятивні дослідження щодо "сутності" життя як такого. По-друге, живі організми стали визнаватися компонентами земної кори, настільки ж природними і "рівноправними", як мінерали і гірські породи, але набагато переважаючими останніх за своєю геологічною активністю, що особливо яскраво проявляється у діяльності людства – складової частини живої речовини планети. «У плані цієї активності, – відзначав В.І. Вернадський, – порівняти з живою речовиною можна лише радіоактивні мінерали Землі». Звідси полягала головна своєрідність вихідної позиції В.І. Вернадського – можливість і необхідність вивчення живих організмів та їх спільнот не тільки у традиційно біологічному плані, але також і як об'єкта геології. Цей вироблений В.І. Вернадським у науковому пізнанні поворот "системи відліку", необхідність якого була обґрунтована ним з великою переконливістю і глибиною, зробив справді революційний вплив не тільки на біологію та геологію, а й на весь комплекс наук про Землю.

У своєму вченні про живу речовину В.І. Вернадський перш за все зосереджує увагу на складових елементах і структурі живої речовини. За В.І. Вернадським, складовим живої речовини можна вважати: по-перше, самі живі організми; по-друге, життєве середовище; по-

третє, всі виділення живих організмів (гази, екскременти і т.д.), що знаходяться в земній корі; по-четверте, відмерлі частини організмів. Таким чином, у розумінні В.І. Вернадського, будова та склад живої речовини внутрішньо суперечливі, вони являють собою єдність протилежностей – живого і косного, біогенного і абіогенного, живого і мертвого. При фіксації елементів та структури живої речовини, вважав В.І. Вернадський, по можливості повинен братися до уваги часовий аспект: чим коротший проміжок часу, в межах якого така фіксація відбувається, тим точніше буде визначено живу речовину [6].

Звертаючись безпосередньо до проблем екології живих організмів та їх спільнот, вчений розглядає основні форми існування живої речовини. Такими формами, за В.І. Вернадським, є: 1) плівки життя, наприклад, плівки планктонних і бентосних організмів у межах океану; 2) згущення – в атмосфері, в гідросфері, в прикордонних областях гідро- і літосфери (ділянки припливів і відпливів, прибережні морські та океанічні території) та у літосфері (озера, ставки, річки, ґрунтові води, болота, торфовища, ліси, степи, луки); 3) розрідження – в атмосфері (повітряний простір у горах), в гідросфері (нижні шари деяких морів, крижані покриви) і в літосфері (пустелі різних типів, льодовики, піски, скелясті оголення). Розрідження розкидані серед згущення живої природи і взаємодіють з ними. "Первинні згущення не залишаються незмінними. Скрізь у природі між ними відбувається боротьба, йде перехід одних згущень в інші". Переходи ці двоякого роду: згущення одного типу переходять в інші (ліс/степ) або відбувається видозміна згущення (хвойний ліс/листяний ліс) [6].

Розглядаючи динаміку живої речовини, В.І. Вернадський звертається до аналізу таких проблем, як організм і середовище, жива речовина і еволюція видів, розмноження живих організмів, швидкість заселення планети, тиск життя, розтікання живої речовини, харчові ланцюги, жива речовина і другий закон термодинаміки, поле існування життя, межі живого, латентний, потенційний і стаціонарний стан живої речовини та ін. В.І. Вернадський виділяє далі наступні основні властивості живої речовини: масу (вагу), геохімічну енергію і хімічний склад, які в сукупності визначають інтенсивність таких найважливіших його геологічних функцій, як газова, концентраційна, окислювально-відновлювальна, метаболічна. У дослідницькій та історико-науковій літературі вчення В.І. Вернадського про живу речовину зазвичай

не виділяється в самостійну галузь наукового знання і, як правило, використовується в біогеохімії [6].

Багато уваги у своїх працях В.І. Вернадський приділяв зеленій речовині рослин, тобто хлорофілу, оскільки лише він здатний кристалізувати променисту енергію Сонця та з її допомогою створювати первинні органічні сполуки з вуглекислого газу, повітря і водних розчинів. Розглядаючи обсяг і енергетичні коефіцієнти різних груп рослинності, вчений дійшов висновку, що головними трансформаторами сонячної енергії в хімічну енергію біосфери є одноклітинні зелені водорості океану, що дуже швидко розмножуються. Значну роль у цьому процесі відіграють також ліси тропічного поясу. Ось чому інтенсивне вирубування тропічних лісів у Південній Америці, Африці та Індонезії, забруднення океану, що пригнічує ріст водоростей, є вкрай несприятливими факторами, що порушують екологічну рівновагу біосфери. Наприкінці ХХ ст. В.І. Вернадський узагальнив і поширив проблему простору-часу на простір і час живої матерії: «... повертаючись до живої речовини, ми базуватимемося на тому, що в ній – в її прояві взагалі – час і простір нероздільні». Мислитель підходив до дослідження простору-часу як до явища, котре має будову, тобто структуру, підкреслюючи, що це явище не тільки структурно, а й фізично володіє різними станами. Він наполягав на значних відмінностях, які існують між часом, що вимірюється всередині живих організмів, і часом «косної» («неживої») матерії.

У праці «Автотрофність людства», опублікованій 1925 р. у Парижі, учений вперше написав про те, що в біосфері існує велика геологічна, можливо навіть космічна, сила. Вона не є проявом енергії чи формою, проте вплив її на перебіг земних енергетичних явищ – «глибокий і сильний, і повинен мати відбиток, хоч і менш сильний, але, безперечно, і поза земною корою, в бутті самої планети». Ця сила – «розум людини, спрямована та організована воля як істоти суспільної» В.І. Вернадський не лише підкреслював міць впливу людського суспільства на середовище, а й наголошував: «Воно одне змінює в новий спосіб і з наростаючою швидкістю структуру самих основ біосфери. Воно стає дедалі незалежнішим від інших форм життя та еволюціонує до нового життєвого прояву» [6].

Мислитель наполягав на нерозривності зв'язку людини з живою речовиною планети, з сукупністю організмів, які водночас існують з нею чи існували до неї, і, насамперед, – похо-

дженням. «Хоч як далеко занурювалися б ми в минуле, – писав він, – можемо бути певними, що зустрінемо в ньому живі покоління, поза сумнівом, генетично зв'язані одне з одним». Навіть більше, вчений орієнтовно підрахував кількість поколінь (понад 200), які заступали одне одного від часу народження у людському суспільстві великих конструкцій релігії, філософії та науки. «Кілька сотень поколінь відділяють нас від епохи, коли з'явилися перші зародки людського мистецтва, музики, міфів та магії, з яких виростили релігії, наука, філософія. ... Хоч як далеко заходила б наша думка або наші наукові дослідження в геологічне минуле землі, ми констатуємо те саме явище існування в земній корі єдиного цілісного життя». Слід віддати належне правдивості вченого – він зізнався в тому, що походження людини на Землі було найглибшою космічною таємницею для еллінів і такою самою таємницею залишилося для нас. Водночас, він поділяв принцип флорентійського натураліста Ф. Реді (1626–1698 рр.), який твердив, що будь-який живий організм походить від іншого живого організму. А тому В.І. Вернадський не погоджувався з твердженням, що начебто живий організм зародився в земній корі завдяки самочинним змінам «косної» матерії. Він наполягав на тому, що з позицій науки ми не можемо розглядати життя інакше, як явище, що існує неперервно від найдавніших геологічних епох, і жива речовина впродовж усього часу еволюції була різко відділена від «косної» матерії. «... очевидно, – писав В. І. Вернадський, – життя не є просте виключно земне явище, але, наскільки принцип Реді відповідає реальності, має розглядатися як космічне явище історії нашої планети. І також очевидно, що моноліт життя в цілому не є простим зібранням окремих неподільних, випадково зібраних частин, але є складною організованістю, частини якої мають функції, які взаємодоповнюють одна одну і допомагають одна одній» [6].

В.І. Вернадський відніс до біосфери ширші шари земних оболонок, де не тільки мешкають живі організми, а й знаходяться речовини, створені в минулому живою матерією (торф, кам'яне вугілля, осадові породи тощо). Він розглядав біосферу не просто як просторову категорію, а як складну єдину систему – оболонку, в якій живі істоти перебувають у складній взаємодії як із неживою природою (повітрям, водою, сонячною енергією), так і між собою, і цим визначають хімічний стан зовнішньої кори нашої планети.

Мислитель визначив межі біосфери, вказа-

вши, що до неї входять уся гідросфера Землі, верхня частина літосфери до глибини 2–3 км, де ще є живі бактерії, і нижня частина атмосфери. Він розглядав біосферу як зону перетворення цієї космічної енергії трансформаторами, що в ній знаходяться [6].

Основні ідеї В.І. Вернадського про ноосферу викладені в його визначній монографії «Наукова думка як планетне явище» та у статті «Деякі слова про ноосферу». В останній він пише: «Людство, взяте в цілому, стає могутньою геологічною силою. І перед ним, перед його думкою та працею, постає питання про перебудову біосфери в інтересах вільно мислячого людства як єдиного цілого. Цей новий стан біосфери, до якого ми, не помічаючи цього, наближаємось, і є «ноосфера» [1]. «Ноосфера, – розвиває вчений свою думку в іншій праці [2], – нове геологічне явище на нашій планеті. У ній вперше людство стає найбільшою геологічною силою. Вона може і повинна перебудувати своєю працею і думкою сферу свого життя, перебудувати докорінно порівняно з тим, що було раніше. Перед нею відкриваються дедалі ширші творчі можливості. І, може бути, покоління моєї онуки вже наблизиться до їх розквіту. Ми входимо в ноосферу. Ми вступаємо в неї у новий стихійний геологічний процес... Але важливий для нас факт, що ідеали нашої демократії ідуть в унісон зі стихійним геологічним процесом, із законом природи, відповідають ноосфері. Можна дивитись тому на наше майбутнє впевнено. Воно в наших руках. Ми його не випустимо» [2].

За цими словами стоїть величезний оптимізм ученого, його впевненість у тому, що ноосферний шлях розвитку біосфери – передумова її повного і безперечного благополуччя. Геніальні узагальнення, теоретичні роздуми, філософські та природознавчі прогнози і гіпотези, глибокий зв'язок природознавства і філософії у працях В.І. Вернадського – все це свідчить про неперевершену його роль в історії науки. Сам цей великий учений ще в 30-і роки минулого століття сформулював основні глобальні проблеми природознавства й суспільствознавства, причому багато які з них розв'язав. «В.І. Вернадський, – згадував М.Г. Холодний, – виявляв живий інтерес до найрізноманітніших питань науки, філософії, культури, громадського життя» [5].

Література

1. Вернадский В.И. Несколько слов о ноосфере / В.И. Вернадский // Успехи биол. – 1944. – Т. 18, Вып. 2. – С. 113–120.
2. Вернадский В.И. Философские мысли натуралиста / В.И. Вернадский – М.: Наука, 1988. – 520 с.

Він був «хрещеним батьком» багатьох видатних вчених сучасності, створив десятки нових науково-дослідних інститутів, музеїв, наукових шкіл. З наукової школи В.І. Вернадського вийшли талановиті вчені: А.Е. Ферсман, Д.І. Щербаков, А.П. Виноградов, В.Г. Хлопін, К.А. Ненадкевич, К.А. Власов, А.А. Сауков, Я.В. Самойлов та ін. [3].

За видатні праці в галузі науки і техніки В.І. Вернадському було присуджено Державну премію СРСР (1943 р.); учений нагороджений орденом Трудового Червоного прапора. В АН СРСР і Московському державному університеті ім. М. Ломоносова з 1945 р. встановлено по 2 стипендії ім. В. І. Вернадського. Крім того, в АН СРСР було затверджено грошову премію (з 1943 р.) і золоту медаль (з 1963 р.) ім. В.І. Вернадського.

В історії науки важко знайти вченого, який зробив би так багато для людства, як В.І. Вернадський. Лише геній задовго до появи висотної авіації і космічних кораблів міг так пророчо уявити собі Земну кулю: «Своєрідним, єдиним у своєму роді, відмінним і неповторним в інших небесних тілах являється нам Лик Землі – її зображення в Космосі, що вимальовується зовні, з боку, з глибини безмежного небесного простору. В Ликі Землі проявляється поверхня нашої планети – біосфера, зовнішня оболонка, що відділяє її від космічного середовища» [4].

Завдяки його проникливості і могутньому інтелекту сформульовано нові погляди на природу, він розробив учення про біосферу, створив концепцію ноосфери як важливої фази її еволюції. Геніальні ідеї В.І. Вернадського – про геологічну вічність життя, про планетарну роль людини і людства, про розширення наукової свідомості у світі – вражаюче сучасні, точні, з великим пророчим потенціалом.

Праці вченого мають неоціненне світоглядне значення, оскільки спонукають нас заглиблюватись у проблему місця та ролі людини у природі й суспільстві, замислитись над питанням нашого місця і ролі у житті. Написані майже століття тому праці вченого нині актуальні, а його наукові погляди – сучасні. В.І. Вернадський – один із геніальних мислителів і пророків людства, які, за словами Льва Толстого, «здатні бачити через голови інших людей і століть» та вести їх за собою [4].

3. Галицька Е.А. Життєвий шлях і наукова спадщина В.І. Вернадського / Е.А. Галицька, О.К. Прімерова // Статистика України. – 2011. – №2. – С. 79-83.
4. Ситник К., Багнюк В. Він бачив через століття / К. Ситник, В. Багнюк // Вісн. НАН України. – 2003. – № 2. – С. 51–62.
5. Холодный Н.Г. Из воспоминаний о В.И. Вернадском / Н.Г. Холодный // Почвоведение. – 1945. – № 7. – С. 352.
6. Web-сторінка «Наукова бібліотека»: [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://pulib.if.ua/referat/view/18184>
7. Web-сторінка «Эрудиция»: [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.erudition.ru>

ГУМЕНЮК Г.Б.¹, ЗАГОРОДНА В.С.¹, ГОЛУБЕНКО А.В.², ДРОБИК Н.М.¹
¹ Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: drobyk.n@gmail.com
² Київський національний університет імені Тараса Шевченка
ННЦ “Інститут біології” Ботанічний сад ім. акад. О.В. Фоміна
Україна, 01032, м. Київ, вул. Симона Петлюри, 1, e-mail: holubenko@yahoo.com

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*

ПРОВЕРКА МОДЕЛИ КАНАЛИЗОВАННОЙ ХРОМОСОМНОЙ ЭВОЛЮЦИИ НА НОВОМ ТЕРИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Модель канализованной хромосомной эволюции [1] описывает процесс эволюции кариотипов исходя из предположения о существенном влиянии цитогенетической организации генома на приспособленность особи. Согласно данной модели, кариотип является существенным аспектом адаптивной стратегии организма, а для каждой адаптивной зоны существует оптимальный кариотип, в становление которого вовлекаются определенного типа хромосомные перестройки. Современная интерпретация модели канализованной хромосомной эволюции подразумевает, что число и размеры групп сцепления (т.е. хромосом), положение центромер и другие характеристики кариотипа подвергаются наиболее сильному давлению отбора в тот период, когда группа организмов попадает в новую адаптивную зону, и именно в этот период следует ожидать наиболее высоких скоростей хромосомной эволюции. В тех же группах, где в результате подобных процессов уже сформированы оптимальные для данной адаптивной зоны кариотипы, должны наблюдаться умеренные и даже низкие скорости преобразований хромосомных наборов [2]. Авторы немногочисленных аналитических работ, в которых предпринимались попытки осуществить проверку модели канализованной хромосомной эволюции, при-

шли к взаимоисключающим выводам, свидетельствующим как в пользу [3], так и против [4] данной гипотезы. Обычно наличие клинального характера изменчивости рассматривается как свидетельство в пользу адаптивности того или иного признака. Особенно впечатляет совпадение градиентов изофен и градиента аллельных частот с градиентом каких-либо физико-географических условий. Это совпадение почти всегда воспринимается как безоговорочное доказательство адаптивного значения анализируемого признака [5]. Все это может иметь отношение и к хромосомной изменчивости, наличие клины по которой, совпадающей с градиентом физико-географических условий, может указывать на подверженность данного признака отбору и соответственно служить косвенным свидетельством в пользу модели канализованной хромосомной эволюции.

В настоящем сообщении для проверки гипотезы канализованной хромосомной эволюции анализируются собственные и известные из литературы данные по внутривидовой хромосомной изменчивости кариотипа у некоторых видов грызунов из северо-восточной Африки и Северной Палеарктики. Обнаруженные хромосомные градиенты сопоставляются с физико-географическими градиентами.

Материал и методы

Использованный в работе материал включал выборки следующих видов грызунов: *Desotomys harringtoni* из окрестностей Аддис-Абебы (Н=2500 м над ур.м.), Эфиопия, 3 экз.; *Terricola subterraneus* из окрестностей метеостанции “Пожижевская” Ивано-Франковской обл., Украина, 6 экз., из Воронежского заповедника, 3 экз.; *Sicista subtilis* из окр. с. Дьяковка, 3 экз. в Заволжье Саратовской обл.; *S. betulina* из бассейна р. Валдайка в Новгородской обл., 4 экз.,

близ Звенигорода Московской обл., 3 экз., из окрестностей метеостанции “Пожижевская” Ивано-Франковской обл., Украина, 6 экз. Все использованные в работе выборки были кариологически датированы. Препараты митотических хромосом получали в соответствии со стандартной методикой воздушно-высушенных препаратов, а механизм хромосомных перестроек исследовали с помощью С- и G-окраски хромосом.

Результаты и обсуждение

Изменчивость кариотипа у эфиопского эндемика *Desmomya harringtoni*

В 52-хромосомном кариотипе этого эндемичного для Эфиопского плато узкоареального вида, населяющего участки буша на высотах от 1800 до 2800 м над ур.м., т.е. в распределении которого наблюдается высотный градиент, выявлена клинальная изменчивость по числу пар добавочных коротких гетерохроматиновых плеч. Мы исследовали кариотипы трех особей из окр. Аддис-Абебы (Н=2500 м над ур.м.). Показано, что кариотип особей из этого пункта отлова состоит из 12 пар субметацентрических и 13 пар субтелоцентрических аутосом, X-хромосома представлена самым крупным в наборе субметacentриком, а Y-хромосома – небольшим двуплечим элементом. При С-окрашивании во всех аутосомах и X-хромосоме обнаруживается прицентроммерный гетерохроматин, а в 9 парах аутосом гетерохроматин добавочных коротких плеч, Y-хромосома полностью гетерохроматична. Сопоставляя полученный нами результат с известными из литературы данными, следует отметить, что цитогенетическая структура особей этого вида, добытых на разных абсолютных высотах Эфиопского плато различается по числу пар аутосом с добавочными короткими гетерохроматиновыми плечами: 6 - в кариотипе особей из окр. Амбо (Н=2000 м над ур.м.) [6], 8 – у экземпляров из Менагешы и Солулты (Н=2300 м над ур.м.) [7] и 9 – в нашем случае. Результаты пространственного распределения разнохромосомных форм этого вида согласуются с моделью канализованной хромосомной эволюции, в соответствии с которой для каждой адаптивной зоны существует оптимальный кариотип, в формирование которого в данном случае были вовлечены хромосомные перестройки типа делеций-дупликаций гетерохроматических участков хромосом, определившие характер межпопуляционной изменчивости в числе пар аутосом с добавочными гетерохроматиновыми плечами.

О клинальном характере хромосомной изменчивости у *Terricola subterraneus*

Ареал *T. subterraneus*, подземной полевки простирается, охватывая как равнинные, так и высокогорные (до 1800 м над ур.м.) участки от северной и центральной Франции до правобережья Дона на территории России. На юг – до южных склонов Альп, центральных частей Балканского п-ва, Болгарии, европейской части Турции и приблизительно 48 с. ш. на Украине. К северу проникает до широты Петербурга. К на-

стоящему моменту исследованы кариотипы подземной полевки из более чем 60 пунктов ее обширного ареала [8]. Показана высокая степень хромосомной изменчивости как на межпопуляционном, так и на внутривидовом уровне. Однако клинальный характер выявлен лишь в географической изменчивости величины полностью гетерохроматичной акроцентрической Y-хромосомы, маркируемой с помощью С-окраски хромосом. Так, у 52-хромосомной формы *T. subterraneus* были выявлены три размерных варианта Y-хромосомы: крупная – в Альпах [9], средняя – в Татрах [10] и мелкая – в Восточных Карпатах и Воронежской области [11, наши данные]. Т.е., в географической изменчивости полностью гетерохроматичной акроцентрической Y-хромосомы у 52-хромосомной формы *T. subterraneus* прослеживается тенденция уменьшения величины этой гетерохромосомы в направлении с юго-запада на северо-восток: в этом же направлении увеличивается континентальность климата. Подобного рода хромосомная изменчивость определяется механизмом типа делеций-дупликаций полностью гетерохроматичных участков Y-хромосомы. Наличие клины в изменчивости Y-хромосомы у 52-хромосомной формы *T. subterraneus* и ее совпадение с градиентом физико-географических условий может свидетельствовать в поддержку гипотезы канализованной хромосомной эволюции [1].

О клинальной изменчивости кариотипа у степной *Sicista subtilis* и лесной *S. betulina* мышовок

Ареал политипического вида степной мышовки – *S. subtilis* занимает значительную часть зоны степей и лишь частично заходит в зону полупустынь Евразии, простираясь от восточной Австрии до Байкала. Хотя облик степей остается почти неизменным на всем их огромном протяжении, но с запада на восток наблюдается существенное изменение континентальности, а к югу при переходе от зоны степей к зоне полупустынь соответственно наблюдается нарастание аридности климата. Возникает вопрос, совпадает ли характер географической изменчивости кариотипа у степной мышовки с градиентом физико-географических условий? Анализ имеющихся на сегодня сведений о хромосомных наборах степной мышовки указывает на их значительную вариабельность и важное значение факторов изоляции в ее становлении [12]. Выявление же клинальной изменчивости кариотипа у степной мышовки может указывать на роль отбора в становлении внутривидовой

хромосомной изменчивости. В этой связи интересно проследить за географической изменчивостью кариотипа у 24-хромосомных форм степной мышовки, зарегистрированных в восточной части ареала вида к востоку от русла Волги и в некоторых пунктах Правобережья [13]. Известно, что вариабельность кариотипа у 24-хромосомных степных мышовок определяется изменчивостью формы хромосом 8-10 пар, которые могут быть представлены как двуплечими, так и акроцентрическими элементами [13, 14]. Природа данных хромосомных перестроек не установлена. Можно предположить, что подобного рода хромосомная изменчивость в морфологии 8-10 пар аутосом у 24-хромосомных степных мышовок определяется перичентрическими инверсиями или же механизмами типа делеций-дупликаций. Мы исследовали хромосомные наборы трех особей степной мышовки из Заволжья Саратовской области (окр. с. Дьяковка), у которых обнаружили стабилизацию гомозиготных вариантов акроцентрической формы 8-10 пар аутосом. Сопоставляя полученные нами данные с накопленным на сегодня материалом по кариологии 24-хромосомных форм степной мышовки, следует отметить, что в географической изменчивости их кариотипа прослеживается тенденция к закономерному увеличению числа акроцентрических аутосом в хромосомных наборах особей из восточной части ареала вида к востоку от левобережья Волги: от их отсутствия в кариотипе особи из наиболее восточной части ареала вида - в Туве, 1-2 - у особей из Красноярского края, 2-5 у особей из Курганской области. 4-5 у экземпляров из Волжско-Уральских песков, до максимума (6) у исследованных нами особей из Заволжья Саратовской области [13, 14, наши данные]. Отмеченный градиент в частоте встречаемости акроцентрических аутосом, обусловленный вариабельностью морфологии 8-10 пар, в кариотипе 24-хромосомной *S. subtilis* из популяций к востоку от русла Волги, предположительно, имеет адаптивный характер и может служить косвенным аргументом в поддержку модели канализованной хромосомной эволюции.

У лесной мышовки *S. betulina* основная часть ареала лежит в лесной зоне Палеарктики, откуда зверьки этого вида проникли в европейскую лесотундру и в лесостепные районы Зауралья и Сибири [15]. У этого вида были изучены кариотипы из 19 пунктов его обширного ареала [15, и др.]. У всех изученных зверьков обнаружен 32-хромосомный кариотип, в котором подавляющее большинство хромосом представлено

двуплечими элементами. Выявлена меж- и внутривидовая изменчивость в морфологии 2-й пары аутосом. Эта пара может быть представлена как двумя субметацентриками, так и гетероморфной парой, «субметацентрик-субтелоцентрик». Механизм этой перестройки, равно как закономерности ее распределения по ареалу не установлены. В то же время, проведенный нами сравнительный анализ *S*-окрашенных кариотипов у особей *S. betulina* из трех расположенных на разных широтах пунктов в Восточно-Европейской части ареала: 1) из бассейна р. Валдайка в Новгородской обл. (4 экз.), 2) из окр. Звенигорода в Московской обл. (3 экз.) и из 3) окр. метеостанции «Пожижевская» в Ивано-Франковской обл. в Украине (6 экз.) выявил закономерное увеличение количества гетерохроматина по направлению с севера на юг. Так, в *S*-окрашенных кариотипах особей *S. betulina* из Новгородской обл. выявляются интенсивно окрашенные, но относительно небольшие блоки прицентромерного гетерохроматина в трех крупных парах из группы мета-субметацентрических аутосом и в четырех субтелоцентрических аутосомах. У *X*-хромосомы прокрашивается добавочное целиком гетерохроматиновое плечо, *Y*-хромосома *S*-негативна. У всех исследованных экземпляров из Московской области локализация гетерохроматина сходная, за исключением величины *S*-блоков прицентромерной локализации (они заметно крупнее). *Y*-хромосома очень слабо прокрашивается при *S*-окрашивании. В *S*-окрашенных кариотипах особей из Ивано-Франковской области гетерохроматина больше за счет увеличения числа пар хромосом в группе мета-субметацентриков с крупными интенсивно окрашенными центромерными блоками (четыре пары) и прокрашивания *Y*-хромосомы. Кроме того в популяции лесных мышовок из Ивано-Франковской области выявлен полиморфизм по характеру *S*-окраски. У двух особей из исследованных шести, в первой паре аутосом был выявлен крупный блок гетерохроматина интеркалярной локализации, обнаруженный в гетерозиготном состоянии. Выявленная нами клинальная изменчивость по хромосомным перестройкам типа делеций-дупликаций гетерохроматина в восточно-европейских популяциях лесной мышовки, совпадающая с физико-географическим широтным (климатический, растительный) градиентом также может трактоваться в поддержку гипотезы канализованной хромосомной эволюции [1]

Однако, следует подчеркнуть, что клинальный характер изменчивости может быть не

только свидетельством адаптивности того или иного признака, но и результатом интрогрессивной гибридизации двух ранее изолированных популяций, приобретших в прошлом в условиях изоляции мономорфизм по разным вариантам исследуемого признака, а ныне интерградирующих в широкой области при отсутствии существ-

венных физико-географических барьеров [16]. Поэтому при всей кажущейся, на первый взгляд, иллюстративности приведенных в настоящем сообщении примеров зависимости клинального характера хромосомной изменчивости от физико-географических градиентов не следует пренебрегать последним обстоятельством.

Выводы

В ходе сравнительного анализа собственных и литературных данных по географической изменчивости кариотипа у четырех видов грызунов (эфиопского эндемика *Desmomys harringtoni* и трех Палеарктических видов: *Terricola subterraneus*, *Sicista subtilis* и *S. betulina*) были выявлены клины (высотный для первого и географические для трех других видов), совпадающие с физико-географическими градиентами. Для *D. harringtoni*, *T. subterraneus* и *S. betulina*

установлена природа выявленных хромосомных градиентов: они связаны с вариабельностью гетерохроматина. Наличие клин в хромосомной изменчивости (если исключить их возможное объяснение как результат интрогрессивной гибридизации ранее изолированных популяций) может указывать на подверженность данного признака отбору и соответственно служить косвенным свидетельством в пользу модели канализованной хромосомной эволюции.

Исследование поддержано РФФИ (грант No 12-04-01139 а).

Литература

1. Bickham J.W., Baker R.J. Canalization model of chromosomal evolution // Bull. Carnegie Mus. Natur. Hist. – 1979. – Vol. 13. – P. 70-84.
2. Гилева Э.А. Хромосомная изменчивость и эволюция. – М.: Наука, 1990. – 141 с.
3. Nevo E. Adaptive convergence and divergence of subterranean mammals // Annual Review of Ecology and Systematics. – 1979. – Vol. 10. – P. 269-308.
4. Sites J.W., Moritz C. Chromosomal evolution and speciation revisited // Syst. Zool. – 1987. – Vol. 36. – № 2. – P. 153-174.
5. Dobzhansky Th. Genetics of the Evolutionary Process. – N.Y., London: Columbia Univ. Pr., 1970. – 505 p.
6. Орлов В.Н., Булатова Н.Ш., Милишников А.Н. Кариотипы некоторых видов грызунов и насекомоядных млекопитающих Эфиопии // Эколого-фаунистические исследования в Юго-Западной Эфиопии. – М.: Наука. – 1989. – С. 95-109.
7. Capanna E., M.V. Civitelli, D. Bizzocco, M. Corti. The chromosomes of *Desmomys harringtoni* (Rodentia, Muridae) // Ital. J. Zool. – 1996. – Vol. 63. – P. 37-40.
8. Баскевич М.И., Козловский А.И., Митев Д.Б. Новые данные по хромосомной изменчивости подземной полевки *Terricola subterraneus* (Rodentia, Cricetidae) // Зоол. журн. – 2000. – Т. 79, Вып. 11. – С. 1355-1361.
9. Gamperl R., Ehmann C.H., Bachmann K. Genome size and heterochromatin variation in rodents // Genetics. – 1982. – Vol. 58. – P. 199-212.
10. Zima J. A chromosomal banding study of *Pitymys subterraneus* (Arvicolidae, Rodentia) // Folia Zool. (Brno). – 1984. – Vol. 33. № 3. – P. 223-228.
11. Baskevich M.I. To the question on karyology and systematics of the subgenus (genus) *Pitymys* from the USSR // Fifth Int. Congress. Rome. Abstracts. – 1989. — Vol. 1. – P. 6-7.
12. Баскевич М.И., Опарин М.П., 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.
13. Соколов В.Е., Баскевич М.И., Ковальская Ю.М. Изменчивость кариотипа степной мышовки *Sicista subtilis* Pallas и обоснование видовой самостоятельности *S. severtzovi* Ognev // Зоол. Журн. – 1986. – Т. 65, Вып. 11. – С. 1684-1692.
14. Ковальская Ю.М., Федорович Е.Ю. К распространению хромосомных форм степной мышовки *Sicista subtilis* (Rodentia, Dipodoidea) // Зоол. Журн. – 1997. – Т. 76, Вып. 12. – С. 1430-1433.
15. Соколов В.Е., Ковальская Ю.М., Баскевич М.И. О видовой самостоятельности мышовки Штранда *Sicista strandi* (Rodentia, Dipodoidea) // Зоол. Журн. – 1989. – Т. 68, Вып. 10. – С. 95-106.
16. Воронцов Н.Н. Развитие эволюционных идей в биологии. – М.: Изд. Отдел УНЦ ДО МГУ, Прогресс-Традиция, АБ. – 1999. – 640 с.

BASKEVICH M.I.

Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS

Russia, 119071, Moscow, Leninskii pr. 33, e-mail: mbaskevich@mail.ru

TESTING OF A CANALIZATION MODEL OF ADAPTIVE CHROMOSOMAL EVOLUTION ON A NEW THERIOLOGICAL MATERIAL

Aims. The attempt to test a canalization model of adaptive chromosomal evolution which implies that for each adaptive zone there is an optimum karyotype by that can be evolved chromosomal rearrangements has been made on a new theriological material. **Materials and methods.** The intraspecies chromosomal variability in some African (*Desmomys harringtoni*) and Palaearctic (*Terricola subterraneus*, *Sicista subtilis* and *S. betulina*) species of rodents has been analyzed, using G-, C-banding. **Results.** The altitudinal and (or) geographical gradients in intraspecies chromosomal variability which agree with gradients in physical and geographical conditions have been marked for models under consideration. **Conclusions.** Clinal nature of chromosomal variability in objects under study can be considered as a support for a canalization model of chromosomal evolution, but also can be the result of introgressive hybridization of two previously isolated populations that have acquired in the past in isolation monomorphism on different variants of character, now mixed in a wide range in the absence of significant physical and geographical barriers.

Key words: rodents, species, chromosomal variability, clinal nature, canalization model.

О.И. ЖУК

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская 31/17, e-mail: zhuk_bas@voliacable.com

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФОТОСИНТЕЗА

Растения рассматривают как открытые системы, обменивающиеся веществом и энергией с окружающей средой [1]. Их эволюция сопряжена с необратимыми потоками энергии и вещества, которые могут быть превращены в работу сопряженных процессов. Биологическая эволюция реализовывалась путем увеличения удельного потока используемой энергии по мере усложнения организмов. Биологическая эволюция имела характер самовыдвижения и реализовывалась путем увеличения удельного потока используемой энергии по мере усложнения организмов. Историческое развитие биосферы сопровождалось уменьшением скорости диссипации энергии, которое является термодинамическим критерием эволюции биосферы. Эволюция фотосинтезирующих организмов имеет существенное значение для развития биосферы. Эволюцию биоты объясняют изменениями концен-

трации углекислоты в атмосфере за счет поступления его из глубин Земли.

Способность возбужденных светом молекул хлорофилла к обратимым окислительно-восстановительным реакциям лежит в основе протекающих в хлоропластах первичных процессов преобразования энергии света в электрохимическую. Считают, что на ранних этапах эволюции фотосинтеза хлорофилл непосредственно участвовал в реакции фотоокисления H_2O до O_2 , однако продолжительность его работы могла составлять всего несколько часов, поэтому в ходе эволюции фотосинтетического аппарата изменялись в направлении стабилизации и продолжительности функционирования, формирования сложных комплексов фотосистем, встроенных в тилакоиды, имеющих специфическую структуру и организацию [13, 15].

Материалы и методы

Эволюция фотосинтеза тесно связана с развитием биосферы живых систем, концентрацией CO_2 и O_2 в атмосфере. Интерпретация данных для фанерозоя (последних 570 млн. лет) показывает существование неоднократных колебаний биологической продуктивности биосферы

на внешние воздействия. В эпохи тектоно-магматической активизации, регионального метаморфизма, активного вулканизма концентрация CO_2 возрастает, что усиливает рост биомассы формирующейся в результате активного фотосинтеза. Считают, что фотосинтез появился

3000 миллионов лет назад, а существующие ныне покрытосеменные возникли около 300 миллионов лет назад [10, 15]. Между этими промежутками времени отмечены значительные изменения, которые сопровождались увеличением уровня O_2 снижением CO_2 в атмосфере. Наибольшее уменьшение CO_2 в атмосфере планеты началось примерно 120 миллионов лет назад и достаточно быстро достигло современного уровня, который считают практически неизменным последние 30–50 миллионов лет. Существенные колебания CO_2 в атмосфере идентифицированы в XX веке и обусловлены индустриализацией промышленности.

Эволюционно более древним у высших растений считают C_3 -тип фотосинтеза, при котором произошло усиление специфичности Рубиско к CO_2 в сторону большего преобладания карбоксильной реакции над оксигеназной [2]. Приспособление растений к жизни на суше сопровождалось появлением сосудистых растений, а затем и покрытосеменных. Снижение атмосферной концентрации CO_2 в условиях ограниченного снабжения водой и высокой температуры уменьшило эффективность C_3 -фотосинтеза и привело к появлению C_4 -фотосинтеза примерно 30 миллионов лет назад. Среди современных растений значительное количество видов осуществляет фотосинтез по C_3 -пути, однако в ре-

Результаты

Концентрация неорганического углерода у C_4 -растений на свету в 10 раз превышает то, что отмечают у C_3 -растений в соответствующих условиях. На свету скорость фотосинтеза по C_4 -пути значительно превышает ту, которую отмечают при осуществлении фотосинтеза по C_3 -пути.

Изучение эволюционного дерева покрытосеменных показало, что одиннадцать его порядков содержат C_4 -виды, которые широко распространены в различных ветвях эволюции и найдены среди большинства относительно недавно возникших, что позволяет отнести C_4 -путь к новым эволюционным формированиям.

Основное отличие между C_3 и C_4 -растениями проявляется при ограниченном освещении и вариациях температуры. В условиях низких температур среды и освещенности C_3 -путь фотосинтеза более эффективен, однако C_4 -растения при температурах выше 25–30 °C обнаруживают преимущества в скорости накопления сухой массы. C_4 -растения также более эффективно используют воду по сравнению с C_3 -растениями, однако последние характеризуются

на высоких температурах с аридным климатом широко распространены C_4 -растения. Типичным для C_4 -растений является необычная анатомия листьев, которую называли «кранц-анатомией» [16]. Она характеризуется концентрическим расположением клеток вокруг проводящих пучков. Внешние слои клеток формируют мезофилл, внутренние – обкладку. Первичная фиксация атмосферного CO_2 происходит в мезофилле в цикле Хетча–Слэка. Среди разнообразия C_4 -видов растений найдены различия в биохимии декарбоксилирования C_4 -кислот, которая осуществляется не только в хлоропластах. Одна из декарбоксилирующих систем была идентифицирована в митохондриях клеток мезофилла и продемонстрировано, что митохондрии принимают непосредственное участие в процессах C_4 -фотосинтеза. Растения с C_4 -типом фотосинтеза распределены на три подгруппы, которые объединяют анатомия и тип фиксации CO_2 в клетках мезофилла с образованием оксалоацетата и его преобразованием в малат или аспартат. Отличия между разными видами C_4 -растений заключаются в дальнейшем транспорте метаболитов от клеток мезофилла до клеток обкладки одного из этих соединений, декарбоксилировании с образованием CO_2 и дальнейшей его фиксации в цикле Кальвина уже в клетках обкладки.

повышенной устойчивостью к засухе.

В современных условиях содержание CO_2 в атмосфере Земли составляет небольшую часть общего фонда углерода, однако фотосинтез высших наземных растений и водорослей считают главной движущей силой цикла кругооборота углерода планеты и практически единственным способом стока CO_2 из атмосферы [4]. До середины XIX века процессы выделения и стока CO_2 считаются сбалансированными, однако с развитием индустриализации среднее значение CO_2 в воздухе возросло с 270 до 335 мкл/л, а к началу XXI века – до 367 мкл/л.

Увеличение скорости фотосинтетического газообмена и площади листьев в посевах современных культурных растений более значительно стимулирует прирост их сухой массы по сравнению с урожаем семян [8]. Реакции C_3 и C_4 растений на повышение концентрации CO_2 в воздухе оказались подобными, однако диапазон колебаний параметров фотосинтеза у C_4 -растений был выше по сравнению с C_3 -растениями. Увеличение содержания CO_2 в воздухе привело не только к увеличению площади листьев современных

растений, но и продолжительности жизни и толщины листьев, увеличению числа клеток мезофилла и хлоропластов в клетках, соотношения подземной и надземной частей растений [17]. В ответ на рост концентрации CO_2 уменьшилась устьичная щель, что привело к уменьшению проводимости водяного пара. Установлено, что в предыдущие геологические периоды снижение содержания CO_2 в атмосфере вызывало увеличение числа устьиц на единицу поверхности листа, а при его повышении – количество устьиц снижалось [11].

Влияние температуры на эффективность C_3 -фотосинтеза объясняют тем, что оксигеназная реакция, которую катализирует Рубиско, непропорционально усиливается с ростом температуры по сравнению с реакцией карбоксилирования. Оксигеназная реакция лежит в основе фотодыхания, которое растет непропорционально относительно фотосинтеза при повышении температуры и приводит к прогрессивному уменьшению эффективности C_3 -фотосинтеза. В процессе фотодыхания происходит светозависимое поглощение кислорода и образование CO_2 , превращение в хлоропласте фосфогликолата в гликолат, который мигрирует в пероксисомы, где в присутствии кислорода окисляется до глиоксилата глиоксалатоксидазой. Еще одним источником образования гликолата является транскетолазная реакция цикла Кальвина. Потеря CO_2 в результате темнового дыхания за сутки может составлять до 50% общего баланса углерода растений, что сопровождается повышением коэффициента дыхания поддержания при неизменном значении коэффициента дыхания роста [6].

Показано, что в листьях молодых растений повышение концентрации CO_2 в воздухе мало влияло на активность главного фермента фотосинтеза Рубиско, но в зрелых листьях она снижалась [12]. В условиях дефицита CO_2 в листьях C_3 -растений усиливается карбоангидразная система, которая, как полагают, ускоряет поток CO_2 в клетку и поддерживает его концентрацию в микропространстве у центров активации и карбоксилирования Рубиско [7]. Существуют множественные формы карбоангидразы, которые определяют ее полифункциональность, включающую транспорт углекислоты через мембраны, превращение ее в форму, которая используется при карбоксилировании, поддержание концентрации у мест карбоксилирования, стабилизации внутриклеточного pH, участия в фотосинтетической цепи переноса электронов.

Рубиско катализирует не только карбок-

силазную, но и оксигеназную реакцию в одном и том же активном центре [7]. Соотношение скоростей карбоксилазной и оксигеназной реакций при постоянном газовом составе атмосферы и температуре обусловлено спецификой вида растения, но может подвергаться значительным флуктуациям при изменении соотношения CO_2/O_2 и температуры в непосредственном окружении активного центра Рубиско. Считают, что повышение содержания CO_2 в атмосфере, потепление и аридизация климата способствуют распространению C_4 -растений, однако благодаря особенностям устьичного аппарата C_3 -растения остаются более устойчивыми к стрессам как и миллионы лет назад [14]. Могут получить преимущества и заселить новые ареалы суши засухоустойчивые и солеустойчивые виды растений. Не исключена также ретроэволюция более молодого C_4 -пути фотосинтеза.

Интенсивность фотосинтеза листьев зависит от запроса на ассимилянты со стороны потребляющих органов, донорно-акцепторных отношений в системе целого растения [5]. У многих видов растений апопласт функционирует как промежуточный компартмент, через который проходит сахароза перед ее загрузкой во флоэму и этот процесс энергозависим. У древесных, тыквенных и некоторых других видов транспорт ассимилятов до флоэмы осуществляется через симпласт. У культурных растений преобладает апопластный путь, но все растения частично используют симпластный. Различия заключаются в компартменте, из которого осуществляется загрузка основной массы ассимилятов. Обычно объем воды апопласта составляет 1–3% от общего содержания в листе, но его важная регуляторная роль не вызывает сомнений. Резкое увеличение количества фотоассимилятов в апопласте наблюдают в условиях засухи, когда тормозится их отток во флоэму, а также при усилении освещенности, что снижает экспортную функцию листа и служит ограничением фотосинтеза.

У монокарпических растений, к которым относят многие культурные злаки, верхние листья служат донорами ассимилятов для формирующихся репродуктивных органов, нижние – для корней [9]. Это обусловлено тем, что каждая ситовидная трубка флоэмы снаружи омывается встречным потоком транспирационной воды. В терминальных комплексах флоэмы растений апопластного типа ассимилянты выходят из клеток мезофилла а апопластное пространство и уже из него поступают в клетки-спутники флоэмных окончаний. Эти клетки имеют мало ва-

куолей и много складок–протуберанцев в плазмалемме, увеличивая ее поверхность. Закачка сахарозы в клетки–спутники флоэмы осуществляется за счет активного, энергозависимого транспорта и при этом создается большой градиент концентрации сахарозы. Далее сахароза по плазмодесмам попадает из сопровождающих клеток в ситовидные трубки, где движется пассивно по градиенту концентрации к акцептору.

Между отдельными потребителями ассимилятов может возникать конкуренция, которая влияет на характер их распределения в целом растении, сохранении числа потребителей ассимилятов. Индукцию перераспределения фотоассимилятов между вегетативными органами от-

Выводы

В процессе эволюции эукариот была сформирована система каротиноидов, непосредственно участвующая в энергетических процессах фотосинтеза. В мире растений известны три ксантофилловых цикла, в которых задействованы сходные циклические превращения ксантофиллов – реакции дезэпоксидации и эпоксидации [3]. Ксантофиллы виолаксантинового цикла участвуют в поглощении световой энергии и ее передаче хлорофиллу, локализованы в минорных субъединицах светособирающего комплекса фотосистемы I, которые служат каналами для стока энергии от внешнего светособирающего комплекса к реакционному центру P680. Зеаксантин и энтераксантин защищают фотосинтетический аппарат от излишка энергии возбуждения при высокой интенсивности света. Одним из путей протекторного действия считают синглет–синглетный перенос энергии от возбужденных молекул хлорофилла к ксантофиллам, которые осуществляют процесс термальной диссипации. Работа виолаксантинового цикла осуществляется в широком диапазоне условий, в которых проходит фотосинтез и осуществляется нормальная жизнедеятельность растений. Пигменты виолаксантинового цикла локализованы в липидной части хлорофилл–белкового светособирающего комплекса тилакоидов и способны к тушению возбужденного триплетного состояния хлорофилла и активных форм кислорода. Во взаимодействии с хлорофиллом в триплетном

носят к запуску процессов старения, инициация программы которого у монокарпических растений начинается в период цветения [9]. Интенсивность стока, перераспределение сахаров регулирует транскрипцию ядерных генов, которые кодируют малую субъединицу Рубиско, белки связанные с хлорофиллами, D–субъединицу тилакоидной АТФазы. Ключевыми ферментами в регуляции силы стока считают внеклеточные инвертазы, которые обеспечивают углеводами развитие микроспор. Процессы старения листьев включают деструкцию хлоропластов и катаболизм хлорофилла, белков, нуклеиновых кислот, липидов, контролируются на генетическом уровне, регулируются сетью фитогормонов.

состоянии при освещении тилакоидов каротиноиды переходят в возбужденное состояние, которое дезактивируется без излучения энергии. Виолаксантиновый цикл включен в систему реакций, которые изменяют соотношение АТФ/НАДФ–Н₂ и таким образом регулируют процессы, связанные с транспортом электронов в хлоропластах. Кофактором превращения виолаксантина является аскорбат, протонированная форма которого служит эндогенным донором электронов и протонов в реакции дезэпоксидации. Зеаксантин расположен в строме, является монооксигеназой и основным условием ее активности является НАДФ–Н. Активность виолаксантинового цикла не лимитируется количеством ферментов, превращения виолаксантина в зеаксантин происходит в течение 10–30 мин., обратное превращение идет в 5–10 раз медленнее. На реакции виолаксантинового цикла оказывает влияние температура, содержание CO₂, O₂, ионов марганца, метаболитов.

Процесс эволюции фотосинтеза продолжается в настоящее время и обусловлен глобальными изменениями климата на планете. Сохранение зеленого покрова Земли, интенсификация фотосинтеза, повышение продуктивности культурных растений остаются главными стратегическими задачами современной физиологии растений на всех уровнях – от молекулярного до экологического.

Література

1. Голубев И.С. Термодинамические критерии эволюции и развития биосистем // Журнал общей биологии. – 1991. – Т. 52, №2. – С.149–161.
2. Игамбердиев А.У. Фотодыхание и биохимическая эволюция растений // Успехи современной биологии. – 1988. – Т. 105, №3. – С. 488–504.
3. Маслова Т.Г., Марковская Е.Ф. Современные представления о функционировании виолаксантинового цик-

- ла (развитие идей Д.И Сапожникова) // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, №3. – С. 472–480.
4. Романова А.К. Физиолог–биохимические признаки и молекулярные механизмы адаптации растений к повышенной концентрации CO₂ в атмосфере // Физиология растений. – 2005. – Т. 52, № 1. – С. 129–145.
 5. Чиков В.И. Эволюция представлений о связи фотосинтеза с продуктивностью растений // Физиология растений. – 2008. – Т. 55, № 1. – С. 140–154.
 6. Amthor J.S., Koch G.W., Bloom A.J. Respiration in a future, higher– CO₂ world // Plant Cell Environ. – 1991. – Vol. 14.– P. 13–20.
 7. Badger M.R., Price G.D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1994. – Vol. 45. – P. 369–392.
 8. Bowes G. Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric CO₂ levels // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol. – 1993. – Vol. 44. – P. 9–20.
 9. Davies P.J., Gan S. Towards an integrated view of monocarpic plant senescence // Физиология растений. – 2012. – Т. 59, №4. – С. 509–520.
 10. Hetch M.D. C₄–Photosynthesis: an unlikely process // Plant Cell Physiol. – 1992. – Vol. 33, №4. – P. 333–342.
 11. Korschner W.M., Wagner F., Visscher E.N., Vissner H. The response of leaf stomatal frequency to a future CO₂ – enriched atmosphere: constrains from historical observations // Geologische Rundschau. – 1997. – Vol. 86. – P. 512–517.
 12. Majeau N., Coleman J.R. Effect of CO₂ on carbonic anhydrase and ribulose–1,5–bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in pea // Plant Physiol. – 1996. – Vol. 112. – P. 569–574.
 13. Nelson N., Yocum Ch. Structure and function of photosystems I and II // Annu. Rev. Plant Biol. – 2006. – Vol. 57. – P. 521–565.
 14. Retallack G.J.A 300–million –Year record of atmospheric carbon dioxide from fossil plant cuticles // Nature. – 2001. – Vol. 411. – P. 287–290.
 15. Rochaix J.D. Assembly of the Photosynthetic Apparatus// Plant Physiology. – 2011. – Vol. 155. – P. 1493–1500
 16. Terashima I., Hanba Y.T., Tholen D., Niinemets U. Leaf Functional Anatomy in Relation to Photosynthesis // Plant Physiology. – 2011. – Vol. 155 – P. 108–116.
 17. Urban O. Physiological impacts of elevated CO₂ concentrations ranging from molecular to whole plant response // Photosynthetica. – 2003. – Vol. 41. – P. 9–20.

ZHUK O.I.

Institute of plant physiology and genetics

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykyska st., 31/17, e-mail: zhuk_bas@volicable.com

EVOLUTIONAL ASPECTS OF PHOTOSYNTHESIS FORMATION

Aims. The photosynthesis evolution in connection with climate changes and CO₂ content in Earth atmosphere in different geological periods and in last ages is considered. The C₃–type of photosynthesis is more ancient and appeared in period of plant adaptation to life in land and genesis of vascular plants 300 million years ago. The large amount of modern plant species remained the C₃–type of photosynthesis that was effective under low temperatures, humidity and illumination conditions. The C₄–type of photosynthesis was formed under damp and hot climate and decreasing CO₂ content in atmosphere. **Methods.** The leaves of this type plants have the specific type of structure and high effectiveness of photosynthetic processes under temperatures higher than 25–30 °C. Effectiveness of C₃–type of photosynthesis under high temperature conditions decreases through shift of Rubisco from carboxylation to oxygenation reaction, enhancing photorespiration and CO₂ losses. **Results.** The development of industrialization led to increasing of CO₂ content in air that increased the rate of photosynthetic gaseous exchange, stimulated increase of plant weight, leaves square, quantity of mesophyll cells and chloroplasts in C₃ and C₄–plants. The relation of carboxylation and oxygenation of Rubisco reaction rates under constant gaze structure of atmosphere and temperature determined by specificity of species but could considerably fluctuate between under changes of relation CO₂ / O₂ and temperature in microspace.

Key words: photosynthesis, evolution, CO₂ content, C₃ and C₄–plants.

ОЛЬКОВА А.С.

Вятский государственный гуманитарный университет

Россия, 610002, г. Киров, ул. Красноармейская, д. 26, e-mail: morgan-abend@mail.ru

ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДНО-ТЕХНОГЕННЫХ СИСТЕМ БИОСФЕРЫ МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ: ОСОБЕННОСТИ ПРОБЛЕМЫ, ПУТИ РЕШЕНИЯ

Определение интегральной токсичности сред методами биотестирования в настоящее время является неотъемлемой частью оценки состояния природных и природно-техногенных комплексов биосферы. Сочетание данных химического анализа и исследование ответных реакций живых организмов позволяет наиболее глубоко и детально охарактеризовать исследуемый компонент окружающей среды: установить причинно-следственные связи между антропогенным воздействием и наблюдаемыми откликами, определить устойчивость экосистемы, прогнозировать дальнейшее развитие и состояние района исследования.

Высокое значение применения биологиче-

Материалы и методы

Объектами наших многолетних исследований являются компоненты природно-техногенных территорий Кировской области (Россия, подзона средней тайги). Образцы отбираются в зоне влияния объекта хранения и уничтожения химического оружия (ОХУХО) «Марядыковский», в районе химических предприятий г. Кирово-Чепецка и Кильмезского полигона захоронения ядохимикатов, а также на территориях урбоэкосистем. Интегральная токсичность проб почв, природных вод (поверхностных и подземных), донных отложений определялась

Результаты и их обсуждение

Обозначим несколько проблем, возникающих при исследовании состояния природно-техногенных систем методами биотестирования.

Естественная «матрица» водной среды влияет на определяемую интегральную токсичность. «Матрицей» природной воды мы называем здесь весь комплекс веществ, включенных в поверхностные или подземные воды естественным образом и активно формирующих химические, физико-химические и токсикологические свойства вод. Аспекты проблемы:

1) при оценке интегральной токсичности вод нередко «матрица» природной воды, которая принимает загрязнение, маскирует вредные вещества, например, за счет комплексообразования;

2) «матрица» как среда для культивирова-

ских методов подтверждается установленными эффектами синергизма и антагонизма многих веществ [1]. В этом случае проведение биотестов показывает реальное воздействие исследуемой среды на биоту исследуемой части биосферы.

При несомненных достоинствах и важности биологических методов экологических работ в процессе интерпретации результатов биотестирования исследователи сталкиваются с рядом трудностей.

Цель данной работы – обобщить, основываясь на многолетнем опыте, особенности и проблемы биотестирования компонентов окружающей среды по аттестованным методикам и предложить некоторые пути их решения.

по методикам биотестирования, допущенным для целей государственного экологического контроля и мониторинга и внесенным в федеральный реестр методик Российской Федерации (ФР.1.39.2007.03221, 2007; ФР.1.39.2007.03222, 2007; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04, 2007; ФР.1.31.2005.01882, 2010; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04, 2010). Использовались тест-организмы разных трофических групп: *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, *Paramecium caudatum*, *Escherichia coli*.

ния тест-организмов, обладая региональными и локальными особенностями, влияет на общее состояние биообъектов, их чувствительность и устойчивость к различным соединениям;

3) кроме того, при реализации многих методик биотестирования культивационная вода используется для приготовления серий разбавлений тестируемой среды, влияя на итоговый результат.

Проблема отчасти решается приёмами стандартизации тест-объектов, то есть поддержанием чувствительности к модельному токсиканту в установленном диапазоне, что предполагается всеми аттестованными методиками. Также необходимо подбирать так называемый фон. Им могут быть данные, полученные до начала воздействия источника загрязнения. Если

это невозможно, то устанавливается фоновый участок за пределами зоны влияния.

Следующая проблема свойственна для методик, в которых в качестве тест-функции выступает гибель организма. Наиболее известными нормативными документами, ориентирующимися на этот показатель, можно назвать методики с использованием низших ракообразных [2]. Дело в том, что до проявления крайней степени токсического эффекта, то есть гибели, можно наблюдать и использовать для оценки качества тестируемой среды массу показателей. Такие эффекты как изменение двигательной, пищевой активности, скорости размножения и другие реакции хорошо идентифицируются, особенно в экспериментах по установлению хронического токсического действия. Однако, существующие методики этого не предусматривают, вероятно, в силу усложнения процедуры обработки результатов. Например, классический биотест с использованием *Daphnia magna* в части определе-

ния хронических воздействий предполагает подсчёт количества абортивных яиц, но при обработке результатов эти данные не используются.

Для учёта такого значимого показателя как количество абортивных яиц предлагаем усовершенствование методики путём введения коэффициентов. Они снижают итоговые показатели плодовитости в соответствии с долей абортивных яиц от общего числа молоди, полученной в тестируемом варианте. Если количество абортивных яиц не превысило 5 % от числа молоди за период эксперимента, то показатель плодовитости уменьшим в 1,1 раз; абортивных яиц от 5 до 10 % - в 1,2 раза; более 10 % - в 1,5 раза.

При исследовании водоёмов г. Кирова определялась хроническая токсичность образцов воды. Резкого снижения плодовитости не наблюдалось, но в ряде проб отмечено появление абортивных яиц, что считается крайне негативным явлением. Приводим краткий пример использования предложенных коэффициентов.

Таблица 1. Использование понижающих коэффициентов наличия абортивных яиц для корректировки результатов хронических экспериментов (тест-объект *Daphnia magna*)

Вариант	Плодовитость на 1 самку	Количество абортивных яиц (их доля от общего числа молоди)	Показатель плодовитости с учётом коэффициента	Заключение о токсичности образца*
Контроль	17,0	0	-	-
Проба 1	9,1	0	9,1	Оказывает хроническое токсическое действие
Проба 2	16,2	9 (1,85 %)	14,7	Оказывает хроническое токсическое действие
Проба 3	17,7	33 (6,2%)	14,75	Оказывает хроническое токсическое действие

*Примечание: заключение о токсичности сделано по показателю плодовитости с учетом понижающего коэффициента

Открытым вопросом реализации и разработки новых методик биотестирования является интерпретация явлений стимуляции тест-функций живых организмов. Под стимуляцией мы понимаем здесь увеличение количественных характеристик состояния организма или их совокупности в процессе эксперимента по установлению токсичности по сравнению с контрольным вариантом. Большинство методик такие эффекты не учитывают. Например, в ФР.1.31.2005.01881 (тест-объект инфузории) согласно пункту 9.4: «отрицательные значения свидетельствуют об отсутствии токсичности и могут быть оценены как нулевые» [3]. Фактиче-

ски при проведении эксперимента наблюдается стимуляция хемотаксиса и общей двигательной активности инфузорий по сравнению с контролем. Инфузории за 30 минут тест-реакции поднимаются в верхнюю часть кюветы, что характерно для нетоксичных проб, и начинали там очень активно двигаться, завышая измеряемые показатели. Такая реакция может быть начальной стадией токсического эффекта. При увеличении экспозиции после стимуляции двигательной активности особи начинают погибать. Однако, гибель после стимуляции не является обязательным развитием ситуации. Если причиной стимуляции явилось повышенное содержание

питательных веществ, то наступления крайней степени токсического эффекта мы не увидим.

Исследователями показано, что влияние многих загрязняющих веществ проявляется до определенного порога в стимуляции как тест-функций, так и продуктивности целых экосистем, и только при повышении дозы начинается угнетение [4]. Для инфузорий наличие стадии стимуляции в динамике токсического эффекта показано авторами при воздействии малого содержания многих загрязняющих веществ (солей металлов, фенолов, пестицидов) [5].

Нами делаются попытки интерпретации явлений стимуляции тест-функций как при работе с естественными средами, так и при проведении модельных экспериментов.

Исследовалась проблема загрязнения почв фторидами, техногенными источниками которого могут являться производства алюминия, заводы, производящие фторполимеры и объекты уничтожения фторсодержащих отравляющих

веществ [6]. Эксперимент проводился с использованием тест-системы «Эколюм» и инфузорий [3, 7, 8]. Дозы фторида натрия, действие которых изучалось в эксперименте с почвами, были предварительно протестированы в водных растворах. Концентрации водных растворов соответствовали вариантам опыта на почвах. При этом исходили из допущения, что вся добавка в почву перейдет в раствор в процессе приготовления водной вытяжки. В результате этого тестируемые растворы содержали 0,17, 0,25, 0,42, 0,5, 0,58 ПДК фторид-иона. Все модельные растворы оказались высокотоксичными как для бактерий тест-системы «Эколюм», так и для инфузорий, то есть наблюдалось резкое угнетение тест-функций.

При внесении аналогичных доз фторида натрия в почву наблюдали стимуляцию тест-функций. Однако, степень стимуляции снижалась в ответ на увеличение дозы токсиканта (табл. 2).

Таблица 2. Снижение эффекта стимуляции тест-функций при увеличении дозы фторид-иона

Вариант модельного опыта	Стимуляция биолюминесценции бактерий тест-системы «Эколюм» по сравнению с контролем, %	Стимуляции хемотаксической реакции инфузорий по сравнению с контролем, %
Контроль	100	100
100 ПДК	176	213
150 ПДК	94	166
200 ПДК	90	109
250 ПДК	79	94
300 ПДК	64	31
350 ПДК	53	угнетение

В данном примере проявляется также и эффект «матрицы»: комплекс веществ, насыщающих водную вытяжку из почвы маскирует воздействие введенного вещества вплоть до значительных превышений норматива.

При определении токсичности природных вод, как поверхностных, так и подземных, также нередко встречаются стимуляция тест-объектов на фоне относительно невысокого загрязнения

поллютантами, а также сложного комплексного загрязнения. Приводим несколько примеров (табл. 3).

Сопоставляя данные биотестирования и химического анализа, можно утверждать, что представленные пробы нельзя назвать безопасными. При всей неоднозначности вынесения заключения о токсичности пробы по показателю стимуляции потребность в таком критерии есть.

Выводы

Таким образом, интерпретация результатов биотестирования, по возможности, должна осуществляться с учетом естественной «матрицы», эффектов стимуляции, а также реакций организмов, проявляющихся до гибели особей. По

нашему мнению, требуется совершенствование методической базы, создание банка данных, отражающих зависимость «доза-эффект», эффекты сочетанного действия загрязняющих веществ, а также комплексного действия факторов.

Таблица 3. Эффект стимуляции хемотаксиса инфузорий в сопоставлении с данными химического анализа при исследовании природной поверхностной воды

№ пробы	Стимуляции хемотаксической реакции инфузорий по сравнению с контролем, %	Кратность превышения ПДК
1	15	As - 1,14 Be - 1,1 Pb - 1,3 F - 1,8 Al - 8,5
2	17	As - 0,85 F - 3 Mg - 1,5 Mn - 56 Fe - 10
3	18	As - 1,2 Mg - 1,5 Mn - 92 Br - 15 Ni - 1,1
4	22	Mg - 2 Mn - 216 Fe - 2,7 Sr - 7,5 Ba - 2,5 Br - 1,1 Ni - 9 Cd - 3 Tl - 1,3

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-3326.2012.5.

Литература

1. Никаноров А.М., Хоружая Т.А., Бражникова Л.В., Жулидов А.В. Мониторинг качества вод: оценка токсичности. – Санкт-Петербург: Гидрометеоздат, 2000. – 159 с.
2. ФР.1.39.2007.03222 Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М.: Акварос, 2001. – 48 с.
3. ФР. 1.31.2005.01881 (ред. 2010) Методика определения токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных вод экспресс-методом с применением прибора «Биотестер». ООО «СПЕКТР-М», 2010. – 13 с.
4. Марфенина О. Е. Микробиологические аспекты охраны почв. М.: Изд-во МГУ, 1991. – 118 с.
5. Никаноров А. М., Трунов Н.М. / под ред. Бедрецкого А. И. Внутриводоемные процессы и контроль качества природных вод С-Пб.: Гидрометеоздат, 1999. – 150 с.
6. Некрасова Ю. Н., Олькова А. С., Дабах Е. В. Влияние фторида натрия на физико-химические свойства и интегральную токсичность почв в модельном эксперименте // Теоретическая и прикладная экология. – 2012. – № 3. – С. 48-53.
7. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 16.1:2:3:3.8-04 Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной билюминесценции тест-системой "Эколюм", 2010.
8. ФР. 1.31.2005.01882 (ред. 2010) Методика определения токсичности проб почв, донных отложений и осадков сточных вод экспресс-методом с применением прибора «Биотестер»: ООО «СПЕКТР-М». – 2010.

OLKOVA A.S.

Vyatka State University of Humanities

Russia, 610002, Kirov, Krasnoarmeyskaya str. 26, e-mail: morgan-abend@mail.ru

RESEARCH EXPERIENCE NATURAL AND INDUSTRIAL SYSTEMS OF THE BIOSPHERE BY BIOASSAY METHODS: FEATURES PROBLEMS, SOLUTIONS

Aims. Synthesis of many years of experience with the features and problems of bioassays environmental components according to the certified methods and develop some solutions. **Methods.** With the test organisms of different trophic groups determined by the integral components of the toxicity of natural and industrial systems. We used the following organisms: *Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, *Paramecium caudatum*, *Escherichia coli*. **Results.** Interpretation of the results of bioassays, if possible, should take into account the natural "matrix", effects of stimulation, as well as organisms reactions, manifested before the death of individuals. **Conclusion.** In our opinion, requires better methodological framework, the creation of a data bank, reflecting the dependence of the "dose-effect", the effects of the combined action of pollutants, as well as integrated effect of factors.

Key words: bioassay, the integrated toxicity, natural and industrial systems.

СУСЛОВА О.С., ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., МАЦЕЛЮХ Б.П., ТАШИРЕВ О.Б.

Інститут мікробіології і вірусології НАН України

Україна, ДОЗ680, Київ МСП, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: Golembiovaska@ukr.net

ПІГМЕНТИ ДРІЖДЖІВ, ВИДІЛЕНИХ З ПЕЧЕРИ МУШКАРОВА ЯМА

На сьогоднішній день карстові порожнини залишаються малодослідженими еконішами Землі щодо існування в них біологічних об'єктів. Печера Мушкарова Яма (Тернопільська область, Україна) утворена з гіпсу і є однією з таких порожнин. З цієї печери співробітниками нашого інституту на середовищі з високою концентрацією іонів токсичних металів (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Cr_4O^{2-}) був виділений ряд мікроорганізмів. Серед них особливу увагу привернули колонії, які на другу добу культивування накопичували внутрішньоклітинний пігмент рожевого кольору. За допомогою методів світлової мікроскопії визначено, що дані мікроорганізми мають типову для дріжджів морфологію.

Дріжджі – хемоорганогетеротрофні мікроорганізми, класичними джерелами виділення яких в мікробіологічній практиці є субстрати, багаті на цукристі речовини [1]. Такими є поверхні плодів, листків чи місця навколо тріщин в корі, звідки може витікати сік дерев. Існування в таких місцях забезпечується харчуванням дріжджів прижиттєвими виділеннями рослин, некта-

ром квітів, раневими соками рослин, мертвою фітомасою і т. д. Відомі також представники дріжджів роду *Lypomyces*, які поширені у ґрунті, особливо у підстилці. Дріжджі родів *Candida*, *Pichia*, *Ambrosiozyma* постійно присутні у кишечнику і ходах ксилофагів (комах, що харчуються деревиною), різноманіття дріжджових співтовариств розвиваються також на листі, ураженому тлюю [7]. Українськими дослідниками були виділені дріжджі, переважно родів *Rhodotorula*, з ґрунтів скелястої області Малих Карпат та високогірних районів Криму, які відкриті сонячному випромінюванню [2]. Тому у нас викликало зацікавлення виділення пігментованих дріжджів з такої екосистеми як карстова печера, адже вона характеризується відсутністю світла і обмеженістю органічних речовин, що легко засвоюються.

Метою даної роботи була первинна ідентифікація внутрішньоклітинних кольорових пігментів, які синтезують дріжджі, виділені з печери Мушкарова Яма.

Матеріали і методи

Препарати для світлової мікроскопії фіксували в полум'ї пальника і фарбували 0,5% водним розчином фуксину основного [1].

Дріжджі вирощували на м'ясопептоному агарі та на середовищі сусло при рН 4 [2]. Куль-

тивування на обох середовищах проводили протягом 3 діб при наявності та відсутності (термостат) світла, t 21 і 28°C. Біомасу дріжджів знімали з поверхні агару скальпелем, висушували при t 60-80°C та розтирали у фарфоровій ступці ква-

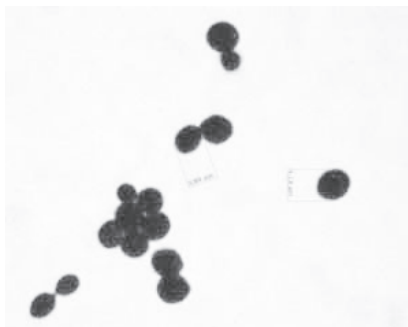
рцовим піском. Екстракцію внутрішньоклітинних пігментів проводили поетапно спиртом 96°, ацетоном і гексаном до знебарвлення розтертої біомаси. Зібрані екстракти осаджували від кварцового піску і інших речовин центрифугуванням при 8050 g протягом 5 хв [5].

Первинну ідентифікацію речовин досліджуваних мікроорганізмів здійснювали методом тонкошарової хроматографії на пластинках *Cromatofolgas AL HPTLC Silicagel 60 F254* фірми "Merck". Компоненти каротиноїдів розділяли в

Результати та їх обговорення

За допомогою методів світлової мікроскопії визначено, що виділена з печери Мушкарова Яма культура є дріжджами (рис. 1). Дані мікроорганізми здатні до брунькоутворення, діаметр окремих клітин становив 3-4 мкм.

У процесі росту досліджуваних дріжджів у



При екстракції внутрішньоклітинних пігментів спостерігалось їх швидке руйнування при дії на них тепла та світлових променів, що є характерним для властивостей каротиноїдів [6]. Етанол екстрагував один пігмент рожевого кольору (рис. 2,1), що свідчить про неполярні властивості кольорового метаболіту і є характерним для ксантофілів – кисновмісних каротиноїдів [6]. Ацетоном екстрагувалися два пігменти

системі розчинників ацетон : петролейний ефір 4:1 [2]. Окремі плями пігментів знімали з носія хроматографічної пластики і розчиняли в спирті та ацетоні. Далі проводили спектрофотометричний аналіз очищених пігментів за допомогою спектрофотометра Beckman DU-8B в діапазоні видимого світла 400 – 600 нм [6]. У контролі використовували хроматографічно очищений каротиноїд торулародин, екстрагований з дріжджів *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330.

всіх вищезазначених варіантах культивування візуально визначено, що накопичення кольорових пігментів відбувалося інтенсивніше на сусло-агарі, в умовах освітлення і при t 21°C. Тому, подальші дослідження проводилися з використанням саме цих умов.

Рис. 1. Клітини виділених дріжджів в полі світлового мікроскопа, збільшення x 1000

рожевого та оранжевого кольору (рис. 2,2), гексаном – жодного із них (дані не приводяться).

Методом ТШХ показано, що хроматографічна рухливість (Rf) рожевого пігменту в обох випадках становила 0,21, а оранжевого - 0,95. Отже, досліджувані дріжджі при культивуванні на сусло-агарі накопичують два неполярні каротиноїди рожевого і оранжевого забарвлення.



Рис. 2 Тонкошарова хроматограма ендogenous пігментів досліджуваних дріжджів, екстрагованих етанолом (1), ацетоном (2)

Подальша ідентифікація кольорових пігментів дріжджів, виділених з печери Мушкарова Яма, проводилася за допомогою спектрофотометрії. Рожевий каротиноїд з Rf 0,21, розчинений в ацетоні, мав два максимуми поглинання 495 та 523 нм (рис. 3,1). Отримані результати спектрофотометрії рожевого пігменту мали подібність за даними літератури до максимумів поглинання каротиноїда торулародину, який характерний для представників базидіоміцетних дріжджів [2, 3]. Для порівняння даних спектрофотометрії рожевого пігменту з Rf 0,21 (рис. 3,3 та 3,5) було використано хроматографічно очищений торулародин із дріжджів *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 розчинений в етанолі (рис.3,4) та ацетоні (рис. 3,6). Максимуми спектрів по-

глинання рожевого пігменту досліджуваних дріжджів та *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 були ідентичні, що свідчить про накопичення дріжджами, виділеними з карстової печери, каротиноїда торулародину.

Спектрофотометрія верхньої смуги каротиноїдів оранжевого кольору з Rf 0,95 давала піки поглинання при довжині хвилі 464 і 485 нм (рис.3.2), що подібно до спектру поглинання торуліну [2, 3]. Дріжджі *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 на третю добу росту накопичують суміш каротиноїдів торулін, γ - і β -каротини, які мають подібну хроматографічну рухливість, що ускладнює процес їх очищення та порівняння з оранжевим пігментом дріжджів, виділених з печери Мушкарова Яма.

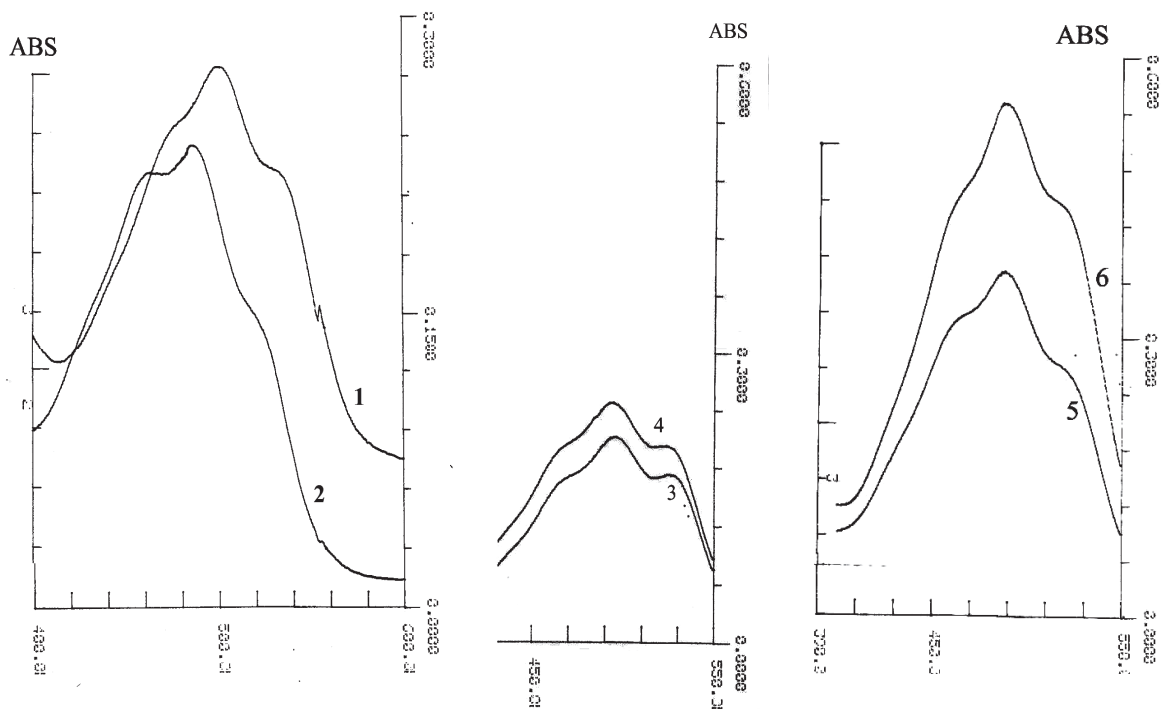


Рис. 3 Спектри поглинання очищених пігментів: нижньої смуги з Rf 0,21 в ацетоні (1); верхньої смуги з Rf 0,95 в ацетоні (2); нижньої смуги в етанолі (3); торулародину *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 в етанолі (4); нижньої смуги в ацетоні (5); торулародину *Rhodotorula glutinis* УКМ-1330 в ацетоні (6)

З літературних даних відомо, що шлях синтезу кольорових каротиноїдів у дріжджів іде у напрямку від вуглеводню γ -каротину до каротиноїдної кислоти – торулародину, включаючи етап синтезу торуліну [3], який, вірогідно, і накопичують досліджувані дріжджі на третю добу культивування.

Отже, дріжджі виділені з карстової порожнини Мушкарова Яма, на третю добу культивування накопичують два каротиноїди, один з яких є торулародином, а інший, вірогідно, є його

попередником торуліном. За типовою властивістю базидіоміцетів синтезувати каротиноїди досліджувані дріжджі можна віднести до представників цього роду. Але залишається відкритим питання функціональності каротиноїдів у досліджуваних дріжджів. З літературних даних відомо, що у нефотосинтезуючих мікроорганізмів, в тому числі у дріжджів, каротиноїди захищають клітину в першу чергу від дії вільних радикалів, утворених надмірним впливом сонячної радіації. Водорості ж використовують каротиноїди як

додаткові засоби для отримання енергії світлових променів діапазону 400-500 нм [6]. Можливо, в нашому випадку каротинсинтезуючі дріжджі використовують каротиноїди аналогічно фотосинтезуючим організмам. Проте потрібно сказати, що виділення даних мікроорганізмів відбувалося на середовищі, яке містило велику кількість іонів міді (1000 мг/л). Такі умови лімітували виділення мікроорганізмів, які б не були резистентні до великих концентрації ксенобіо-

тичних речовин. Ймовірно, що в даному випадку продукування каротиноїдів є механізмом захисту від дії іонів токсичних металів. Раніше співробітниками нашого інституту була показана пряма залежність між наявністю каротиноїдних пігментів і стійкістю до високих концентрації іонів міді [4]. З іншої сторони, виділені дріжджі, крім каротиноїдних пігментів, можуть мати еволюційно досконалу систему репарації, наявність якої дає змогу існувати в даних умовах.



Схема 1. Шлях синтезу каротиноїдних пігментів у дріжджів [3]

Висновки

1. Ідентифіковано внутрішньоклітинні пігменти дріжджів виділених з карстової печери Мушкарова Яма. Досліджувані дріжджі накопичують торулародин та, вірогідно, його попередник торулін.

2. Наявність у виділених дріжджів пігментів каротиноїдної природи ймовірно обумовлена необхідністю захисту клітини від ксенобіотичних речовин, що містило середовище, на якому вони були ізолювані.

Література

1. Бабьева И.П., Губев В.И. Методы выделения и идентификация дрожжей. – Москва. Пищ. Пром-ть, 1979. – 120 с.
2. Квасников Е.И., Васкивнюк В.Т., Суденко В.И., Гринберг Т.А. Каротинсинтезирующие дрожжи. – Киев: Наук. думка, 1980. – 171 с.
3. Кирица Елена. Направлений синтез каротиноидов у дрожжей и перспектива их использования. Автореферат. Кишинев. – 2005. – 129 с.
4. Мамеева О.Г., Касаткіна Т.П., Лаврінчук В.Я. Біосорбційна спроможність мутантів *Rhodotorula mucilaginosa* УКМ У-1776 // Мікробіол. журн. – 2007. – Т. 69, № 2. – С. 29 – 35
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. Britton G. General carotenoid methods // Meth. Enzymol. – V. 111. Steroids and Isoprenoids. Part B. / Ed. J.H. Law, H.C. Rilling. – Orlando, San Diego etc.: Academ. Press. – 1985. – P. 113-149.
7. Kurtzman, C.P., Fell, J.W. Yeast systematics and phylogeny — implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa, C.A. and Peter, G., editors. The Yeast Handbook. Germany: Springer-Verlag Berlin Herdelberg. – 2006. – P. 11-30.

SUSLOVA O.S., GOLEMBIOVSKA S.L., MATSELYKH B.P., TASHYREV O.B.

*Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
Ukraine, D 03680, Kiev, Zabolotnogo str., 154, e-mail: Golembiovska@ukr.net*

PIGMENTS OF THE YEAST ISOLATED FROM THE MUSHKAROVA YAMA CAVE

Aim. To identify color pigments of yeast isolated from the Mushkarova Yama cave (Ukraine). **Methods.** The color pigments were obtained from yeast cells and dissolved in solution (TCL-method, spectroscopy analysis). **Results.** The color yeasts were isolated from the karst cave. The obtained pigments were identified as torulin and torularhodin by TLC-methods and spectroscopy analysis. **Conclusions.** The data indicates ability of carotenoids pigments' biosynthesis in the yeast isolated from karst cave Mushkarova Yama.
Key words: yeast, carotenoids, torulin, torularhodin.

ВАСИЛЕНКО О.П., 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

ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В ОБЛУЧЁННЫХ ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С КЛЕТКАМИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Известно, что облучённые ионизирующим излучением клетки генерируют стрессорные сигналы, которые приводят к повреждению расположенных в непосредственной близости интактных клеток [1]. Чаще всего, ответ на облучённых клеток проявляется в виде повышения геномной нестабильности (частоты генных мутаций или уровня хромосомных aberrаций), клеточной гибели, пролиферации, образования микроядер или клеточной трансформации, и называется эффектом «свидетеля» (ЭС) [2]. Ранее мы показали, что совместное культивирование клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с лимфоцитами периферической крови (ЛПК) человека, где облучённые клетки дрожжей являлись донором ЭС сигнала, а ЛПК – клетками «свидетелями», является перспективной модельной систе-

мой для детекции и изучения ЭС [3, 4].

Исходя из самого определения эффекта «свидетеля», клетки-реципиенты ЭС сигнала должны быть интактными, то есть не подвергаться никакому мутагенному воздействию. В наших предыдущих работах мы показали, что в результате индукции эффекта «свидетеля» уровень aberrантных метафаз в ЛПК увеличивается в 3-4 раза. Однако остаётся открытым вопрос, как на ЭС сигнал реагируют повреждённые клетки? Поэтому, целью нашей работы было проверить, как будет изменяться уровень метафаз с aberrациями хромосом (aberrантные метафазы) в предварительно повреждённых лимфоцитах под воздействием облучённых дрожжей.

Материалы и методы

В исследовании был использован гаплоидный штамм дрожжей DLY 640 в стационарной фазе роста. Образцы цельной крови (1 мл) облучали рентгеновскими лучами дозой 1 Гр (аппарат РУМ-17) и культивировали при 37 С⁰ 48 часов в 5 мл среды RPMI-1640 с добавлением ФГА. В начале культивирования проводили экс-

периментальную контаминацию культур облучёнными (10 Гр) или не облучёнными клетками дрожжей *S. cerevisiae* (106 клеток на культуру). После культивирования, готовились препараты метафазных пластинок ЛПК, которые анализировались на наличие aberrантных метафаз (AM).

Результаты

Уровень AM в облучённых дозой 1 Гр лимфоцитах (рис. 1), как и ожидалось, был значительно выше чем в необлучённой культуре ЛПК (2,33±0,87% – контроль (необлучённая культура ЛПК), 30,00±2,65% – облучённая культура ЛПК, p<0,05). После совместного культивирования облучённых ЛПК с дрожжами подвергавшимися воздействию рентгеновского излучения в лимфоцитах не наблюдалось статистически значимого увеличения уровня AM по сравнению с культурой облучённых лимфоцитов 30,00±2,65% – облучённая культура ЛПК, 26,50±3,12% – культура ЛПК с облучёнными дрожжами, p>0,05). Таким образом, можно

предположить, что ЭС сигнал, который генерируют облучённые клетки дрожжей, не приводит к появлению дополнительных хромосомных повреждений в предварительно облучённых лимфоцитах.

Однако при сокультивировании облучённых ЛПК с интактными клетками дрожжей (рис. 2) наблюдалось значительное снижение уровня aberrантных метафаз (30,00±2,65% – облучённая культура ЛПК, 18,50±2,75% – культура ЛПК с не облучёнными дрожжами, p<0,05). Следует отметить что подобного эффекта при совместном культивировании не облучённых лимфоцитов с не облучёнными клетками дрожжей

не наблюдалось ($2,33 \pm 0,87\%$ – культура ЛПК, $3,00 \pm 0,98\%$ – культура ЛПК с не облучёнными дрожжами, $p > 0,05$).

Подобные результаты были получены и другими исследователями [5, 6], что даёт возможность считать этот феномен стабильным и достаточно распространённым в природе. Существование подобного явления можно объяснить тем, что интактные клетки могут выделять вещества способные снижать повреждающий эффект в облучённых клетках [5]. С другой стороны, не

облучённые клетки, возможно, способны перехватывать сигнальные ЭС молекулы, которые потенциально способны вызывать повреждения ДНК, тем самым снижая количество повреждающих факторов. Подобный механизм мог выработаться эволюционно в качестве защиты от мутагенных факторов, воздействующих критически на одну группу клеток, за счёт небольшого повышения повреждений в интактной группе клеток, проявляющегося как эффект «свидетеля».

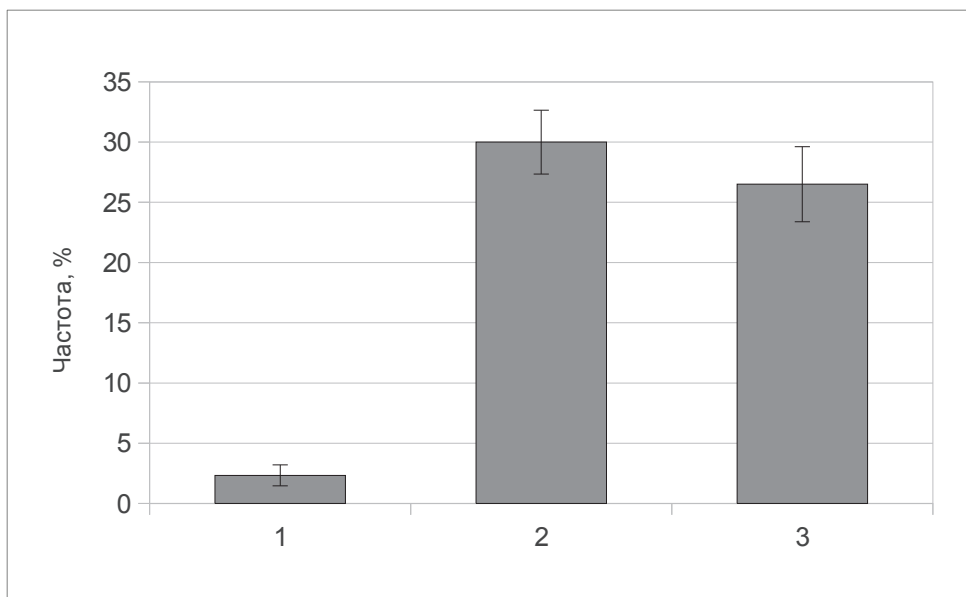


Рис. 1. Частота aberrантных метафаз (AM) в культуре лимфоцитов: 1 – негативный контроль (необлученная культура ЛПК), 2 – позитивный контроль (облучённая культура ЛПК), 3 – облучённые ЛПК с облучёнными дрожжами

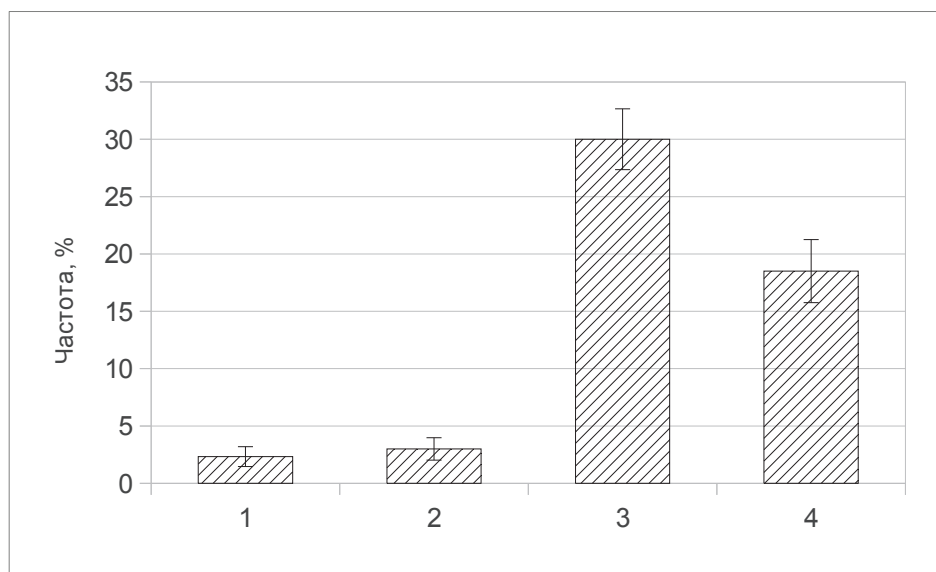


Рис. 2. Частота aberrантных метафаз (AM) в лимфоцитах: 1 – не облучённая культура ЛПК, 2 – не облучённые ЛПК с необлученными дрожжами, 3 – облучённые ЛПК, 4 – облучённые ЛПК с не облучёнными дрожжами

Выводы

Исходя из полученных нами данных следует, что облучённые клетки дрожжей не влияют на уровень aberrантных метафаз в предварительно облучённых лимфоцитах периферической крови человека. Необлученные дрожжи при

совместном культивировании с облучённой культурой ЛПК способны значительно снижать уровень aberrантных метафаз в облучённых лимфоцитах.

Литература

1. Sawant S., Zheng W., Hopkins K., Randers-Pehrson G., Lieberman H., Hall E. The radiation-induced bystander effect for clonogenic survival // *Radiat. Res.* – 2002. – Vol. 157, № 4. – P. 361-364.
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. 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.
4. 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.
5. Widel M., Przybyszewski W., Cieslar-Pobuda A., Saenko Y., Rzeszowska-Wolny J. Bystander normal human fibroblasts reduce damage response in radiation targeted cancer cells through intercellular ROS level modulation // *Mutat. Res.* – 2011. – Vol. 731. – P. 117-124.
6. Claridge-Mackonis E., Suchoverska N., Zhang M., Ebert M., McKenzie D.R., Jackson M., Cellular response to modulated radiation fields // *Phys. Med. Biol.* – 2007. – Vol. 52. – P. 5469–5482.

VASYLENKO O.P., RUSHKOVSKY S.R.

National Taras Shevchenko University of Kyiv

Ukraine, 01033, Kyiv, Volodymyrska str: 64, e-mail: helga.wasilenko@gmail.com

CHROMOSOMAL INSTABILITY IN IRRADIATED HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES INCUBATED WITH YEAST CELLS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Aims. In our previous studies we have shown 3-4 times increasing of the aberrant metaphases level in intact human lymphocytes as a result of bystander effect (BE) induced by irradiated yeast cells. The question remains are damaged cells more sensitive to BE signals or not? The purpose of our study was investigation how cocultivation with *S. cerevisiae* affects the level of chromosomal instability in X-ray irradiated lymphocytes. **Methods.** The cultures of X-ray irradiated (1 Gy) human peripheral blood lymphocytes were experimentally contaminated with nonirradiated or X-ray irradiated yeast cells (haploid strains of *S. cerevisiae*, 10 Gy). Well spread human metaphases were scored for aberration metaphases (AM). **Results.** It was found that irradiated yeast cells had no effect on chromosomal stability level in irradiated lymphocytes. The statistically significant decreasing of the AM level was observed in irradiated lymphocytes incubated with non-irradiated yeast cells. **Conclusions.** Our findings suggest existence of “inverse BE” when non-irradiated cells can significantly reduce the level of chromosomal damages in irradiated ones.

Key words: bystander effect, lymphocytes, aberration metaphases.

ДЕРІЙ С.І., БІЛОНОЖКО В.Я., ПЕДЧЕНКО М.О.

Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького

Україна, 18031, м. Черкаси, бульвар Шевченка, 81, e-mail: Bilonogko52 @yandex.ru

ЗАСТОСУВАННЯ КРЕС-САЛАТУ (*LEPIDIUM SATIVUM L.*) ДЛЯ ОЦІНКИ ВМІСТУ ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У МОДЕЛЬОВАНІЙ ВОДНІЙ КУЛЬТУРІ

Нині оцінка ступеня екологічної небезпеки традиційно здійснюється шляхом визначення у навколишньому середовищі окремих потенційно шкідливих речовин або впливів і порівняння

отриманих результатів із законодавчо установленими для них граничнодопустимими величинами. У той же час такий спосіб контролю має ряд істотних недоліків. Аналітичні методи, як

правило, трудомісткі, не завжди експресні, вимагають дорогого, іноді дефіцитного обладнання і реактивів, а також висококваліфікованого обслуговуючого персоналу. Але головний їхній недолік в тому, що ці методи не можуть гарантувати достовірної оцінки екологічної небезпеки, яким би широким не був спектр аналізованих речовин. Адже важливі не самі рівні забруднень і впливів, а ті біологічні ефекти, які вони можуть викликати і про які не може дати інформацію навіть найточніший хімічний чи фізичний аналіз. Тому поряд з фізико-хімічними методами необхідно використовувати методи біологічного контролю та діагностики – біоіндикації та біотестування, що дають об'єктивні інтегральні оцінки якості середовища і підстави для прогнозу стану екосистем [1,7].

До переліку основних забруднювачів на-

Матеріали і методика

Проби ґрунту відбирались в літньо-осінній період у десяти різних пунктах м. Черкаси з різною інтенсивністю автотранспортного та промислового впливу.

Пункт 1. Перехрестя вул. Шевченка – вул. Смілянська

Пункт 2. Вул. Смілянська біля «McDonald»

Пункт 3. Перехрестя вул. Благівісна – вул. Смілянська

Пункт 4. Перехрестя вул. Ільїна – вул. Смілянська

Пункт 5. Вул. Смілянська р-н ЖД вокзалу

Пункт 6. Вул. Смілянська біля ЧПК

Пункт 7. Перехрестя вул. 30 років Перемоги – вул. Смілянська

Пункт 8. Смілянське шосе р-н Автовокзалу

Пункт 9. Смілянське шосе в'їзд до міста Черкаси

В якості контролю був використаний ґрунт зібраний на сільськогосподарських полях при в'їзді до м. Черкаси по Смілянському шосе. Ділянка, з якої відбиралися проби, знаходилася на відстані не менше 150м від межуючих автомобільних доріг (вважають, що така відстань виключає аерогенне перенесення важких металів до ґрунту від основного джерела забруднення автотранспорту).

Відбір зразків ґрунту та приготування водної витяжки з ґрунту проводили за загальноприйнятими методиками.

Вміст елементів важких металів

Результати та їхнє обговорення

За методом атомно-абсорбційної спектроскопії в досліджуваних зразках ґрунту

вколишнього середовища включені солі важких металів, які здебільшого негативно впливають на живі організми, і на людину зокрема [2,3]. Джерелом надходження важких металів у це середовище є відходи більшості галузей народного господарства [5]. Тому актуальною сучасною екологічною проблемою є визначення стану забруднення ґрунтів і впливу металів токсикантів техногенного походження на рослинні організми [3]. Оскільки рослини є важливою ланкою в ланцюгах живлення екосистем, то йони важких металів будуть чинити хронічний токсичний вплив на всі живі компоненти екосистем [2].

Метою нашої роботи є біотестування рослиною-індикатором (*Lepidium sativum* L.) токсичності ґрунтового покриву техногенних зон міста Черкаси з різною інтенсивністю автотранспортного та промислового впливу.

(Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+}) у ґрунті визначали у лабораторії хіміко-токсикологічних досліджень Черкаського обласного державного проектно-технологічного центру охорони родючості ґрунтів і якості продукції «Облдержродючість».

Досліди було закладено у пластикових стаканчиках об'ємом 200 мл у лабораторіях Черкаського національного університету ім. Б. Хмельницького. Повторність варіантів дослідів триразова. Насіння крес-салату пророщували рулонним методом. Рулони ставили у стаканчик з відповідною водною витяжкою та з витяжкою з додаванням гумісолу-супер. Через 15 діб після висівання провели такі дослідження:

- визначали схожість насіння рослин крес-салату;
- виміряли висоту рослини;
- обрахували кількість листків і описали їхню морфологію;
- виміряли довжину головного кореня та обрахували кількість бічних коренів.

Статистичну обробку результатів здійснили за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Excel» [4,6].

У всіх дослідах контролем слугували рослини, які вирощені на водній витяжці з умовно чистої проби ґрунту і у водній витяжці з умовно чистої проби ґрунту з додаванням гумісолу-супер.

визначили вміст рухомих форм купруму, цинку, плумбуму та кадмію.

Вміст рухомих форм йонів важких металів у досліджуваних пробах ґрунту не перевищував ГДК. Найбільшу концентрацію йонів купруму, цинку та свинцю спостерігали у зразках ґрунту з пунктів 1, 2, 4, 7. У пробах ґрунту з пунктів 1, 3, 7, 8 відмітили високий вміст йонів кадмію. Найменш забрудненими важкими металами виявилися проби ґрунту відібрані у пункті 9.

Аналізуючи одержані результати за схожістю насіння крес-салату, слід відмітити, що при збільшенні концентрації солей важких металів схожість насіння знижується. У варіантах з додаванням гумісол-супер також спостерігається зниження схожості насіння з підвищенням кон-

центрації важких металів, проте схожість насіння в порівнянні з попередніми варіантами була вищою. В контролі схожість насіння без гумісолу становила 97,2%, а з гумісолом - 99,0%. Найнижча схожість насіння (63%) спостерігалась у водній витяжці з ґрунту відібраного у пункті 1. З додаванням гумісолу-супер схожість насіння дещо зростала – 70,7%.

Найменший вплив на схожість насіння крес-салату чинили водні витяжки з ґрунту відібраного у пунктах 8 та 9. Якщо у варіанті 8 та 9 схожість становила 90,8 та 94,2%, то у варіанті 8 та 9 з додаванням гумісолу - 95,0 та 97,0% (рис. 1).

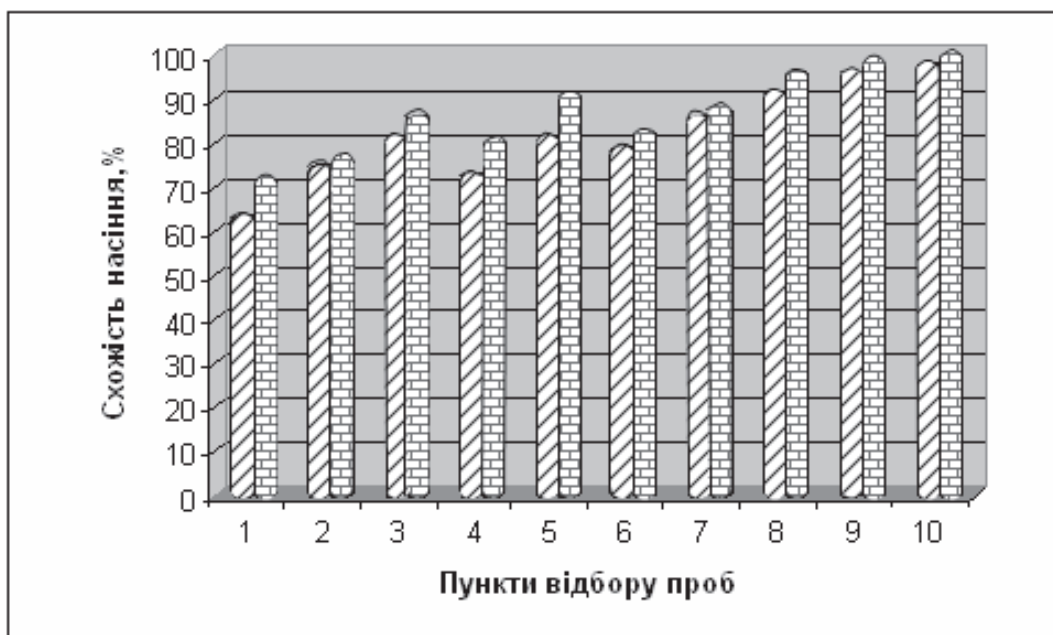
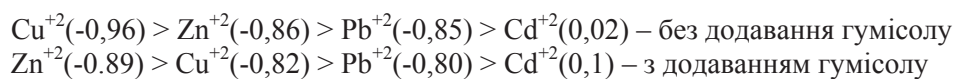


Рис. 1. Вплив йонів важких металів на схожість крес-салату (*Lepidium sativum* L.):

▨ – без гумісолу, ▤ – з гумісолом

Залежність між вмістом важких металів у водних витяжках досліджуваного ґрунту та схожістю насіння крес-салату вивчена за допомогою



Також для аналізу результатів за схожістю насіння крес-салату ми скористалися моделлю багаторядного алгоритму за методом групового врахування аргументів. За допомогою даної моделі ми виявили силу впливу окремого йону важкого металу, навіть якщо у водній витяжці досліджуваних зразків ґрунту входили іони Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} в різних концентраціях. Так, йони Cd^{2+} негативно впливають на схожість насіння крес-салату, сила впливу дорівнює 55,75%,

кореляційного аналізу, результати якого можна представити у такій послідовності:

негативна дія йонів Pb^{2+} становить 21,8%, йонів Zn^{2+} – 5,17%. Слід відмітити, що гумісол також сприяє підвищенню схожості насіння крес-салату, сила його впливу дорівнює 17,1%.

Розглянемо особливості росту стебла та кореневої системи крес-салату. Слід відмітити, що в контролі (водна витяжка з умовно чистої проби ґрунту) висота рослин на 15 день експерименту становила $5,01 \pm 0,2$ см, а в другому контролі (водна витяжка з умовно чистої проби

грунту з додаванням гумісолу) $5,44 \pm 0,15$ см. У рослин крес-салату зафіксовано достовірне пригнічення росту надземної частини рослини під дією водних витяжок ґрунту з пунктів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 (в порівнянні з контрольними рослинами), яке відповідно становило 25,2%, 22,2%, 18,1%, 32,6%, 12%, 22,2%, 20%, 3,2%. Винятком була водна витяжка ґрунту з пункту 7, ріст рослин крес-салату був більшим за контрольні ($5,2 \pm 0,47$ см). В досліді з гумісолом висота була меншою ніж в контролі, але була більшою ніж у

$\text{Cu}^{+2}(-0,63) > \text{Zn}^{+2}(-0,61) > \text{Pb}^{+2}(-0,38) > \text{Cd}^{+2}(-0,22)$ – без додавання гумісолу
 $\text{Zn}^{+2}(-0,85) > \text{Pb}^{+2}(-0,74) > \text{Cu}^{+2}(-0,61) > \text{Cd}^{+2}(-0,17)$ – з додаванням гумісолу.

Водні витяжки ґрунту майже в однаковій мірі впливають на довжину головного кореня і на ріст надземної частини крес-салату. Мінімальний вплив спостерігали у витяжках з пунктів 7 та 9, довжина головного кореня рослин крес-салату становила $5,72 \pm 0,35$ см і $5,52 \pm 0,22$ см. Максимальний – у пункті 1, в якому довжина головного кореня була меншою на 48,5% за контрольні рослини ($6,62 \pm 0,16$ см). У варіанті досліді 8 довжина головного кореня більша чим у контрольних рослин на 4,3%. У варіантах досліді з гумісолом довжина головного кореня у рослин, які знаходилися у водних витяжках досліді

$\text{Cu}^{+2}(-0,72) > \text{Zn}^{+2}(-0,71) > \text{Pb}^{+2}(-0,65) > \text{Cd}^{+2}(0,14)$ – без додавання гумісолу
 $\text{Zn}^{+2}(-0,56) > \text{Pb}^{+2}(-0,52) > \text{Cd}^{+2}(0,47) > \text{Cu}^{+2}(-0,46)$ – з додаванням гумісолу

Одним із завдань наших досліджень було визначення кількісних показників переходу важких металів із забрудненого середовища в рослину і впливу гумісолу-супер на цей перехід. Аналізуючи отримані результати хімічного аналізу рослин крес-салату слід відмітити, що в контролі вміст йонів важких металів у рослин на 15 день експерименту не перевищував ГДК хімічних речовин у рослинній продукції і становив для Cu^{+2} – $1,06 \pm 0,09$ мг/кг, Zn^{+2} – $7,12 \pm 0,18$ мг/кг, Pb^{+2} – $0,49 \pm 0,06$ мг/кг, Cd^{+2} – $0,01 \pm 0,002$ мг/кг. В другому ж контролі (водна витяжка з умовно чистої проби ґрунту з додаванням гумісолу) – Cu^{+2} – $0,17 \pm 0,06$ мг/кг, Zn^{+2} – $1,07 \pm 0,16$ мг/кг, Pb^{+2} – $0,29 \pm 0,04$ мг/кг, Cd^{+2} – $0 \pm 0,001$ мг/кг. У витяжках з ґрунту з пунктів 1, 2, 3, 6 вміст йонів купруму у рослин крес-салату перевищував ГДК в середньому в 1,5 рази. В досліді з гумісолом вміст йонів купруму у рослин

варіантах досліді без гумісолу. Найкраще нейтралізував негативний вплив йонів важких металів гумісол у варіанті досліді 4, 6, 8, висота у цих рослин більша на 27%, 14,6%, 12,7% ніж у варіанті без гумісолу.

Застосування кореляційного аналізу для встановлення залежності між вмістом важких металів у водних витяжках досліджуваного ґрунту та висотою рослин крес-салату, дало можливість розташувати важкі метали за ступенем впливу в такій послідовності:

джуваних проб ґрунту, була нижчою ніж у контрольних рослин з гумісолом в середньому на 35,2%. Винятком було перевищення довжини головного кореня у витяжці з пункту 8 – на 26,3%. У витяжці з пунктів 4 та 8 з додаванням гумісолу спостерігалось збільшення довжини головного кореня порівняно з варіантами без гумісолу на 30,9% та 30,25%.

З використанням кореляційного аналізу ми розташували важкі метали в певній послідовності залежно від їхнього вмісту у водних витяжках досліджуваного ґрунту та довжиною головного кореня рослин крес-салату:

крес-салату був в межах норми. Гумісол зменшував перехід Cu^{+2} з забрудненого середовища в рослини на 40,6 – 90,4%. Вміст йонів цинку у рослини крес-салату майже в усіх пунктах, окрім пункту 8, перевищував ГДК в 1,8 – 3,9 рази. Додавання гумісолу зменшувало перехід на 39,5 – 84,9% (рис. 2б.). А от вміст йонів плумбуму навіть з додаванням гумісолу перевищував ГДК в усіх варіантах досліді. Додавання гумісолу зменшувало його перехід в рослини лише на 41,9% (рис. 2в.).

Перевищення ГДК йонів кадмію зафіксували у рослин, які були вирощені на водних витяжках з ґрунту з пунктів 1, 2, 3, 4, 8 без додавання гумісолу та пункті 1 з додаванням гумісолу (рис. 2г.). Гумісол зменшував перехід йонів кадмію з забруднених водних витяжок ґрунту до рослин в середньому на 44,5%.

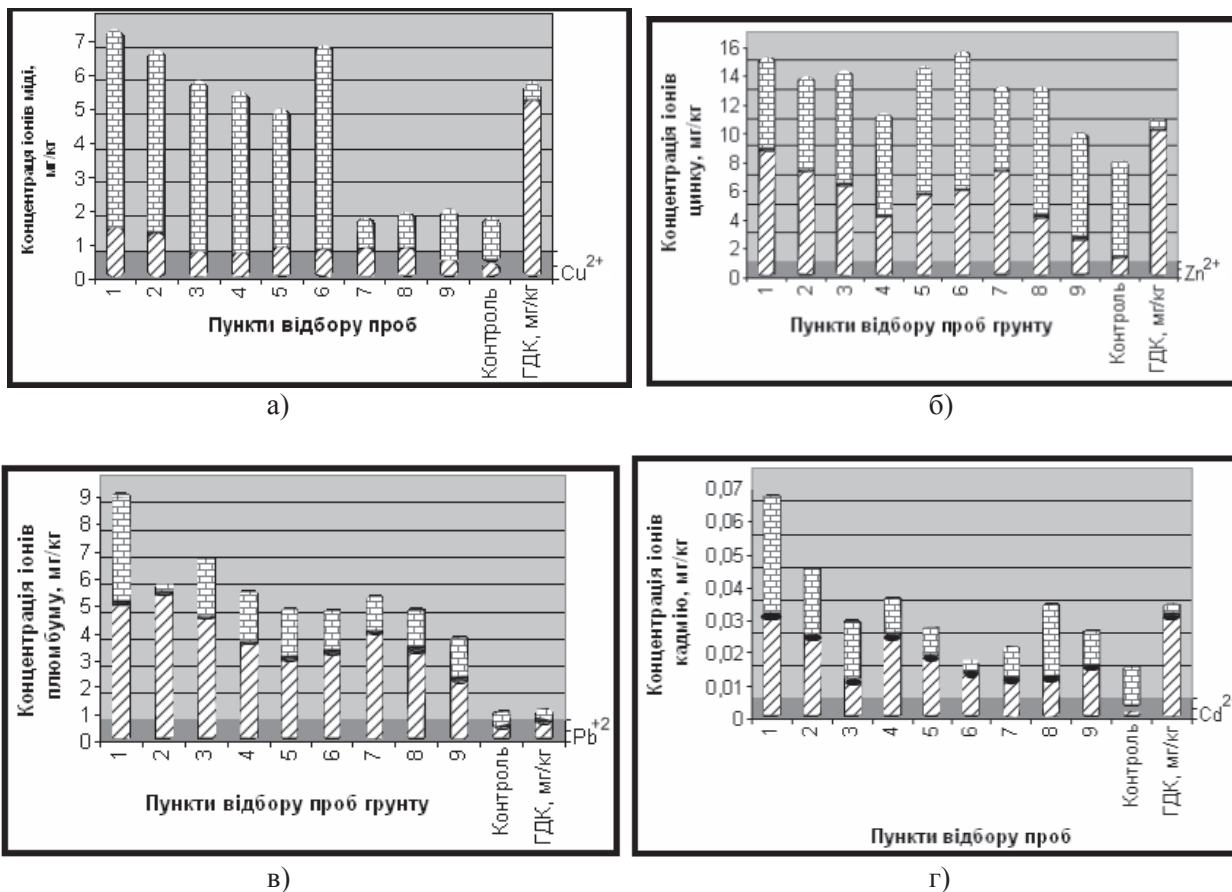


Рис.2 Вміст йонів купруму (а), цинку (б), плумбуму (в) та кадмію (г) в рослинах крес-салату (*Lepidium sativum L.*):

▨ - без гумісолу, ▩ - з гумісолом

Висновки

1. Ґрунти досліджуваних територій міста Черкаси містять відносно високий вміст рухомих форм важких металів, хоч і менший ніж ГДК. Не дивлячись на це, їх комплексна дія має помітний вплив на морфометричні показники надземної та підземної частини крес-салату (*Lepidium sativum L.*).

2. Фітотоксична дія йонів важких металів у витяжках з ґрунту проявилася в зниженні схожості насіння крес-салату, тоді як додавання до відповідних витяжок з ґрунту гумісолу пом'якшувало цей негативний вплив важких металів. Негативна сила впливу йонів Cd²⁺ стано-

вить 55,75%, Pb²⁺ – 21,8%, а йонів Zn²⁺ – 5,17%.

3. Йони важких металів у витяжках з ґрунту пригнічували ріст надземної частини проростків крес-салату в середньому на 20,5% та підземної частини – на 29%. Додавання гумісолу до витяжок з ґрунту покращувало ріст рослин в середньому на 6,6%, а головного кореня - на 8,3%.

4. Перехід йонів важких металів в системі «ґрунт–рослина» можна розташувати у наступний ряд: Pb²⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺ > Cu²⁺. Гумісол-супер зменшував перехід йонів важких металів у рослини, а саме Cu²⁺ в 6,3 рази, Zn²⁺ в 2,4 рази, Cd²⁺ в 1,8 раз, Pb²⁺ в 1,4 рази.

Література

1. Дідух Я.П., Плюта П. Г. Фітоіндикація екологічних факторів. АН України. Ін-т ботаніки ім. М.Г. Холодного. — Київ: Наук. думка, 1994. — 280 с.
2. Илькун Г.М. Тяжелые металлы в системе почва – растение. – Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, 1991. – 151 с.
3. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. – М.: Мир, 1989. – 439 с.
4. Коваленко С.О., Стеценко А.І., Хоменко С.М. Статистичний аналіз експериментальних даних за допомогою Excel. Навчальний посібник. – Черкаси: видавничий відділ Черкаського державного університету ім. Богдана Хмельницького, 2002. – 114 с.
5. Корнелюк Н.М., Мислюк О.О. Антропогенні фактори аеротехногенного забруднення м. Черкаси важкими

металами. // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. – 2007 – № 4 – <http://eko.org.ua/ua>.

6. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии. Учебно-методическое пособие. – М: изд-во Москв. ун-та, 1978. – 265 с.
7. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование : учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсева и др.; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 288 с.

DERIY S.I., BILONOGKO V.Y., PEDCHENKO M.O.

*Cherkasy National University after B. Khmelnytsky
Ukraine, 18031, Cherkasy, Shevchenko Boulevard, 81*

THE USING OF LEPIDIUM SATIVUM FOR THE ESTIMATION OF HEAVY METAL IONS CONTENTS IN A MODELED WATER CULTURE

Aims. Bio-testing of soil toxicity of Cherkasy technogenic areas with different intensity of motor transport and industry impact by plant indicator (*Lepidium Savitum* L.). **Methods.** Soil samples were taken in summer-autumn period in ten different points of Cherkasy with different intensity of motor transport and industry impact. The content of heavy metal elements (Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Pb²⁺) in soil was determined in the laboratory of chemical toxicological research. Garden cress seeds were grown with roll method. Results were processed statistically with the help of “Microsoft Excel” computer program. **Results.** Bio-testing of soils with increased content of heavy metals was implemented by plant indicator in some technogenic areas of Cherkasy with different intensity of motor transport and industry impact. **Conclusions.** Combined effect of heavy metals has a significant influence upon the morphometric parameters of garden cress (*Lepidium Savitum* L.) above-ground and under-ground parts. Adding Humisol to soil extract mitigated the negative impact of these compounds on mentioned parameters and decreased the transition of heavy metal ions to plants. **Key words:** heavy metals, morphometric parameters, bio-indexation.

ДРАГАВЦЕВ В.А.

*Агрофизический институт Россельхозакадемии
Россия, 195220, г. Санкт-Петербург, Гражданский проспект, 14, e-mail: dravial@mail.ru*

О ПУТЯХ СОЗДАНИЯ ТЕОРИИ СЕЛЕКЦИИ И ТЕХНОЛОГИЙ ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ И УРОЖАЯ РАСТЕНИЙ

В период 1984-2012 гг. группой исследователей была создана теория эколого-генетической организации количественных признаков (ТЭГОКП) [1,2] и развиты теоретически и экспериментально 24 следствия из нее [3,4,5,6]. Главное положение теории: при смене лимитирующего рост и развитие фактора внешней среды меняются спектр и число генов, детерминирующих один и тот же количественный признак (КП). Показано, что признаки «интенсивность транспирации» и «интенсивность фотосинтеза» в течение суток детерминируются поочередно двумя и тремя разными спектрами генов соответственно [7]. Механизм этого явления сейчас стал вполне очевиден. Известно [8], что общее количество генов, экспрессируемых в клетках человека, около 24000, из которых 11000 экспрессируются в клетках любого типа. Если этот принцип справедлив для растений, то очень легко объяснить результаты следующих опытов.

Если два сорта пшеницы – один с геном Lr (устойчивости к бурой ржавчине), другой – без этого гена высеять рядом и заразить бурой ржавчиной, то у первого сорта только продукт одного гена Lr – фитоантисипин – будет «подпирать» признаки продуктивности, а у второго сорта эти признаки будут развиты очень слабо. При скрещивании этих сортов на фоне бурой ржавчины в поколении F₂ мы получим расщепление по признакам продуктивности 3:1 – результат влияния продукта только одного гена, хотя параллельно с ним экспрессируются тысячи других генов. На фоне без ржавчины моногенная детерминация признаков продуктивности исчезает, их наследование традиционно описывается гипотезой полигении. Таким образом, лим-фактор среды «заставляет» влиять на признак продукты тех генов, которые обеспечивают наибольшую адаптивность данного генотипа к данному лим-фактору.

Кэксер [9] в своем докладе на симпозиуме

в Бристольском университете в 1959 году подчеркнул: «Я, конечно, знаю, что вся генетика основана на предположении о высокой точности и воспроизводимости действия генов. Такое ложное предположение могло возникнуть из-за того, что нет никаких доказательств, подтверждающих, что в генетических экспериментах измеряется именно первичное действие генов... Результаты развития могут определяться не генами, а кинетической структурой системы (С.61). И далее: «В процессе индивидуального развития (а свойства продуктивности не наследуются, а развиваются в онтогенезе, В.Д.) гены следует рассматривать не как диктаторов, а скорее как государственных служащих, выполняющих свою работу в рамках определенных традиций» (С.63).

ТЭГОКП подтвердила позицию Кэксера. Клетку растения можно сравнить с осажденной крепостью, в которой работают бригады скромных оружейных мастеров (генов). Одна бригада делает винтовки, другая – пулеметы, третья – пушки, четвертая – пули и снаряды. Но какие продукты этих оружейников будут применены при обороне крепости – это определяет противник (конкретный лим-фактор среды). Если на крепость наступает пехота – стреляют винтовки, если конница – пулеметы, если танки – то пушки. Блоки генов (бригады оружейников) – это не генералы, отдающие жесткие приказы о том, какой величины должен быть признак продуктивности, а скромные мастера, делающие свой оружейный продукт, который либо «выходит» на борьбу с противником (лим-фактором среды), либо нет – это определяется только спецификой противника, т.е. спецификой лим-фактора среды [10]. Главные следствия из ТЭГОКП – расшифрованы механизмы возникновения и созданы методы прогноза для: 1) эффектов взаимодействия «генотип-среда» (ВГС), 2) трансгрессий, 3) экологически зависимого гетерозиса, 4) знаков и уровней генотипических и экологических корреляций, 5) сдвигов доминирования, 6) гомеостаза продуктивности и др. Созданы методы управления амплитудой генотипической изменчивости КП и числом генов, «выходящих» на КП. Показано, что эколого-генетическая природа сложного, хозяйственно важного КП, не может быть описана языками менделевской, биометрической и молекулярной генетики. Только язык ТЭГОКП строго описывает поведение сложных КП в эволюции и селекции [10].

Уровни продуктивности и урожая растений определяются не генами КП, а эффектами ВГС, которые являются эмерджентными (заново

возникающими) свойствами высоких уровней организации жизни (онтогенетический, популяционный, фитоценотический) и отсутствуют на молекулярном уровне. Механизм ВГС подробно изучен с позиций ТЭГОКП и окончательно выяснен. ВГС – это смена наборов продуктов генов, влияющих на признак, при смене лим-фактора внешней среды [10].

Вопреки прозвучавшим в 70-х годах призывам академика В.А. Энгельгардта о необходимости разворота биологии от редуционизма к синергизму, история биологии распорядилась по другому: все главные организационные усилия и средства были брошены в молекулярную биологию и генетику. Это было слепое копирование научных трендов США и Европы, в результате чего в РАН в бюджете 2012 г. на программу «Молекулярная и клеточная биология (МКБ)» выделен 191 млн. руб. Газета «Поиск» № 3 от 20.01.12, С. 3 пишет: «так сложилось исторически, и ни у кого рука не поднимается это положение менять». Академик Г. Месяц (там же) выражает «недоумение постоянными требованиями координатора МКБ академика Г.П. Георгиева еще больше увеличить финансирование программы. Нельзя же выделять на МКБ все конкурсные средства».

Сегодня многие государства вкладывают огромные суммы в геномику и протеомику, но ни в одном НИИ (и в России, и за рубежом) пока еще не ни одной лаборатории, разрабатывающей тему: «Расшифровка механизмов ВГС и создание методов прогноза ВГС для выведения новых урожайных сортов». Между тем, самый мощный вклад в эко-генетическое повышение урожаев могут дать только эффекты ВГС. Если сорт озимой пшеницы Безостая 1 (селекции акад. П.П. Лукьяненко) вырастить под Москвой, то он даст 10 ц/га. На Кубани он легко дает до 100 ц/га, т.е. ВГС повышает урожай на 1000%. Традиционные генетические механизмы аналитической и синтетической селекции (каждый в отдельности) могут поднять урожай лишь на 5-10%. Шведский сорт яровой пшеницы Ранг, интродуцированный в Тюменскую и Омскую области в 60-е годы, обогнал по урожаю на 30-40% стандартные сорта и был тут же районирован. Эвкалипт из Австралии, привезенный в Уругвай, ускорил свой рост в 2 раза. Вот что делают эффекты ВГС. За счет ВГС на Сахалине проявляется гигантизм кормовых трав (в Европе они – по колено, на Сахалине скрывают всадника с лошадью. Как тут не вспомнить замечательного генетика и селекционера Брюейкера: «Более половины населения нашей плодородной Земли имеет слиш-

ком мало пищи, и даже очень глубокое знание гена дает небольшое утешение голодным людям, пока оно не выражается в калориях» [11].

ТЭГОКП показала, что традиционные подходы молекулярной генетики (MAS, QTL) вряд ли смогут серьезно помочь эколого-генетическому приращению урожая в процессе селекции, тем более, что генетики, развивая в течение 147-и лет (от Г. Менделя) свою науку, так и не нашли специфических генов продуктивности, величины урожая, горизонтального иммунитета, гомеостаза урожая (пластичности сорта), засухо-, зимо-, жаро-, холодоустойчивости и т.д., не локализовали их, не выделили, не клонировали, не секвенировали и не определили их продукты. Причины этого объяснил крупнейший молекулярный генетик Гюнтер Стент [12] еще в 1974 г.: «Поиски «молекулярного» объяснения сознания являются напрасной тратой времени, поскольку физиологические процессы, ответственные за это ощущение, задолго до того, как будет достигнут молекулярный уровень, распадутся до ординарных рабочих реакций, не более или менее удивительных, чем процессы, происходящие, например, в печени». Хотя с ним и не согласен директор Курчатовского Центра М. Ковальчук: «Для изучения природы сознания необходимо понимание молекулярных процессов», однако все знания системной биологии и современной эпигенетики говорят только в пользу Г. Стента. Недаром США выделили в 2012 г. на программу «Коннектом» (расшифровку полной структуры нейронных связей и их лабильных сдвигов между 100 млрд. нейронов в мозге человека) миллионы долларов. «Коннектом» – более амбициозный проект, чем «Геном человека», а ведь по сути – это изучение феномена ВГС – лабильной структуры связей между нейронами под воздействием внешних факторов и в основном на уровне нейронных модулей, а не на молекулярном уровне. («Поиск», № 4, от 27.01.12)

Недавно Брюс Липтон опубликовал свою теорию, очень сходную с ТЭГОКП [13], позволяющую по иному взглянуть на биологию клеток и на причины многих болезней, но его первые публикации вышли из Стэнфордского университета только в 1991 г, тогда как ТЭГОКП появилась в ДАН СССР в 1984 г.[2].

Подобно тому, как невозможно изучать сознание на молекулярном уровне, невозможно изучать на том же уровне самый мощный «рычаг» повышения урожая растений – ВГС, которое бесследно исчезает на молекулярном уровне, подобно сознанию, являясь эмерджентным свойством. Оно возникает при взаимодействии про-

дуктов генов с лабильными в течение суток, недель, месяцев – лим-факторами среды и только на высоких уровнях организации жизни.

Все генетические операции с «большими» генами Г. Менделя, включая трансгеноз, способны помочь повышению продуктивности и урожайности только в тех случаях, когда «большой» ген в определенном интервале средовых условий «выходит» на детерминацию свойства продуктивности. К сожалению, менделевских генов в геномах растений найдено очень мало – всего 1-3% от суммарного объема генов родового генома. Продукты оставшихся 97% генов, во-первых, пока почти неизвестны, во-вторых, находятся в сложнейших взаимодействиях друг с другом, но, главное, – с постоянно меняющимися (даже в течение суток) лим-факторами внешней среды, которые «заставляют» те или иные продукты генов поочередно детерминировать сложный признак, соответственно смене лим-факторов.

У трансгеноза, который сегодня может работать только с «большими» генами Г. Менделя, – очень много слабых мест: «существующие методы трансформации растений малоэффективны, видо- и сортоспецифичны, приводят к случайному встраиванию чужеродной ДНК в геном реципиента, накладывают ограничения на количество переносимой информации и т.д. Переброс трансгенов из одного сорта в другой требует многократных возвратных скрещиваний и, главное, – не является генетически чистой процедурой, поскольку вместе с чужеродной ДНК в процессе случайной рекомбинации происходит перенос различных «кусков» ДНК сорта-донора. Трансгены в сегодняшних коммерческих сортах работают (экспрессируются) постоянно, и, как правило, во всех органах и тканях растения. Поскольку эффективной процедуры встраивания трансгенов в заранее заданный участок генома не существует, манипулирование даже несколькими независимыми признаками и их координированный переброс в сотни сортов превращаются в логистический кошмар для селекционных компаний [14, С. 97-98].

Сегодня в СМИ циркулируют убеждения, что только трансгеноз накормит человечество. Так журнал «Машины и механизмы» № 1 (88), январь 2013, С. 7 в статье «Расшифрован геном пшеницы» пишет: «Идентификация 96000 генов пшеницы... поможет ученым получить сорта, устойчивые к различным погодным условиям, последствиям изменения климата, вредителям. Да, к генной инженерии можно относиться по-разному, но отрицать, что сегодня это практически единственный способ накормить голодаю-

щих в таких странах как Чад, Конго или Эфиопия, - нельзя». Вот такая категорическая позиция.

Однако ТЭГОКП показала, что даже если в будущем удастся преодолеть перечисленные выше трудности трансгеноза, то, по причине «блуждающих» спектров генов, детерминирующих свойства продуктивности, у трансгеноза вряд ли появятся мощные стратегические пер-

спективы создать надежные молекулярно-генетические технологии управления продуктивностью и урожаем – важнейшими компонентами продовольственной безопасности. Такие технологии в принципе созданы ТЭГОКП, и они уже успешно работают более чем в 30 российских и зарубежных генетических и селекционных центрах.

Литература

1. Драгавцев В.А., Цильке Р.А., Рейтер Б.Г., и др. Генетика признаков продуктивности яровых пшениц в Западной Сибири. Изд. «Наука» СО АН, Новосибирск. – 1984. – 230 с.
2. Драгавцев В.А., Литун П.П., Шкель Н.М. и др. Модель эколого-генетического контроля количественных признаков растений // Доклады АН СССР. – 1984. – Т. 274. – № 3. – С. 720–723.
3. Драгавцев В.А. Эколого-генетический скрининг генофонда и методы конструирования сортов с/х растений по урожайности, устойчивости и качеству. – Изд. ВИР. – СПб. – 1998. – 52 с.
4. Кочерина Н.В., Драгавцев В.А. Введение в теорию эколого-генетической организации полигенных признаков растений и теорию селекционных индексов. – АФИ. – СПб. – Изд. Центр «Дон Боско». – 2008. – 86 с.
5. Теория эколого-генетической организации количественных признаков. // Толковый словарь терминов по общей и молекулярной биологии, общей и прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике. – М.: Академкнига, М.: «Медкнига». – 2008. – Т. 2. – С. 308.
6. Чесноков Ю.В., Почепня Н.В., Бёрнер А., Ловассер У., Гончарова Э.А., Драгавцев В.А. Эколого-генетическая организация количественных признаков растений и картирование локусов, определяющие агрономически важные признаки у мягкой пшеницы. // Доклады РАН. – 2008. – Т. 418. – № 5. – С. 1–4.
7. Драгавцев В.А. Новый метод генетического анализа полигенных количественных признаков растений. // В книге «Идентифицированный генофонд растений и селекция. – 2005. – СПб. – С. 20–35.
8. Alberts B., Bray D., Lewis Ralf M., Roberts K., Watson J. Molecular biology of the cells. Ed. By Robertson. – Garland. – New York. – 1994. – 369 p.
9. Кэксер Г. Кинетические модели развития и наследственности // Моделирование в биологии. – И х Л.– М. – 1963. – С. 42–64.
10. Драгавцев В.А., Уроки эволюции генетики растений // Журнал «Биосфера». – 2012. – СПб. – Т. 4. – № 3. – С. 251–262.
11. Брюейкер Дж. Л. Сельскохозяйственная генетика. – М.: «Колос». – 1966.
12. Стент Г. Молекулярная генетика. – И х Л., М. – 1974.
13. Липтон Б. Умные клетки: биология убеждений. – Изд. «София», 2011. – 224 С.
14. Лутова Л.А. Современные технологии в биологии растений (материалы Всероссийской школы молодых ученых по экологической генетике). – Краснодар, 2011. – С. 82–100.

DRAGAVTSEV V.A.

Agrophysical institute of Russian Agricultural Academy

Russia, 195220, Saint-Petersburg, Grazhdansky prospect 14, e-mail: dravial@mail.ru

ABOUT WAYS OF CREATION OF BREEDING THEORY AND TECHNOLOGIES OF ECO-GENETIC INCREASING OF PLANTS PRODUCTIVITY AND YIELD

Aims. To determine which technologies of genetic improvement of economically important plants traits due dominate in future – transgenesis or management by genotype-environment interaction. **Methods.** In period 1984-2012 the theory of eco-genetic organization of plants quantitative traits (TEGOQT) was developed and 24 consequences from it were investigated. Main position of the theory: change of limiting factor of environment lead to change of spectrum and number of genes, which determine the same quantitative trait (QT). Main consequences from TEGOQT: decoded the mechanisms of forming and created methods of prognosis for: 1) effects of genotype-environment interaction (GEI), 2) rise of transgressions, 3) rise of ecologically dependence heterosis, 4) signs and levels of genotypical and environmental correlations, 5) displacements of dominance, 6) homeostasis of productivity and so forth. **Results.** It is shown that phenomenon GEI can to give maximal contribution to productivity and yield, but it disappear on molecular level. Because main way for increasing of productivity and yield - it is developing of management on the level GEI, but not on the level of classical mendelism and molecular transgenesis.

Key words: economically important plants, theory of eco-genetic organization of plants quantitative traits, transgenesis, management by genotype-environment interaction.

КОЗУБ Н.О.^{1,2}, СОЗІНОВ І.О.¹, БІДНИК Г.Я.^{1,2}, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.^{1,2}, КАРЕЛОВ А.В.^{1,2},
БЛЮМ Я.Б.² СОЗІНОВ О.О.^{1,2}

¹Інститут захисту рослин НААН,

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

²ДУ "Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України",

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

ВПЛИВ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ СУХИХ ЗЕРЕН НА ПРОДУКТИВНІСТЬ РОСЛИН М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ, ЩО ВІДРІЗНЯЮТЬСЯ ЗА ПРИСУТНІСТЮ ЖИТНЬОЇ 1BL/1RS ТРАНСЛОКАЦІЇ

Серед радіобіологічних ефектів, що проявляються на організменному рівні у рослин, найбільш помітними є зміни у виживанні та величині ознак продуктивності порівняно з контролем [1]. Крім того, продуктивність рослини може розглядатись як інтегральний показник адаптивності і є результатом взаємодії генотип-наколишне середовище, яке включає як абіотичні, так і біотичні фактори.

Гамма-опромінення сухого зерна дозою 200 Гр, що є оптимальною дозою для обробки сухого насіння озимої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. за максимальною загальною частотою видимих мутацій в поколіннях M1–M3 [2], приводить до рівнів виживання рослин від 8 до 56% від значення в контролі, залежно від сорту [2-4]. Очевидно, рівень виживання рослин M1 (вирощених з опроміненних зерен) пшениці залежить від ґрунтово-кліматичних умов, погодних умов і природи досліджуваного матеріалу. Так, опромінення зерна в дозі 200 Гр призводило до виживання 86% рослин від рівня у контролі у трьох пакистанських сортів м'якої пшениці [5],

тоді як рівень виживання гібрида F₁ пшениці на основі сорту Безоста 1 при дозі 200 Гр не відрізнявся від цього показника в контролі [6]. У багатьох дослідженнях виявлено, що опромінення дозами вище 150 Гр викликає істотне зниження продуктивності рослин та її елементів (продуктивне кущення, маса зерна з колоса) – 50-80% від значення у контролі [2]. В переважній більшості випадків при дослідженні наслідків гамма-опромінення сухого зерна пшениці матеріалом слугували сорти.

Задачею нашого дослідження було вивчення впливу гамма-опромінення сухих зерен на ознаки продуктивності рослин пшениці м'якої озимої в залежності від присутності в геномі житньої 1BL/1RS транслокації в гомозиготному або гетерозиготному стані. Житня 1BL/1RS транслокація є найпоширенішою чужинною транслокацією серед комерційних сортів м'якої пшениці [7]. Зокрема серед українських сортів зони Лісостепу частка сортів з цією інтрогресією, створених в останні 15 років, складає більше 40% [8].

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження слугувала популяція рослин F₂ від схрещення майже ізогенних ліній (МІЛ) озимої м'якої пшениці *T. aestivum* за гліадиновими локусами GLI-D1-4 × GLI-B1-3 на основі сорту Безоста 1. Лінії створено д.б.н. М.М. Копусем на основі сорту Безоста 1 [10]. Вихідні лінії відрізняються лише за присутністю пшенично-житньої транслокації 1BL/1RS (її маркером є гліадиновий алель Gli-B1l [10]) та за гліадиновим локусом Gli-D1 і мають наступні генотипи за маркерними локусами (позначення алелів за каталогом [10]): лінія GLI-B1-3: Gli-B1l Gli-D1b; лінія GLI-D1-4: Gli-B1b Gli-D1j. Сухі зерна F₂ були опромінені гамма-радіацією в до-

зах 150, 200 і 300 Гр. Контрольні та опромінені зерна F₂ (по 940 зерен кожного варіанту) були посіяні широкорядним посівом на дослідній ділянці (м. Київ) у 2005 р. в оптимальні строки з чергуванням рядів «контроль», «варіант з гамма-опроміненням зерен дозою 150 Гр», «варіант з гамма-опроміненням зерен дозою 200 Гр», «варіант з гамма-опроміненням зерен дозою 300 Гр». Довжина ряду – 1,35 м, відстань між рядами – 30 см, відстань між рослинами в ряду – 7 см. Всього вирощено 709 рослин F₁ контрольного варіанту, 710 рослин варіанту з гамма-опроміненням зерен дозою 150 Гр, 671 рослину варіанту з гамма-опроміненням зерен дозою

200 Гр, 362 рослини варіанту з гамма-опроміненням зерен дозою 300 Гр. Кожну рослину F₂ охарактеризовано за ознаками «кількість продуктивних стебел», «маса зерна з рослини» та «маса зерна з колоса».

Для визначення генотипу за локусами гліадинів з кожної рослини F₂ проаналізовано суміш 7 зернівок F₂ (1-3 повторності) електрофорезом гліадинів за методикою [8]. Вживання рослин визначали як відношення кількості рослин F₂ до кількості висіяних зерен F₂. Для аналізу розщеплень використовували критерій χ^2 . Відно-

сне зниження ознаки порівняно з контролем визначали як відношення різниці між значенням у контролі (К) та у варіанті з опроміненням (О) до значення ознаки у контролі * 100%: (К-О)* 100/К. Достовірність різниці за кількісними ознаками оцінювали за критерієм Стьюдента. Для аналізу адитивних, домінантних і епістатичних ефектів маркерних локусів на прояв кількісної ознаки використовували модель Кокерхема з двохлокусною взаємодією [11]. Параметри позначали, як описано Мазером і Джинксом [12].

Результати і обговорення

Вживання рослин F₂ досліджуваної популяції становило $0,754 \pm 0,014$ у контролі, практично не відрізнялось від цієї величини після опромінення сухих зерен дозою гамма-опромінення 150 Гр (0,755). Після опромінення сухих зерен дозою гамма-опромінення 200 Гр вживання рослин було дещо нижчим (0,714) – 95% від значення у контролі. Опромінення дозою 300 Гр знижувало вживання рослин в два рази, порівняно з контролем (0,385) – 51% від значення у контролі.

Гамма-опромінення призводило до суттєвого зниження ознак продуктивності популяції рослин F₂ порівняно з контролем, за винятком маси зерна з колоса у варіанті з опроміненням

150 Гр (табл. 1). Найістотніше зменшення ознаки при опроміненні спостерігалось для маси зерна з рослини. Так, при опроміненні дозою 300 Гр маса зерна з рослини зменшується на 63%, число продуктивних стебел – на 50%, тоді як маса зерна з колоса – на 27%. Маса зерна з рослини є складною ознакою, яка визначається наступними компонентами: числом продуктивних стебел, числом зерен в колосі та масою зернівки, в свою чергу маса зерна з колоса визначається числом зерен в колосі та масою зернівки. Зниження урожайності рослин в більшій мірі визначається закладкою меншого числа стебел при осінньому куцненні у варіантах з опроміненням.

Таблиця 1. Середні значення ознак продуктивності \pm стандартна похибка у популяції рослин F₂ в контролі та після гамма-опромінення зерен різними дозами, в дужках - відносне зниження ознак продуктивності у популяції рослин F₂ в після гамма-опромінення зерен різними дозами (порівняно з контролем), %

	Число продуктивних стебел	Маса зерна з рослини, г	Маса зерна з колоса, г
Контроль	8,216 \pm 0,152	12,261 \pm 0,306	1,457 \pm 0,02
150 Гр	7,11 \pm 0,141* (13,5)	10,269 \pm 0,256* (16,2)	1,411 \pm 0,018 (3,2)
200 Гр	6,627 \pm 0,139* (19,3)	9,363 \pm 0,242* (23,6)	1,357 \pm 0,017* (6,9)
300 Гр	4,083 \pm 0,188* (50,3)	4,489 \pm 0,233* (63,4)	1,064 \pm 0,025* (27)

* відрізняється від контролю при P < 0,001

Було досліджено значення ознак продуктивності рослин F₂ при опроміненні сухих зерен в залежності від генотипу за маркерними локусами. Середні значення ознак продуктивності у рослин F₂ з певним генотипом за Gli-B1 в контролі і при опроміненні сухих зерен наведено в табл. 2-4. Наведені групи рослин відрізняються за коротким плечем хромосоми 1B. Gli-B11.1 – гомозиготи за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації – генотип Gli-B1b.1 – гетерозиготи, рослини з генотипом Gli-B1b.b – мають пшеничне плече 1BS.

В межах варіантів достовірні відмінності за кількісними ознаками виявлено у класів, згрупованих за локусом Gli-B1. Істотних відмінностей між середніми значеннями генотипів за локусом Gli-D1 не спостерігалось, проте деякі класи, згруповані на основі генотипу за двома маркерними локусами суттєво відрізнялись за показниками продуктивності. В контролі гомозигота без житньої транслокації істотно переважала гомозиготу за транслокацією за числом продуктивних стебел та масою зерна з рослини та гетерозиготу за числом продуктивних стебел (табл. 2,

3). При опроміненні сухих зерен дозою 150 Гр спостерігався гетерозис за ознаками маса зерна з рослини та з колоса – гетерозигота за *Gli-B1* істотно переважала обидва класи гомозигот (табл. 3, 4). За продуктивним кущенням гомозигота за житньою транслокацією мала нижче значення

ознаки ніж два інші генотипи за цим локусом (табл. 2). При збільшенні дози опромінення істотні відмінності в кількісних ознаках у різних генотипів за локусом *Gli-B1* спостерігались лише на певних генетичних фонах за локусом *Gli-D1*.

Таблиця 2. Середні значення числа продуктивних стебел у рослин F_2 з певним генотипом за *Gli-B1* в контролі і при опроміненні сухих зерен, в дужках - відносне зниження даної ознаки (порівняно з контролем), %

Варіант	<i>Gli-B1b.b</i>	<i>Gli-B1b.l</i>	<i>Gli-B1l.l</i>
Контроль	8,83 ± 0,27	8,11 ± 0,22	7,42 ± 0,34
150 Гр	7,07 ± 0,25*** (19,92)	7,47 ± 0,21* (7,84)	6,22 ± 0,27** (16,27)
200 Гр	6,78 ± 0,24*** (23,22)	6,57 ± 0,20*** (19,04)	6,48 ± 0,32* (12,69)
300 Гр	4,26 ± 0,34*** (51,74)	4,07 ± 0,28*** (49,85)	3,80 ± 0,32*** (48,81)

Відрізняється від контролю при * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Таблиця 3. Середні значення маси зерна з рослини у рослин F_2 з певним генотипом за *Gli-B1* в контролі і при опроміненні сухих зерен, в дужках - відносне зниження даної ознаки (порівняно з контролем), %

Варіант	<i>Gli-B1b.b</i>	<i>Gli-B1b.l</i>	<i>Gli-B1l.l</i>
Контроль	13,28 ± 0,55	12,14 ± 0,44	10,82 ± 0,64
150 Гр	9,81 ± 0,41*** (26,11)	11,23 ± 0,40 (7,47)	8,63 ± 0,49** (20,19)
200 Гр	9,66 ± 0,40*** (27,27)	9,20 ± 0,36*** (24,17)	9,20 ± 0,55 (14,90)
300 Гр	5,23 ± 0,51*** (60,62)	4,1 ± 0,28*** (66,24)	4,21 ± 0,45*** (61,11)

Відрізняється від контролю при ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Таблиця 4. Середні значення маси зерна з колоса у рослин F_2 з певним генотипом за *Gli-B1* в контролі і при опроміненні сухих зерен, в дужках - відносне зниження даної ознаки (порівняно з контролем), %

Варіант	<i>Gli-B1b.b</i>	<i>Gli-B1b.l</i>	<i>Gli-B1l.l</i>
Контроль	1,453 ± 0,033	1,455 ± 0,029	1,467 ± 0,05
150 Гр	1,365 ± 0,031* (6,06)	1,469 ± 0,026 (-0,96)	1,35 ± 0,043 (7,98)
200 Гр	1,376 ± 0,027 (5,30)	1,333 ± 0,026** (8,38)	1,385 ± 0,044 (5,59)
300 Гр	1,117 ± 0,047*** (23,13)	1,028 ± 0,034*** (9,34)	1,067 ± 0,050*** (27,27)

Відрізняється від контролю при * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Розрахунки за допомогою F_2 моделі Коке-рхема [11] дозволили виявити достовірний адитивний ефект локусу *Gli-B1* на прояв ознак продуктивне кущення та маса зерна з рослини в контролі (де алелем, що збільшує ознаку, є *Gli-B1b*, тобто наявність плеча 1BS). Цей же ефект зберігався й у варіанті з дозою 150 Гр для продуктивного кущення (табл. 5).

Особливістю варіанту з гамма-опроміненням зерен в дозі 150 Гр є істотний домінуючий ефект локусу *Gli-B1* на прояв всіх трьох ознак продуктивності. При опроміненні зерна вищими дозами (200 і 300 Гр) адитивний і домінуючий ефекти локусу *Gli-B1* не проявлялись, проте достовірними були деякі ефекти міжлокусної взаємодії *Gli-B1* і *Gli-D1* (табл. 5).

Таблиця 5. Достовірні ефекти маркерних локусів *Gli-B1* (а) і *Gli-D1* (б) на прояв ознак продуктивності у класів рослин F₂ від схрещення майже ізогенних ліній пшениці GLI-D1-4 × GLI-B1-3 у контролі та при гамма-опроміненні

Варіант	Число продуктивних стебел	Маса зерна з рослини, г	Маса зерна з колоса, г
Контроль	<i>da</i> ***	<i>da</i> ***	
150 Гр	<i>da</i> *, <i>ha</i> **	<i>ha</i> ***	<i>ha</i> ***, <i>-jab</i> *, <i>-lab</i> **
200 Гр	<i>-jab</i> *	<i>-jab</i> *	<i>-iab</i> *
300 Гр	<i>jab</i> *		

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Отже, гамма-опромінення, яке призводить до зниження показників продуктивності, викликає зміну ефектів маркерних локусів, а саме локусу *Gli-B1*, на прояв цих ознак. Якщо на фоні зниження середньопопуляційної маси зерна з рослини на 16% при дозі опромінення 150 Гр спостерігається гетерозис за ознаками продуктивності у гетерозигот за присутністю житньої транслокації, то подальше зниження продуктивності популяції при підвищенні дози опромінення нівелює різниці в продуктивності між генотипами за цим локусом.

Порівняння значень ознак продуктивності у певних генотипів за локусом *Gli-B1* при різних рівнях опромінення сухих зерен показало істотне зниження ознак продуктивності порівняно з контролем, крім ряду випадків (табл. 2-4). Виявлено,

що при дозі опромінення 150 Гр найменше знижує ознаки продуктивності гетерозигота за житньою транслокацією, порівняно з двома іншими класами гомозигот – % зниження продуктивного кушення у генотипів *Gli-B1b.1* в два рази нижчий, ніж у гомозигот, а за масою зерна з рослини – в три рази. Отже у варіанті з гамма-опроміненням зерен дозою 150 Гр найбільш стабільно тримає рівень продуктивності генотип *Gli-B1b.1*. При підвищенні дози опромінення до 200 Гр дещо нижчий рівень пригнічення продуктивності має генотип, гомозиготний за житньою транслокацією – *Gli-B1l.1*. Подальше збільшення дози гамма опромінення (300 Гр) в однаковій мірі пригнічує прояв ознак продуктивності у всіх трьох генотипів за цим локусом (табл. 2-4).

Висновки

Гамма-опромінення призводить до зниження показників продуктивності та викликає зміну ефектів маркерних локусів, а саме локусу *Gli-B1*, на прояв цих ознак. Виявлено відмінності в реакції на гамма-опромінення генотипів озимої м'якої пшениці, що відрізняються за присутністю житньої 1BL/1RS транслокації та її дозою: диференціальний рівень пригнічення ознак

продуктивності при певних дозах гамма-опромінення сухих зерен. У сприятливих умовах вирощування при дозі опромінення 150 Гр найбільш адаптивним є генотип-гетерозигота за присутністю житньої транслокації; при дозі опромінення 200 Гр найменше реагує на цей фактор генотип –гомозигота за присутністю житньої транслокації.

Література

1. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. – Киев: Наук. Думка. – 1989. – 384 с.
2. Моргун В.В., Логвиненко В.Ф. Мутационная селекция пшеницы. – Киев: Наук. думка. – 1995. – 626 с.
3. Оксьом В.П. Вплив мутагенних чинників на рослини M₁ озимої пшениці та його зв'язок із частотою змінених форм у другому поколінні // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 153–162.
4. Назаренко М.М. Вживаність і структура врожайності як показники мутагенної депресії у першому поколінні мутантів сортів озимої м'якої пшениці // Физиол. и биохим. культ. раст. – 2007. – Т. 39, № 5. – С. 438–446.
5. Irfaq M., Nawab K. Effect of gamma irradiation on some morphological characteristics of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // OnLine J. Biol. Sci. – 2001. – Vol. 1 (10). – P. 935–937.
6. Козуб Н.О., Созінов І.О., Блюм Я.Б., Созінов О.О. Дослідження ефектів гамма-опромінення зерен F₁ м'якої пшениці з використанням гліадинів як генетичних маркерів // Цитология и генетика. – 2013. – Т. 47, № 1. – С. 17–25.
7. Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. // Euphytica. – 1998. – Vol. 100. – P. 323–340.
8. 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.

9. Копусь М.М. О естественной геногеографии глиадиновых аллелей у озимой мягкой пшеницы // Селекция и семеноводство. – 1994. – № 5. – С. 9–14.
10. 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.
11. Kao C.-H. Zeng Z.-B. Modeling epistasis of quantitative trait loci using Cockerham's model // Genetics. – 2002. – Vol. 160. – P. 1243–1261.
12. Мазер К., Джинкс Дж. Биометрическая генетика.– М.: Мир, 1985. – 463 с.

KOZUB N.A.^{1,2}, SOZINOV I.A.¹, BIDNYK H.Ya.^{1,2}, DEMIANOVA N.A.^{1,2}, KARELOV A.V.^{1,2}, BLUME Ya.B.², SOZINOV A.A.^{1,2}

¹*Institute of Plant Protection, NAAS,*

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska Str., 33, e-mail: sia1@i.com.ua

²*State Institution "Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine", Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo Str., 2a*

THE EFFECT OF GAMMA-IRRADIATION OF DRY SEEDS ON PRODUCTIVITY OF COMMON WHEAT PLANTS DIFFERING IN THE PRESENCE OF RYE 1BL/1RS TRANSLOCATION

Aims. The effect of gamma-irradiation of dry seeds on productivity traits of common wheat plants depending on the presence of the rye 1BL/1RS translocation in the homozygous or heterozygous state was studied.

Methods. Dry F₂ seeds from the cross of Bezostaya 1 lines were treated with gamma-radiation at doses of 150, 200, and 300 Gy. Each grown F₂ plant was characterized with respect to yield traits. The presence of the rye translocation was analyzed by electrophoresis of their seeds. **Results.** At 150 Gy, the heterozygote for the translocation showed the lowest decrease in productivity traits in comparison with the control. At 200 Gy the lowest relative decline in productivity was observed in the homozygote for the translocation. **Conclusions.** Genotypes differing in the presence of the 1BL/1RS translocation show the different levels of reduction in productivity traits at certain doses of gamma-irradiation of dry seeds.

Key words: *Triticum aestivum* L., 1BL/1RS translocation, gamma-irradiation, productivity.

КОРНИЕНКО А.В.¹, БУТОРИНА А.К.¹, МОРГУН А.В.², ТРУШ С.Г.², МАНЬКО А.А.²

¹*Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова РАСХН*

Россия, 396030, Воронежская область, Рамонский район, п. ОПХ ВНИИСС, д. 84,

e-mail: kornienko@mlkbsl.vsi.ru

²*Институт корнеплодных культур НААН Украины*

Украина, 20300, Черкасская обл., г. Умань, ул. Интернациональная, 4

НОВАЯ ПАРАДИГМА ЯВЛЕНИЯ ИЗМЕНЧИВОСТИ И НАСЛЕДСТВЕННОСТИ ЖИВЫХ СИСТЕМ ОРГАНИЗМОВ

Рост, развитие, жизнедеятельность живых систем, созревание и старение подчинены законам изменчивости и наследственности, процессам, происходящим в организме в самой глубокой клетке. Они являются результатом подчинения живой системы организма, поступающим из её недр и внешней среды «процессов» генетически запрограммированных, которые могут ускоряться или замедляться за счет действия внешних (био- абioфакторов и биоинформации) и внутренних факторов.

Изменчивость и наследственность как составные части адаптивности живых систем – общие категории, присущие разуму и биоин-

формации, всему живому. Адаптивная стратегия в комплексе обладает собственной логикой развития, имеет свои концептуальные, методические, аналитические принципы, которые базируются на законах природы [1, 2, 7].

Изменчивость, как форма преодоления живой системой экстремальных условий имеет общебиологический смысл. Так клетка, ее изменчивость (современное представление о ее организации) способна под влиянием внутренних и внешних факторов (их взаимодействия) кооперативно переходить из одного состояния в другое, т. е. работать как биологический триггер.

Однако, до настоящего времени нет теоре-

тических предпосылок этого явления. В связи с этим, изложенная теория и механизмы изменчивости признаков растений на примере свеклы (*Beta vulgaris* L.) являются новыми, определяющими дальнейшее развитие и увеличение продуктивности растений в процессе освоения внешнего мира разными взаимодействующими

Методология

Изменчивость и проявление признаков основаны на законах гомологических рядов Н.И. Вавилова, принципах мутационной и рекомбинативной изменчивости, облигатных и факультативных генетических структурах, определяемых взаимодействием факторов внутренней и внешней среды.

При изложении положения изменчивости исходили из принципа не разделения всякой трудности на максимально возможное количество частей ... с целью их лучшего решения. В наших исследованиях изменчивость признака рассматривается скорее как часть более крупного, нежели как целое, которое можно разложить на части, которое созвучно с принципами общей теории систем [13, 14].

Для лучшего рассмотрения, согласно идее Жоэля де Росне, стоит перейти от традиционного микроскопа к макроскопу “Если в классической механике свойства и поведение частей управляют свойствами и поведением целого, то в квантовой механике существует совсем обратная ситуация: целое определяет поведение частей (Капра). Как правило, то же самое свойственно живой системе организма”.

Жоэль де Росне определяет систему как «множество элементов, находящихся в динамическом взаимодействии и организованных в соответствии с некоей целью». Система предполагает не просто «форму», «содержание», отдельно взятых элементов или только некое целое, а все это связанное вместе и через посредство преобразующей их организации ... Нечто целое – это еще не все. Целое намного больше, чем общая форма ... Единственное, не состоящее из частей целое – это пустота (whole is a hole).

В мире нет ничего случайного. Все это происходит – закономерно, абсолютно все. А то, что мы называем спонтанно, случайностью, есть не более чем закономерность более высокого порядка – недоступного пока нашему пониманию [4].

Теория общей системы представляет из себя междисциплинарную методологическую концепцию, касающуюся эпистемологии всего множества существующих наук и использую-

генетическими структурами нуклеотипа и цитотипа, которые во взаимодействии биоинформации с эндо- и экзофакторами, обеспечивают её проявление, что характерно для всех организмов, как это отмечает Голубовский М.Д. (1981, 1985).

щуюся в физике, химии, кибернетике, биологии, психологии, психотерапии, лингвистике, социологии, политической экономии и т.д. Как замечает Эйнштейн:

«Процесс создания новой теории не похож на строительство небоскреба на месте старой лачуги, он, скорее, напоминает восхождение на гору, когда поле обозрения понемногу изменяется, расширяется, когда обнаруживаются неожиданные связи между нашим отправным пунктом и богатством окружающей его среды. Ибо пункт, из которого мы вышли, все-таки продолжает существовать и оставаться видимым, несмотря на то, что он кажется меньше и представляет из себя лишь незначительную часть поля, открывшегося нам для обозрения» [12].

Однако, в своих исследованиях и анализе не останавливались только на синтезе, из одной крайности впадая в другую: из механизма считающего, что познание всех частей и законов по отдельности позволит однажды понять, как функционирует целое, в холизм, считающий, что познание целого объясняет то, как функционирует каждая его отдельная часть.

Предложенная терминология изменчивости, мутации и рекомбинации по проявлению признаков объясняет их изменчивость у разных видов, форм (на примере свёклы – *B. vulgaris*) растений, увеличивает значимость разнообразного и всестороннего изучения исходного материала, позволяющего создавать сорта и гибриды с заданными параметрами и адресностью к экологическим нишам и зонам [6].

Предложенные принципы позволяют не только более эффективно выделять источники и доноры важнейших признаков и свойств, но и объяснить закономерности наследования и проявления признаков, определяющие продуктивность, устойчивость, корреляцию фено- и генетической изменчивости основных признаков и свойств, с учётом сложности и наличия у разных культур (в т.ч. свёклы) разных систем размножения, с использованием методов нанобиотехнологии, циклов развития, реакции на действия био- и абиофакторов, использование явлений

гетерозиса, мутагенеза, цитоплазматической мужской стерильности и фертильности, само- и перекрёстной несовместимости, формы, размера плода, семени, корнеплода и др.

Результаты. Изменение предлагаемой терминологии и её содержание будет изложено (для лучшей контрастности) с использованием шрифта прописного. Существующая терминология — печатный шрифт.

I. Предлагаемая терминология и её содержание

Изменчивость – свойство живой системы организма проявлять, как часть и как единое, целостное, находящееся в определенной иерархической подчиненности и упорядоченности ее строения своей и систем материального мира (материи, энергии, биоинформации), и реализовывать свою генотипическую наследственную систему (нуклеотип и цитотип, облигатные и факультативные их компоненты), в зависимости от взаимодействия и степени внутреннего ее генетического родства, полученной при скрещивании или самооплодотворении (инбридинге), бесполом размножении, ее структуры – молекулярной и надмолекулярной, характера взаимодействия аллелей (одного или разных генов, блоков) с био и абиотическими факторами среды, на разных этапах органогенеза и фазах развития (растения, исходной формы, линии, сорта, гибрида, популяции, биоценоза, экосистемы), в размерах и параметрах количественные и качественные признаки.

Изменчивость – свойство живой системы организма проявлять, как часть и как целостное, генотипическую наследственную систему, в зависимости от степени внутреннего ее генетического родства, ее структуры, характера взаимодействия аллелей с био и абиотическими факторами среды, на разных этапах органогенеза и фазах развития, в размерах и параметрах количественные и качественные признаки.

Изменчивость – свойство живой системы организма проявлять в различных параметрах количественные и качественные признаки.

Мутации – закономерные наследственные количественные и качественные изменения генетического материала живой системы организма, возникшие при взаимодействии с измененным уровнем материальных, энергетических и биоинформационных, внешних и внутренних факторов, в естественных или искусственных условиях.

Мутации – полученные в результате изменений облигатных компонентов нуклеотипа и

цитотипа они всегда наследуются.

Мутации – полученные в результате изменений факультативных компонентов наследуются по материнской линии и бесполом размножении.

Мутации – наследуются в зависимости от способа и характера расположения, а так же органа, в котором они получены – растущем, стабильном или постоянно обновляемом.

Модификации – это наследственные изменения факультативных компонентов нуклеотипа и цитотипа, которые возникают под действием факторов среды, носят адаптивный характер обратимым при размножении половым способом. Наследуются при бесполом размножении.

Фенотипическая изменчивость – является следствием проявления облигатных и факультативных генетических компонентов генотипа, количества и качества характеристик взаимодействий с факторами внешней среды, определяющих генетический потенциал их максимального проявления.

В зависимости от характера, типа размножения – самоопыление, скрещивание (прямые, обратные), бесполое, *in vitro*, фенотипическое (изменчивость) проявление признаков может быть различным. Важно на каждом этапе создавать условия взаимодействия с экзо- и эндофакторами максимального проявления признака.

Механизмы комбинативной изменчивости:

1) зависимое расхождение хромосом в анафазу I мейоза при взаимодействии генетических, энергетических и биоинформационных факторов

2) кроссинговер

3) закономерное слияние гамет

4) закономерный подбор родительских пар

Основанием для изменения теоретических положений и некоторых терминов послужили теоретические и фундаментальные исследования, изложенные в мировой и отечественной литературе, а также собственные. Разработанная парадигма философско-мировоззренческих, эпистемологических, методологических, адаптивных и технологических знаний, новые принципы и методы по генетике, селекции сахароносов, сахарозаменителей и натуральных подсластителей, устойчивости к био- и абиотическим факторам, с использованием возобновляемых источников материи, энергии и биоинформации.

Основание I. Научное открытие (диплом №166) ”Закономерность проявления признака

растительных организмов” приоритет 1 мая 1999 года ВНИИСС, Корниенко А.В., Орлов С.Д. Анализ практических результатов и теоретических обобщений отечественных обобщений отечественных и зарубежных исследований.

Основание II. Известно, что квантовая постквантовая (энштейновская) физика считает, что субатомные частицы представляют из себя не виды, а внутренние связи между видами [Капра, 1983], существующие в четырехмерном вселенном пространстве – времени, в которой некоторые частицы (или античастицы) свободно перемещаются из будущего в прошлое вне всякой линейной связи между причиной и следствием. Сейчас известно, что масса – это форма энергии и её уже не связывают с определенной материальной субстанцией. А это значит, что частицы больше не могут описываться ни как трехмерные объекты, ни как бильярдные шары или песчинки. Материальные частицы могут возникать и разрушаться, при этом их масса может трансформироваться в энергию и наоборот. Оказывается, что атом – это только “вечный танец энергии”.

Основание IV. Исследования фундаментальных основ генетики, проведенное [4, 5] утверждают, что генотип – это сложная наследственная система ядерных и цитоплазматических структур.

Основание V. Генетический потенциал ограничен во времени.

Основание VI. Система “среда – организм” – это форма динамического равновесия, в котором упорядочены материя, энергия и бионформация, как составляющие, где бионформация выступает непрерывным генератором и регулятором.

Основание VII. Разработанные принципы получения мутаций с применением мутагенных факторов и физиологически активных веществ, как основ мутационной селекции и генетики *B. vulgaris*).

Основание VIII. Разработка новых направлений, изучения и раскрытия ранее неизвестных механизмов жизнедеятельности живой системы, её эволюции: нанобиотехнология, биотелемеханика, метаболомика, квантовая физика, химия и

других.

Нанобиотехнология – междисциплинарная область науки, в которой изучаются закономерности физических, энергетических и биоинформационных процессов в пространственных областях нанометровых и других размерах живых систем, с целью управления отдельными атомами, молекулами, молекулярными и другими (надмолекулярными) системами, при создании новых молекул, наноструктур, наноустройств и материалов со специальными физическими, химическими и биологическими свойствами и признаками.

Нанобиотехнология как технология, работает в субмикронном диапазоне линейных и неллинейных размеров живых систем.

Нанобиотехнология – технология, основанная на манипуляции и взаимодействии материальных, энергетических и биоинформационных факторов в живых системах на субатомарном (шкельном), атомарном, молекулярном уровне для построения её структур. Биотелематика – биоинтегрированные средства поступления, хранения, передачи, обработки и манипулировании бионформации в живых системах.

Метаболизм – поступление, обмен и превращение материи, энергии и бионформации внутри структурного подразделения растения, животного и любого живого организма. В более узком смысле – промежуточный обмен – превращение материи, энергии и бионформации внутри клетки живой системы.

Эмерджентность – биологическое свойство закономерного возникновения новых признаков, свойств и качеств у живой системы в результате поступления, обмена и превращения, взаимодействия материи, энергии и бионформации, которая первоначально ими не обладала.

Таким образом, изложена новая теория и терминология определения изменчивости, мутаций, рекомбинаций закономерностей и механизмов их проявления, позволяющие по-другому подойти с новыми принципами и методами к созданию живых систем высокопродуктивных сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, устойчивых к био и абиотическим факторам.

Литература

1. Алтухов Ю.П. Вид и видообразование / Энциклопедия современное естествознание – М, 2000. – Т. 2 – С. 34–42.
2. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях. – М.: Наука, 1983. – 431 с.
3. Беляев Д.К. Генетика количественных признаков сельскохозяйственных растений. – М.: Наука, 1978. – 277 с.

4. Голубовский М.Д. Некоторые аспекты взаимодействия генетики и теории эволюции. Методологические и философские проблемы биологии. – Новосибирск: Наука, 1981. – С. 69–92.
5. Голубовский М.Д. Организация генотипа и формы наследственной изменчивости эукариотов // Успехи современной биологии. – Новосибирск: Наука. – 1985. – Т. 100 – С. 323–339.
6. Драгавцев В.А. Алгоритмы эколого-генетической инвентеризации генофонда и методы конструирования сельскохозяйственных растений по урожайности, устойчивости и качеству. – Москва, 2010. – 69 с.
7. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений и проблемы агросферы (теория и практика). В двух томах. – Москва: ООО «Издательство Агрорус», 2004. – 1156 с.
8. Корниенко А.В. Человек, сахароносы, сахарозаменители и натуральные подсластители. – Москва, 2007. – 325 с.
9. Малецкий С.И. Генетика сахарной свеклы. – Новосибирск: Наука, 1984. – 208 с.
10. Новосельцев В.И., Мельников В.М. Конфликтология: учебное пособие. – Воронеж: Российская академия правосудия (Центральный филиал), 2004. – 290 с.
11. Рогов И.А., Антипова Л.В., Шувьева Г.Н. Пищевая биотехнология: в 4 кн. – М.: Колос, 2004. – 440 с.
12. Marilyn Ferguson. Les Enfants du Verseau. – Paris: Calmann-Levy, 1981
13. Le Moigne J. L. La Theorie du Systeme general; Theorie de la modelisation. – Paris: PUF, 1977.
14. Le Moigne J. L. La Theorie du Systeme general. – Monaco, 1983.
15. <http://ekonayka.narod.ru/terra.html>

KORNIENKO A.V.¹, A.K. BUTORINA A.K.¹, A.V. MORGUN A.V.², TRUSH S.G.², MANKO A.A.²

¹ *Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet and Sugar of RAAS*

Russia, 96030, Voronezh Region, Ramon, e-mail: kornienko@mlkbsl.vsi.ru

² *Institute of Agrarian Sciences of Ukraine root crops*

Ukraine, 20300, Cherkasy region., Uman, st. International, 4

PHENOMENA OF VARIABILITY AND INHERITANCE ARE THE BASE OF LIVING ORGANISM SYSTEMS' EVOLUTION

A new theory and terminology to determine of variability, mutations, and combination variability mechanisms is stated.

Key words: variability, inheritance, mutations, recombinations.

КОРШИКОВ И.И.¹, ТКАЧЕВА Ю.А.¹, ЛАПТЕВА Е.В.², МИЛЬЧЕВСКАЯ Я.Г.¹

¹ *Донецкий ботанический сад НАН Украины*

Украина, 83059, Донецк-59, пр. Ильича, 110, e-mail: dbsgenetics@gmail.com

² *Криворожский ботанический сад НАН Украины*

Украина, 50089, г. Кривой Рог ул. Маршака, 50, e-mail: botgard@ukpost.ua

ЯДЕРНО-ЯДРЫШКОВЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ В КРАЕВЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ ХВОЙНЫХ

Анализ функционирования ядрышкового организатора (ЯО) – перспективный показатель с точки зрения характеристики эколого-генетического потенциала различных популяций растений [4]. Активность ЯО выражается по его конечному продукту – величине ядрышка. Чем оно крупнее, тем интенсивнее синтез белка, РНК и рибосом в клетке. Увеличение числа ядрышек связывают с усилением функциональной активности клетки, например, при различного рода стрессовых воздействиях. Эти факторы, как правило, активируют деятельность ЯО в клетках растений. Играя важную роль в синтетических процессах, ядрышко обеспечивает вступление

клетки в митоз [1, 4, 6]. Структура и динамика преобразования ядрышка и его компонентов в настоящее время рассматривается как динамичная генетическая система, которая во многом взаимосвязана с процессами клеточного цикла [13].

Количественные показатели ядрышек и ядерно-ядрышковое соотношение давно используются в популяционном анализе растений, в решении вопросов их эволюции и филогении [3, 4, 5]. Ядерно-ядрышковое соотношение является хорошим показателем активности белоксинтезирующей системы клетки [12]. У семенного потомства популяций растений цитогене-

тические показатели, как правило, опосредованно связаны с почвенно-климатическими условиями их мест произрастания [2].

Материал и методы.

Объектом исследований были представители четырех видов семейства Pinaceae Lindl. из краевых популяций. Семена сосны крымской (*Pinus pallasiana* D. Don) собраны с 40 деревьев, возрастом от 80 до 100 лет в природной популяции Горного Крыма (район пгт Никита). В Кременецком холмогорье (Тернопольская область) с 30 растений 40-летнего возраста собраны семена сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.). В исследовании использовали одну из «островных» изолированных популяций ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) в Украинском Полесье (Ростаньское лесничество, Волынская область). Семена собраны с 38 деревьев возрастом 65 – 75 лет. Семена сосны пицундской (*Pinus brutia* var. *pityusa* (Steven) Silba) получены из Пицунды.

Результаты и обсуждение.

У четырех исследуемых видов хвойных в интерфазных клетках корешков семян ядрышки

Цель работы – сравнительный анализ ядерно-ядрышкового полиморфизма у четырех видов хвойных в их краевых популяциях.

Анализ проводили на временных препаратах меристематических тканей корешков проростков семян. Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в термостате при температуре 23–25°C. Корешки длиной 1,0–1,5 см фиксировали в уксусном этаноле (1:3). Для окрашивания ядрышек применяли 50 % раствор азотнокислого серебра [7]. Давленные препараты готовили по стандартной методике. Просмотр микропрепаратов осуществляли с помощью микроскопа Primo Star (Carl Zeiss) при увеличении 40x10. Для фотографирования препаратов применяли цифровую камеру Canon PowerShot A620. Промеры осуществляли на цифровых снимках с помощью программного обеспечения Axio Vision Rel. 4.7.

хорошо проявлялись при окраске их AgNO₃ (рис.).

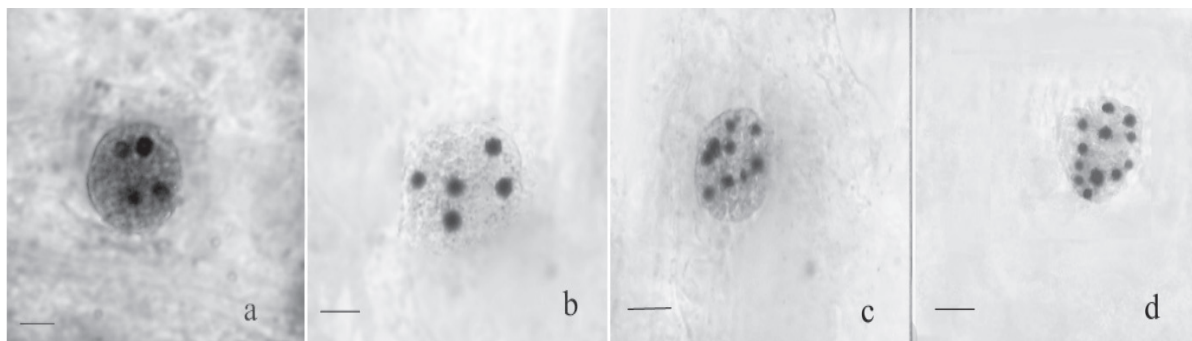


Рис. Ядрышки в интерфазных клетках корневой меристемы семян четырех видов хвойных: а – *Pinus sylvestris* L., б – *Pinus pallasiana* D. Don, в – *Pinus brutia* var. *pityusa* (Steven) Silba, д – *Picea abies* (L.) Karst. Увеличение: 40x10

Четыре вида хвойных отличались по диапазонам варибельности клеток с минимальным и максимальным количеством ядрышек (табл. 1). Наибольший предел варьирования – 1 – 13 ядрышек выявлен в интерфазных ядрах клеток проростков *P. brutia* var. *pityusa*, а наименьший в клетках *P. sylvestris* – 2 – 9.

Исследуемые виды отличались по структуре распределения клеток с разным числом ядрышек. Так, например, у *P. abies* и *P. sylvestris* преобладали клетки с 4 – 7 ядрышками, на которые приходилось соответственно 91% и 91,9% от общего числа исследованных клеток. У средиземноморских видов – *P. pallasiana* и *P. brutia* var. *pityusa* доминировали клетки с 3 – 7 и 5 – 9

ядрышками, на долю которых приходилось 92,1% и 84,2% соответственно. Следует отметить, что у *P. brutia* var. *pityusa* 10,8% клеток имели 10 – 13 ядрышек, в то время как у остальных видов таких клеток было не больше 0,4%. У трех видов – *P. abies*, *P. pallasiana* и *P. sylvestris* среднее количество ядрышек в одном ядре варьировало в близких пределах 5,2 – 5,4, заметно большим оно было у *P. brutia* var. *pityusa* – 7,3.

Различия в функциональной активности ЯО проявляются в кариологической дифференциации и в адаптивных возможностях растений. Гены, контролирующие синтез рРНК выявляются цитологически, как правило, в виде вторичных перетяжек хромосом. Ядрышко представля-

ет собой морфологическое выражение активности ЯО, а само ядрышко и ядрышковые структуры доступны для количественного и качественного анализа [5, 6]. У кукурузы ЯО – это функционально активный локус и за формирование ядрышка отвечают не все рДНК копии, а лишь

три функциональные зоны. Все они взаимосвязаны и могут взаимозаменяться. С параметрами клеточного цикла строго соотносится функционирование ЯО и формирование ядрышка. Максимальная транскрипционная активность ЯО приходится на премейотическую интерфазу [8].

Таблица 1. Частота встречаемости интерфазных ядер с различным числом ядрышек в клетках корневой меристемы семян четырех видов хвойных

Выборка	Частота встречаемости ядер с разным количеством ядрышек, % количество ядрышек в 1 ядре													Среднее количество ядрышек в ядре
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
<i>Picea abies</i> (L.) Karst.	0	0,1	4,8	18,4	35,9	23,3	13,4	3,4	0,3	0,4	0	0	0	5,4±0,04
<i>Pinus pallasiana</i> D. Don	0,3	2,3	10,7	18,9	23,6	28,1	10,8	3,3	1,6	0,3	0,1	0	0	5,2±0,05
<i>Pinus sylvestris</i> L.	0	0,5	4,7	17,6	28,8	29,5	16	2,7	0,2	0	0	0	0	5,4±0,04
<i>Pinus brutia</i> var. <i>pityusa</i> (Steven) Silba	0,1	0,3	0,8	3,8	11,5	16,4	25,1	18	13,2	5,7	4,1	0,8	0,2	7,3±0,04

В интерфазных клетках древесных растений обычно присутствуют 1 – 2 ядрышка, однако у хвойных ядрышек значительно больше. Например, в клетках *P. sylvestris* количество ядрышек варьирует от 1 до 12, хотя в экологически благоприятных условиях их число ограничивается 3 – 6 [10]. В сравнительных исследованиях показано, что *P. sylvestris* и филогенетически близкая к ней сосна меловая (*P. sylvestris* L. var. *cretacea* Kalenicz. ex Kom.) отличались по количественному полиморфизму ядрышек в клетках корешков их семян. У *P. sylvestris* 83,7% клеток имели 3 – 6 ядрышек, а у *P. sylvestris* var. *cretacea* доля таких клеток в четырех популяциях варьировала от 47,5% до 76,1%. Во всех популяциях этого таксона доля клеток с 7 – 8 ядрышками была в 3,7 – 12 раз больше, чем в популяции *P. sylvestris*. Эти отличия объясняются разным уровнем метаболической активности у этих видов сосны и как проявление своеобразного механизма адаптации *P. sylvestris* var. *cretacea* к специфическим эдафическим условиям произрастания [3]. В неблагоприятных условиях, например, на болотах у *P. sylvestris* отмечено повышенное количество ядрышкообразующих хромосом [9]. Увеличение количества ядрышек на ядро возможно при полиплоидии, а также анеуплоидии, однако удвоение набора хромосом не ведет к автоматическому удвоению суммарного

объема ядрышек [1, 6].

Изучаемые нами *P. abies* и *P. pallasiana* имели наиболее крупные ядра в интерфазных клетках, в среднем соответственно – 199,5 мкм² и 192,6 мкм² (табл. 2). Наименьшие ядра – в среднем 170,9 мкм² выявлены в клетках *P. sylvestris*, однако у этого вида как и у *P. brutia* var. *pityusa* обнаружены самые крупные ядрышки. Средняя площадь ядрышек у этих двух видов была в 1,7 и 2,1 раза больше, чем у *P. abies* и *P. pallasiana*. Так как у *P. abies* наиболее крупные ядра и наименее мелкие ядрышки, то соответственно наибольшим оказалось ядерно-ядрышковое соотношение – 12,7. Наименьшим это соотношение было у *P. sylvestris* – 4,0 и у *P. brutia* var. *pityusa* – 4,5.

Ядерно-ядрышковое соотношение, как показано в популяционных исследованиях его изменения в клетках меристемы корня и эпидермиса трех видов рода *Actaea* L. имеет определенное значение для каждого вида. При этом выявлено, что активность ЯО в эпидермисе зависит от его возраста и особенностей эколого-климатических условий. В стареющих тканях листьев растений отмечено снижение ядрышкового материала [5]. Уменьшение ядерно-ядрышкового соотношения обычно следствие возрастающего объема ядрышка в ядре, что напрямую связывают с усилением биосинтетиче-

ских процессов в клетке [4, 12]. У высокопродуктивных гибридов свеклы (*Beta vulgaris* L.)

прослеживается тенденция к увеличению размеров ядрышек [11].

Таблица 2. Средняя площадь ядра и ядрышек, а также ядерно-ядрышковое соотношение в интерфазных клетках корешков проростков семян четырех видов хвойных

Выборка	Средняя площадь 1 ядра, мкм ²	Средняя площадь ядрышек в 1 ядре, мкм ²	Ядерно-ядрышковое соотношение
	M±m		
<i>Picea abies</i> (L.) Karst.	199,5±13,6	22,1±5,3	12,7±0,7
<i>Pinus pallasiana</i> D. Don	192,6±10,2	28,6±1,4	7,2±0,4
<i>Pinus sylvestris</i> L.	170,9±3,9	46,5±2,1	4,0±0,2
<i>Pinus brutia</i> var. <i>pityusa</i> (Steven) Silba	184,3±7,7	47,2±2,3	4,5±0,2

Заключение

Таким образом, исследуемые виды хвойных отличались по активности ЯО в клетках корневой меристемы семян краевых популяций. Установленные отличия можно рассматривать

как норму реакции ядрышковой активности в их потомстве на природно-климатические условия краевой части их ареалов и цитогенетический показатель – их межвидовой дифференциации.

Литература

1. Бондарь Л.М., Частоколенко Л.В., Баранова В.А. Популяционный анализ активности ядрышкового организатора у растений *Vicia cracca* L. // Генетика. – 1987. – Т. 23, № 2. – С. 317–324.
2. Буторина А.К., Черкашина О.Н., Чернодубов А.И. и др. Изменчивость цитологических показателей семян сосны обыкновенной уникального Хреновского бора // – Генетика. – 2005. – Т. 41, № 6. – С. 778–783.
3. Буторина А.К., Мозгалина И.Г. Особенности цитогенетических показателей сосны меловой и сосны обыкновенной // Экология. – 2004. – № 3. – С. 185–189.
4. Дуброва Н.А. Изучение дифференциальной активности ядрышковых организаторов хромосом у дикорастущих растений сем. *Ranunculaceae* // Цитология и генетика. – 1986. – № 4. – С. 302–303.
5. Дуброва Н.А., Малахова Л.А. Изучение полиморфизма ядрышкообразующих хромосом у видов рода *Actaea* L. (*Ranunculaceae* Juss.) // Цитология и генетика. – 1980. – № 5. – С. 3–8.
6. Кикнадзе И.И. Функциональная организация хромосом – Л.: Наука. Ленингр. отд, 1972. – 211 с.
7. Муратова Е.Н. Методики окрашивания ядрышек для кариологического анализа хвойных // Ботан. журн. – 1995. – Т. 80, № 2. – С. 82–86.
8. Похмельных Г.А., Шумный В.К. Функциональная и мутационная изменчивость гетерохроматического района ядрышкового организатора у кукурузы (изменчивость гетерохроматинового района ЯО) // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 631–641.
9. Седельникова Т.С., Муратова Е.Н., Ефремов С.П. Кариологические особенности видов хвойных на болотах и суходолах Западной Сибири // Сиб. ботан. журн. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 73–80.
10. Черкашина О.Н. Цитогенетический мониторинг насаждений сосны обыкновенной в условиях Хреновского и Усманского боров : автореф. на соискание уч. степени канд. биол. наук: специальность 03.00.16 «Экология». – Воронеж, 2007. – 22 с.
11. Чугункова Т.В. Цитогенетические особенности свеклы при инбридинге и гетерозисе // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 2. – С. 153–159.
12. Шахбазов В.Г., Шестопалова Н.Г. Некоторые особенности ядрышка и ядра в клетках гибридного лука // Докл. АН СССР. – 1971. – Т. 196, № 5. – С. 1207–1208.
13. Raska I., Shaw P.J., Cmarco D. New insight into nucleolar architecture and activity // Int. Rev. Cytol. – 2006. – Vol. 255. – P. 177–235.

KORSHIKOV I.I.¹, ТКАЧОВА YU.A.¹, LAPTEVA H.V.², MILCHEVSKA YA.H.¹

¹Donetsk Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 110 Pr. Illich, 83059 Donetsk, e-mail: dbsgenetics@gmail.com

²Krivoi Rig Botanical Garden, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 50 St. Marshaka, 50089 Krivoy Rig, e-mail: botgard@ukpost.ua

THE NUCLEUS-NUCLEOLUS POLYMORPHISM IN SEEDS OF MARGINAL POPULATIONS OF FOUR CONIFER SPECIES

Aims. Comparative analysis of nucleus-nucleolus polymorphism in marginal populations of four conifer spe-

cies. **Methods.** Nucleoli staining with AgNO_3 in interphase cells of seedlings. **Results.** The narrowest range of variability of the nuclei number in an interphase cell (2 – 9) is characteristic of the species with a wide range – *Pinus sylvestris* L., and the widest range of this variability is characteristic of *P. brutia* var. *pityusa* (1 – 13), as well as the highest number of nucleoli in a nucleus (7,3). These species had also the lowest nucleus-nucleolus ratio (4 – 4,5), which is notably lower than its values in *P. pallasiana* in Crimea (7,2), and *Picea abies* in Ukrainian Polesye (12,7). **Conclusions.** The studied conifer species differed significantly by the activity of nuclear organizer.

Key words: nucleolus, four conifer species, seedlings.

МИХАЛЬСЬКА Л.М., РЯЗАНОВА М.Є, ШВАРТАУ В.В.

Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: Mykhalskaya_L@ukr.net

ВПЛИВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ ГЕРБІЦИДУ АКСІАЛ У ПОСІВАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Серед хлібних злаків за своєю значимістю пшениця посідає перше місце, оскільки її харчова цінність та висока екологічна пластичність, що робить її придатною для вирощування у найрізноманітніших кліматичних умовах, є неперевершеними. Ця культура вирощується практично в усіх країнах, які мають достатньо розвинуте сільськогосподарське виробництво, і являє основу харчового раціону переважної частини людства. В Україні озима пшениця займає перше місце за посівними площами та є головною продовольчою культурою [1]. Важливою складовою високих рівнів урожаїв є застосування мікроелементів у позакореновому підживленні. При цьому, системи позакоренового підживлення інтегруються в системи захисту рослин від бур'янів, шкідників та хвороб. Застосування композицій елементів живлення з гербіцидами може як посилювати ефективність засвоєння поживних елементів та дію засобів захисту, так і, у багатьох випадках, різко знижувати ефективність препаратів, часом до прямих проявів фітотокси-

чності на культурних рослинах [6-8].

Серед найбільш відомих обмежень необхідно зазначити зниження фітотоксичності похідних 2,4-Д, бензойної кислоти, гліфосату та інших препаратів з фосфометилгліцином при застосуванні з двовалентними катіонами [3, 4].

Мідь, марганець та цинк є редокс-активними перехідними металами, необхідними для росту і розвитку рослин. Мідь відіграє важливу роль у метаболізмі клітинної стінки, окислювальному фосфорилуванні, мобілізації заліза та біогенезі молібдену [8]. Марганець бере участь у переносі електронів у фото системі II, а цинк впливає на проникність мембран і стабілізує клітинні компоненти та системи [2]. Тому є важливим визначення можливості застосування цих мікроелементів з пестицидами.

Таким чином, метою нашої роботи було дослідити вплив мікродобрив, що містять мідь, цинк та марганець на активність гербіциду Аксиал, а також їх сумісний вплив на урожайність високоінтенсивних сортів озимої пшениці.

Матеріали та методи

Польові та виробничі дослідження проводили на посівах озимої пшениці у ТОВ «Агросервіс» м. Жашків Черкаської області (ділянки площею 1 га) та Дослідного сільськогосподарського виробництва Інституту фізіології рослин і генетики НАН України (ДСВ ІФРГ НАНУ), смт. Глеваха Васильківського р-ну Київської обл. Залікова площа ділянок 10 м², повторність – 6-10 кратна. Контролем слугували варіанти без обробки та фон N90P60K60S10.

Досліди у ДСВ ІФРГ НАНУ проводили на темно-сірому опідзоленому ґрунті, піщано-легкосуглинковому за механічним складом, у

ТОВ «Агросервіс» – на типових чорноземах.

Вегетаційний сезон 2012 року відрізнявся тривалими високими температурами. Влітку температура піднімалася до 42 °С. У зоні досліджень за вегетаційний період сума активних температур (більше +10 °С) становила близько 2600-2900 °С. Опадів протягом року випадало від 530 до 650 мм., а за літній період у середньому 180-220 мм.

Дослідження проводили на виробничих посівах озимої пшениці сорту Смуглянка. Насіння протруювали Селест Топ 312,5 FS т.к.с. з монокалійфосфатом. Рослини обробляли фунгіци-

дами Альто Супер 330 ЕС, к.е. і Амістар Екстра 280 SC, к.с., інсектицидом Енжіо 247 SC, к.с., зокрема у фазу кушіння, цвітіння та по прапорцевому листку. Ділянки оброблялися гербіцидом Аксіал 045 ЕС, к.е. (1,0 л/га) у кінці фази кушіння. Обприскування проводили у вечірні години за температури повітря 20-24 °С та за відсутності вітру. Забур'яненість посівів злаковими видами бур'янів визначали через 3 тижні після обро-

бки.

У якості мідних добрив використовували «Косайд 2000» (ф. «Дюпон») (0,1 кг/га), мідь сірчаноокислу пентагідрат (0,2 кг/га) та мідь оцтовоокислу моногідрат (0,2 кг/га).

Цинк та марганець вносилися у складі добрив Брексил Zn (0,2 кг/га), сульфат цинку гептагідрат (0,2 кг/га), Брексил Mn (0,2 кг/га) та сульфат марганцю моногідрат (0,2 кг/га)

Результати і обговорення

Для дослідження ефекту взаємодії важливих для рослин озимої пшениці мікроелементів з грамініцидами в умовах виробничих дослідів

визначили зміни фітотоксичності піноксадену з різними добривами, що містять мікроелементи (табл. 1 та 2).

Таблиця 1. Вплив ряду добрив, що містять мідь, на фітотоксичність Аксіалу ТОВ «Агросервіс», 2012 рік

Варіант	Доза, л/га, кг/га	<i>Apera spica-venti</i> L.	
		Кількість рослин/маса сухої речовини, г/м ²	Кількість рослин/маса сухої речовини, % до контролю
Контроль	-	14/1073	100/100
Аксіал	1,0	1/7	7/0,7
Аксіал + Косайд 2000	1,0 + 0,1	5/23	36/2
Аксіал + сульфат міді пентагідрат	1,0 + 0,2	9/74	64/7
Аксіал + мідь оцтовоокисла моногідрат	1,0 + 0,2	5/29	36/3
НІР _{0,95}		5/14	-

Таблиця 2. Вплив ряду добрив, що містять цинк та марганець, на фітотоксичність Аксіалу ТОВ «Агросервіс», 2012 рік

Варіант	Доза, л/га, кг/га	<i>Apera spica-venti</i> L.	
		Кількість рослин/маса сухої речовини, г/м ²	Зниження кількості рослин/маси сухої речовини, % до контролю
Контроль	-	14/1073	100/100
Аксіал	1,0	1/7	7/0,7
Аксіал + Брексил Zn	1,0 + 0,2	3/12	21/1
Аксіал + сульфат цинку гептагідрат	1,0 + 0,2	5/15	36/1
Аксіал + Брексил Mn	1,0 + 0,2	2/9	14/0,8
Аксіал + сульфат марганцю моногідрат	1,0 + 0,2	2/9	14/0,8
НІР _{0,95}		5/14	-

В умовах виробничих дослідів показано суттєве зниження активності грамініциду Аксіал до злакових видів бур'янів (на прикладі доміну-

ючого на посівах виду бур'яну Метлюгу звичайного) за умови додавання до робочих розчинів препаратів міді.

Додавання добрив, що містять мідь, до розчинів грамініциду для обприскування суттєво знижувало його фітотоксичність. Слід відзначити значне зростання кількості злакових бур'янів у посіві озимої пшениці. Отже, застосування добрив, які містять мідь, недоцільно з піноксаде-ном, та, ймовірно, з іншими інгібіторам АКК.

Всі досліджені добрива з вмістом цинку та марганцю утворювали стійкі робочі розчини, на відміну від сульфату міді, додавання якого до робочого розчину спричиняло утворення осаду вже через 30-60 хв після приготування. У варіантах з Zn та Mn спостерігалось дещо менше зниження дії гербіциду Аксіал, порівняно із додаванням міді до розчину грамініциду для обприскування.

Очевидно, що для розгляду питань взаємодії піноксадену та похідних арилоксифеноксипропіонової кислоти (фуроре, фюзілад, піноксаден тощо) з міддю, цинком та марганцем вірогідним поясненням інгібуючої дії мікроелементів на фітотоксичність гербіциду може бути взаємодія не тільки з діючою речовиною, яка поряд з основною молекулою токсиканта містить фрагмент алкілу, з'єднаний через ефірний зв'язок, а й з кислотою грамініциду, яка утворюється в рослинах під дією гідролаз [5, 6].

У результаті проведених досліджень показано зниження ефективності Аксіалу при спільному застосуванні з добривами, що містять Cu, Zn та Mn.

Вплив гербіциду Аксіал за сумісного застосування з макро- та мікроелементами на врожайність і якість зерна озимої пшениці. Відомо, що за рахунок спільного застосування гербіцидів із добривами скорочується кількість обробок посівів, підвищується стійкість рослин озимої пшениці до хімічного стресу, викликаного пестицидами, та підвищується рівень забезпеченості елементами мінерального живлення. Елементи живлення використовуються при цьому з вищими коефіцієнтами засвоєння, що сприяє кращій виповненості зерна, підвищенню маси 1 000 зерен – одного з важливих показників структури врожаю. При цьому не тільки активізується розвиток рослин і дозрівання насіння, а й підвищується їх стійкість до негативного впливу факторів навколишнього середовища та патогенів.

В умовах польових дослідів досліджували вплив гербіциду Аксіал за сумісного застосування з добривами, що містять мікроелементи, на врожайність і якість зерна високоінтенсивних сортів озимої пшениці. Дослідження проводили на виробничих посівах озимої пшениці сорту Смуглянка у ДСВ ІФРГ НАН України (табл. 3).

Таблиця 3. Вплив гербіциду Аксіал при сумісному застосуванні з макро- і мікроелементами на продуктивність озимої пшениці сорту Смуглянка, ДСВ ІФРГ НАН України, 2012 рік

Варіанти, дози	Маса бур'янів, ц/га сухої речовини	Урожайність, ц/га (вміст білка, %/ клейковини, %)
N ₉₀ P ₆₀ K ₆₀ S ₁₀ (контроль)	24,2 ^a	56,0 (13,5/31,0)
N ₉₀ P ₆₀ K ₆₀ S ₁₀ + Аксіал, 1,0 л/га	11,9 ^b	62,2 (13,2/32,0)
N ₉₀ P ₆₀ K ₆₀ S ₁₀ + Аксіал, 1,0 л/га + Брексил Zn, 0,2 кг/га	10,3 ^b	63,9 (13,6/32,0)
N ₉₀ P ₆₀ K ₆₀ S ₁₀ + Аксіал, 1,0 л/га + Брексил Mn, 0,2 кг/га	10,0 ^b	63,4 (13,6/32,0)
N ₉₀ P ₆₀ K ₆₀ S ₁₀ + Аксіал, 1,0 л/га + мідь сірчанооксида, 0,2 кг/га	12,3 ^b	60,4 (13,6/32,0)
N ₉₀ P ₆₀ K ₆₀ S ₁₀ + Аксіал, 1,0 л/га + Косайд 2000, 0,1 кг/га	9,9 ^b	68,2 (13,8/33,0)
НІР _{0,95}	2,7	2,7 (1,0/1,5)

Встановлено, що застосування сульфату міді сумісно з грамініцидом Аксіал викликає статистично достовірне зниження фітотоксичності гербіциду до бур'янів. При цьому врожайність культури суттєво не змінюється. Для варіантів із внесенням добрив з марганцем та цинком спостерігається тенденція до підвищення врожайності, а за внесення міді сірчаноокислої –

зниження врожайності. Внесення мікроелементів та гербіцидів статистично достовірно не впливало на якість зерна озимої пшениці сорту Смуглянка. Вміст білка та клейковини не залежав від обробки мікродобривами та гербіцидами. Суттєво підвищувався рівень врожаю за внесення міді у формі Косайду одночасно з гербіцидом.

Висновки

Показано, що сумісне застосування мікродобрив із гербіцидом Аксіал призводить до зниження його фітотоксичності.

Підвищення врожайності озимої пшениці в умовах польових та виробничих дослідів може відбуватися внаслідок збільшення забезпеченості рослин доступними формами мікроелементів,

що підтримують нормальне функціонування редокс-систем.

Таким чином, визначення оптимальних рівнів мікроелементів та їх взаємодії з гербіцидами є важливим для розробки технологій боротьби із бур'янами у посівах озимої пшениці.

Література

1. Моргун В. В., Швартау В. В., Киризий Д. А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т.42, № 5. – С. 371-392.
2. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях / пер. с англ. Д. В. Гринчука, Е. П. Янина. – М.: Мир, 1989. – 439 с.
3. Чесалин Г. А. Эффективность применения минеральных удобрений в сочетании с гербицидами // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1973. – № 11. – С. 11.
4. Чесалин Г. А., Тимофеева А. А. Использование питательных веществ удобрений культурными и сорными растениями // Химия в сельском хозяйстве. – 1974. – № 3. – С. 58-59.
5. Швартау В. В. Фізіологічні особливості синергетичної взаємодії похідних арилоксифеноксипропіонової кислоти // Фізіологічно активні речовини. – 1999. – № 1 (27). – С. 96-98.
6. Швартау В. В. Регуляція активності гербіцидів за допомогою хімічних сполук. – К.: Логос, 2004. – 222 с.
7. Швартау В. В. Гербіциди. Основи регуляції фітотоксичності та фізико-хімічні і біологічні властивості. – К.: Логос, 2009. – Т. 2. – 1046с.
8. Швартау В. В., Гуральчук Ж. З. Мінеральні добрива в Україні. – К.: Логос, 2007. – 333 с.
9. Yruela I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions // Functional and Plant Biology. – 2009. – Vol. 36, № 5. – P. 409-430.

MYKHALSKA L.M., RYAZANOVA M.E, SCHWARTAU V. V.

Institute of plant physiology and genetics National Academy of Science of Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkivska Str., 31/17, e-mail: Mykhalskaya_L@ukr.net

MICROELEMENTS INFLUENCE ON HERBICIDE AXIAL ACTIVITY IN WINTER WHEAT

Aims. The traditional approach in agricultural industry is microfertilizers application together with pesticides. However, interaction between nutrients and herbicides results in reduce of weeds control. For this purpose influence of Cu, Zn and Mn fertilizers on herbicide Axial phytotoxicity and yield of winter wheat were investigated. **Methods.** Herbicide activity was determined by the number and dry weight of weeds plants. Yield response was determined by the of grain weight per hectare. **Results.** It was found that combined application of microfertilizers with herbicide Axial reduces his phytotoxicity and increases winter wheat yield response. **Conclusions.** These effects can be related with Cu, Zn and Mn homeostasis and herbicide interaction with microelements in plants.

Key words: microfertilizers, Axial, phytotoxicity, yield response, winter wheat.

МИХЕЕВ А.Н.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
03143, Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: mikhalex7@yahoo.com*

ЭМЕРДЖЕНТНОСТЬ МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ

Тенденция распространения и доминирования системного подхода в биологической науке естественным образом охватила и подходы к изучению явлений биологической эволюции. Синонимом понятия «системность» являются

понятия «эмерджентность», «неаддитивность», целостность и другие понятия, отражающие появление новых качеств у систем при отсутствии таковых у образующих их элементов. Эмерджентность (от англ. emergence – возникающий,

неожиданно появляющийся) в теории систем – наличие у системы свойств, не присущих её подсистемам (элементам), а также сумме элементов, не связанных особыми системообразующими связями; несводимость свойств системы к сумме свойств её компонентов. Так, свойства биологической популяции не представляют собой простой суммы свойства отдельных особей; понятия рождаемость, смертность неприменимы к отдельной особи, но применимы к популяции в целом.

В эволюционистике эмерджентность выражается в виде возникновения новых функциональных единиц системы, которые не сводятся к простым перестановкам функций уже имевшихся элементов.

Разработанные в общей теории систем закономерности и принципы, указывающие на неаддитивность внутрисистемных процессов применимы и для решения проблем эволюции:

- «принцип взаимно-дополнительных соотношений» (сформулировал А. А. Богданов): «системное расхождение заключает в себе тенденцию развития, направленную к дополнительным связям». Необходимой «основой всякой устойчивой системной дифференциации является развитие взаимно-дополнительных связей между её элементами» [1];

- «закон необходимого разнообразия» (по У. Р. Эшби). Очевидно, что рост разнообразия элементов систем как целых может приводить к повышению устойчивости (за счёт формирования обилия межэлементных связей и обусловливаемых ими компенсаторных эффектов);

- «закон расхождения» (по Г. Спенсеру), также известный как принцип цепной реакции: активность двух тождественных систем имеет тенденцию к прогрессирующему накоплению различий. При этом «расхождение исходных форм идёт «лавинообразно».

С методологической точки зрения научное исследование должно проходить три этапа: 1. Феноменологический (в случае исследования биологической эволюции – описание самого явления эволюции, определение скорости эволюции и факторов ее обуславливающих) 2. Изучение механизмов (форм, источников, характеристик изменчивости, естественный отбор и механизмы генетического закрепления (ассимиляции) адаптивных фенотипических признаков). 3. Определение смысла, значения изучаемого явления (направленности, прогрессивности и т.д. для биологической эволюции). В своей статье мы, прежде всего, хотели бы обратить внимание на источники изменчивости и рассмотреть роль по-

пуляционных эффектов (внутрипопуляционных взаимодействий) в определении их характеристик. В связи с этим, считаем необходимым ввести в более широкий научный обиход системогенетические идеи, высказанные А.А. Малиновским (1973).

Фактически, еще Дарвин предложил популяционный подход, рассматривая определенную и неопределенную изменчивость (популяционные характеристики) как основополагающий фактор эволюционного развития. Возможны несколько вариантов изменчивости, которая подвергается последующему отбору: 1. Предсуществующие на момент начала селекционного процесса признаки, которыми обладают либо все особи популяции, либо особи субпопуляций. 2. Генетические мутанты, возникшие в ответ на давление стрессора 3. Эпигенетические (фенотипические) мутанты (эпигены – наследственные единицы, имеющие не менее двух режимов работы подчиненных им генов [4].

Идея системности требует системного описания субъектов эволюционного процесса, т.е. описания и последующего учета внутренних (межэлементных, субсистемных) связей регуляции, поиске критических элементов с точки зрения оценки мест «приложения» эволюционных факторов [9], определение степени независимости, автономности субэлементов, селфинговости [7]. Все сказанное относится, прежде всего, к эволюционным событиям на уровне популяции, т.е. микроэволюции.

В настоящее время популяция чаще всего представляется как бесструктурная, стохастическая, панмиктическая, ограниченная только физическими барьерами и не имеющая собственной структуры система. Но еще в семидесятые годы XX-го столетия [19] указывалось, что существуют особые, экологические закономерности эволюции, в частности, популяционные. Так, популяции могут активно ограничивать приток особей извне, стремясь сохранить или воспроизвести специфический паттерн популяционной структуры, делая, тем самым популяцию более устойчивой к широкому спектру внешних возмущений и возмущений внутренних, обусловленных демографическими сдвигами в самой популяции. Таким же образом популяции могут обеспечивать стабильность генных частот в субпопуляциях – локальных пространственных группировках, направленно перераспределяя между ними особей – носителей разных генотипов [20].

В.С. Фридман (2000) пишет о большей продуктивности рассмотрения механизмов эво-

люции «сверху вниз», т.е. с уровня популяций, обладающих системными качествами, что, в конечном счете, способствует достижению «общей, а не локальной, адаптации». В подтверждение сказанного можно еще указать на значимость эффектов группы (например, у растений) [15].

В силу интегрированности популяции все производимые естественным отбором изменения передаются по внутрисистемным и межсистемным (случай коэволюции разновидовых популяций) связям, производя, таким образом, мультиплицирующий (усиливающий) эффект. В последнем случае, еще раз можно убедиться в важности идеи биологического усилителя – в данном случае применительно к механизму эволюции [12].

Системная интегрированность популяции не ниже чем, у организма, просто она основана на других механизмах – прежде всего, на гетерофобии (повышенной толерантности к «своим», враждебностью к «чужим» элементам (особям популяции, например) или их отторжением. Общенаучный термин гетерофобия было предложено Г.А. Заварзиным (2002) использовать для описания эволюции популяций. Само по себе явление обусловлено эффективным функционированием контуров положительных обратных связей в «хорошо (корректно) выделенной» популяционной системе, устанавливающих соответствующую «полупроницаемость» на своей границе с внешней средой. В конце концов, гетерогенность на основе гетерофобии дает материал для последующих системогенных процессов [8].

В своих статьях мы не раз подымали вопрос о «разрешающей способности естественного отбора» [10, 11]. Соглашаясь с тем, что «единицей эволюции» является не особь, а популяция [14], следует признать, что в результате «давления» среды наблюдается однонаправленность фенотипических и мутационных изменений у особей такой популяции. Из этого, в первую очередь, следует, что особи популяции совершают активные действия («напрягаются» в одном и том же направлении), что, в свою очередь повышает мутабельность генных локусов, обеспечивающих соответствующую и «поголовную» биологическую (поведенческую, физиолого-биохимическую и молекулярно-биологическую) активность. Например, у видов с привязанностью к партнеру (что, несомненно, оказывает на партнеров стрессорирующее влияние) существуют множественные повторы в регуляторной области гена вазопрессинового рецепто-

ра *avpr1a*, функционирующего в мозге. Вазопрессин – гормон, связанный со стрессоустойчивостью и родительским поведением, а также с обучением и памятью. У видов без привязанности к партнеру повторы в регуляторной области этого гена гораздо короче. В ДНК человека и бонобо много повторов этого гена, а у шимпанзе, где постоянных пар практически нет или они образуются на короткое время, этих повторов мало [16]. А, во-вторых, следует также предположить наличие системных качеств кооперативного перехода в популяции, т.е. своеобразного «сложения» преимуществ отдельных особей, которые могут быть реализованы только в популяции, например, то же самое, упомянутое, выше, партнерство. Селективные воздействия на популяцию не сводятся к воздействию на организмы, которые считаются «глиной» в руках отбора. Необходимо учитывать и то обстоятельство, что популяции имеют свою историю, обладают существенной автономизацией от среды, активностью и селективностью в отношении её воздействий.

В популяции (на уровне популяции) появляются новые качества, дающие заметные преимущества в отношении выживания отдельных особей. Эти качества у отдельных (изолированных от взаимодействия с себе подобными) особей оставались «незамеченными», скрытыми, а системообразующие (неаддитивные) свойства могут проявиться лишь у взаимодействующих особей. Видообразование (микроэволюция), таким, образом, происходит на основе системогенетических процессов [1, 8]. Несимметричное сложение малозаметных для отбора качеств (возникших в результате направленного мутагенеза) отдельных особей дает новое качество в виде повышенной жизнеспособности популяции, а, точнее, субпопуляции. На популяционном уровне появляется также возможность (как, впрочем, и любых других, надсистемных образований) рекомбинации признаков особей в процессе их скрещивания.

Примером внутрипопуляционной гетерогенности (изменчивости) является тот факт, что элиминирующие факторы (факторы отбора), как и сами условия среды, различаются в центре и на периферии любой плотной популяции многоклеточных организмов или колонии клеток [6]. Специфический характер пресса естественного отбора в разные моменты развития популяции или разных ее участках создает функциональную дивергенцию соответствующих фенотипических окон (комбинация наследуемых признаков, одновременно проявляемых в фенотипе и

контролируемых естественным отбором) [13] генома и специфические вариации фенотипа клеток, зависящие от взаимодействия с другим фенотипами. Примером эффекта группы у многоклеточных является ситуация, возникающая у клопов-водомеров, у которых существуют крылатые и бескрылые дискретные адаптивные нормы (Хлебович, 2006). В зависимости от размера водоема формируются либо крылатые формы, сигналом для образования которых служит стресс от интенсивных столкновений в водоеме малого размера, либо бескрылые формы, доминирующие в больших водоемах. Групповые генно-регуляторные эффекты выявлены также у бактерий, у которых многие белковые синтезы регулируются их собственными метаболитами, выделяемыми в культуральную среду [6].

Была высказана очень важная мысль [6] о том, что «...изменение фенотипа клеток в процессе дифференцировок, по-видимому, начинают в принципе отличаться от фенотипических адаптаций только с того момента, когда становятся относительно необратимыми в результате большого числа последовательных делений, сопряженных со специализацией». По нашему мнению такое становится возможным благодаря дифференциальной структуре популяции, которая, в свою очередь, обусловлена градацией условий существования ее субпопуляций, например, разницей в условиях питания периферических и центральных частей колонии бактерий, что с неизбежностью приводит центральную часть к спорообразованию, а периферическую – к пролиферации. Поскольку популяция многоклеточных очень гетерогенна (больше, чем одноклеточных), то соответственно в ней одновременно «раскрыты» больше фенотипических (точнее говоря, «эпигенетических») окон и, следовательно, имеется больше «поводов» для мутационных событий (направленных и ненаправленных). В этом состоит эволюционное преимущество популяции перед особью, которая не может «представлять» все разнообразие фенотипических окон одновременно, не подвергаясь одновременному действию всего разнообразия стрессоров, каждый из которых способен выявить скрытые мутации, имеющие адаптивное значение.

Генетическую фиксацию признака, проявившегося как модификационный (эпигенетический), можно объяснить выпадением (своеобразной дезактивацией) альтернативной программы, т.е. генетической основы альтернативного фенотипического окна [18]. Однако альтернативная программа должна была сначала возникнуть. Вероятно, для эволюционных «нахо-

док» характерна определенная избыточность, которая в дальнейшем служит резервом эволюционных преобразований.

Г.Ф. Гаузе считал (1984), что «...адаптивная модификация, будучи продуктом естественного отбора, уже в силу своей адаптивности, указывает на то, что случайно возникшая похожая на нее мутация будет подхвачена отбором и будет эволюционно закреплена». Правда, не ясно, как такая мутация будет «закрепляться», но ясно одно – случайная мутация (даже полезная) не может сравниться по своему популяционному эффекту (по масштабу представительства в популяции) с модификационной (эпигенетической) адаптивной (т.е. направленной) изменчивостью. На начальных этапах генетический мутант маскируется многочисленными (массовыми) эпимутантами, создающими для первых своеобразный эпигенетический «туннель», по которому мутант со своими потомками движется, постепенно подводя генетическую базу (дрейф генов) под первичную масштабно представленную модификационную (эпигенетическую) изменчивость – происходит генетическая ассимиляция.

В популяции под действием стрессора вначале появляется целый «веер» разнообразных форм [2]. Далее из множества первичных форм выделяется существенно меньшее число «стволовых линий», а другие вымирают. Из этого факта следует два важных вывода, характеризующих системогенные (неаддитивные) свойства популяции: во-первых, ясно, что на определенном этапе популяция может представлять собой совокупность достаточно гетерогенных по фенотипическим признакам субпопуляций, между которыми возможна как конкуренция, так и сотрудничество; во-вторых, получается, что естественный отбор на первых этапах может «не работать», поскольку «всевозможные» формы длительно существуют, «умудряясь» после себя оставлять даже ископаемые остатки.

Таким образом, эффект группы в популяции проявляется в ее своеобразной поляризации по определенным признакам, которые могут закрепиться генетически (за счет «мутационного груза»). Подобные «последствия», вероятно, имеет и географическая изоляция популяций или субпопуляций. Функциональная дивергенция популяции обуславливает, в свою очередь, и разную чувствительность к мутагенным и эпигенным факторам, формируя в этом отношении критические субпопуляции, которые, вероятно, и будут самыми «перспективными», с точки зрения адаптивной эволюции. Кроме этого, крити-

ческим субпопуляциям могут помогать выжить некритические популяции, в чем, также, проявляется эффект группы.

Среди нерассмотренных, но важных для понимания роли интегративных (системных, эмерджентных) процессов в эволюции следовало бы упомянуть такие явления, как подражание у общественных животных, которое существенно ускоряет внутривидовые изменения, эффект свидетеля, который может ускорить направленный мутагенез у колоний одноклеточных

организмов и другие эффекты, для описания которых недостаточен объем статьи. Кроме этого, известная проблема «генотип-фенотип», т.е. проблема фенотипического выражения генетической программы, не сводится только к рассмотрению этого взаимодействия на уровне организма. Так же остро она стоит и для надорганизменных уровней, прежде всего, популяционного, как основного «поля деятельности» естественного отбора.

Литература

1. Богданов А.А. Тектология (всеобщая организационная наука). – М.: Экономика, 1989. – 304 с.
2. Волков П.И. Ложь креационизма // <http://www.sivatherium.h12.ru/lozhcrea.htm>
3. Гаузе Г.Ф. Экология и некоторые проблемы происхождения видов // Экология и эволюционная теория. – Л.: 1984. – С. 5–105.
4. Голубовский М.Д., Чураев Р.Н. Динамическая наследственность и эпигены // Природа. 1997. № 4. С. 16–25.
5. Заварзин Г.А. Роль комбинаторных событий в развитии биоразнообразия // Природа. – 2002. – № 1. – С. 12–19.
6. Лабас Ю.А., Хлебович В.В. «Фенотипическое окно» генома и прогрессивная эволюция // Соленосные адаптации водных организмов. – Л.: Изд-во Зоол. ин-та., 1976. – С. 4–25.
7. Лежачий Э. Элементы общей теории адаптации. – Вильнюс: Мокслас, 1986. – 276 с.
8. Малиновский А.А. Механизмы формирования целостности систем // Системные исследования. Ежегодник 1973 – М.: Наука, 1973. – С. 52–62.
9. Михеев А.Н. Системные характеристики филогенетических факторов и объектов // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр., Т. 2. – К.: КВІЦ, 2004. – 416 с. (С. 37–41).
10. Михеев А.Н. Эпигенетическое усиление мутационных изменений, повышающее разрешающую способность естественного отбора // «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології», сб. наук. праць. – Т. 4. – К.: Логос, 2012. – С. 165–170.
11. 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.
12. Михеев А.Н., Шилина Ю.В., Гуца Н.И. Механизмы биологического усиления у растений и микроорганизмов в норме и патологии // Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля. – 2005. – Вип. 3, Ч. 2 – С. 29–35.
13. Серебровский А.С. Некоторые аспекты органической эволюции. – М.: Наука. – 168 с.
14. Тимофеев-Ресовский Н.В., Воронцов Н.Н., Яблоков А.В. Краткий очерк теории эволюции. – М.: Наука, 1969. – 408 с.
15. Титов Ю.В. Эффект группы у растений. – Л.: Наука, 1978. – 151 с.
16. Фридман В.С. Направленное развитие пространственно-этологической структуры популяции при равновесии полярных жизненных стратегий их членов - возможный сценарий "недарвиновской" микроэволюции // Теоретические проблемы экологии и эволюции: Материалы III Люблишевских чтений. Тольятти, 2000. – С. 208–219.
17. Хлебович В.В. Адаптация особи и клона: механизмы и роли в эволюции // УСБ. – 2002. – Т. 122, № 1. – С. 16–25.
18. Хлебович В.В. Новое окно в эпигенетику // Природа. – 2006. – № 7. – С. 22–29.
19. Шварц С.С. Экологические закономерности эволюции. – М.: Наука, 1980. – 280 с.
20. Шмерлина И.А. Идея целостности в социологии и биологии // Социологический журнал. – 2004. – № 1/2. – С. 33.

MIKHAYEV A.N.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Science of Ukraine, Ukraine, 03143, Kiev, 148 Zabolotnogo St., e-mail: mikhalex7@yahoo.com

THE EMERGENCY OF MICROEVOLUTION PROCESSES

Aims. Applicability of system approach is considered to the study of the phenomena the biological evolution. **Methods.** The conceptual form of system approach. **Results.** In evolutionism of emergency expressed as an origin of new functional units of the systems that are not taken to simple transpositions of functions of

already present elements. The system idea requires system description of evolutionary process, i.e. description and subsequent account of intracommunications of adjusting. Existence of group adaptations specifies on insufficiency of genocentrical conception of evolution. **Conclusions.** Therefore, the effect of group in population shows up in its original polarization on certain signs that can gain a foothold genetically.

Key words: Emergency, microevolution, systemology.

ПАРДАЕВА Е.Ю.^{1,2}, МАШКИНА О.С.^{1,2}, КУЗНЕЦОВА Н.Ф.²

¹Воронежский государственный университет

Россия, 394006, г. Воронеж, ул. Университетская площадь, 1, e-mail: elena.pardaeva@mail.ru

²ФГУП НИИ лесной генетики и селекции

Россия, 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 105, ilgis@lesgen.vrn.ru

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.) В УСЛОВИЯХ ЗАСУХИ И ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Загрязнение окружающей среды – одна из актуальных и важных проблем современности. С конца XX – начала XXI веков намечается тенденция к глобальному потеплению климата. Интенсивность потепления для территории России за последние сто лет в среднем составила 0,9°C [1]. Установлено, что среднегодовая температура приземного воздуха в России возросла на 0,4°C за период 1990-2000 гг. По прогнозам данный тренд сохранится до 2010-2015 гг., что приведёт к росту среднегодовой температуры на $0,6 \pm 0,2^\circ\text{C}$ [2].

У сосны обыкновенной, одной из основ-

ных лесобразующих пород России, наиболее чувствительна к засухе генеративная сфера [3]. Изучение показателей семенной продуктивности и цитогенетических характеристик семенного потомства одних и тех же деревьев в контрастные по погодным условиям годы (2008 – оптимальный и 2010 – год сильной засухи) даст возможность изучить норму и специфику реакции различных генотипов на комплекс факторов стресса и выделить деревья, продуцирующие потомство, толерантное к неблагоприятным воздействиям.

Материалы и методы

В работе использовали семенное потомство деревьев сосны обыкновенной из различных по степени загрязнения мест произрастания: 1. Контроль (Воронежская обл., село Ступино, территория Усманского бора) – экологически благоприятная территория; 2. Защитное насаждение вдоль автотрассы «Воронеж-Дон», подвергающееся хроническому воздействию выхлопных газов автотранспорта и рекреационной нагрузке. Семенной материал от свободного опыления для каждого района заготавливали с 10-ти фенотипически нормальных 40-50-летних деревьев. Чувствительность генеративной сферы к стрессорам (техногенному – выбросы автотранспорта и погодному – засуха) оценивали по показателям семенной продуктивности (полнозернистости (%), числу семян в шишке (шт.),

лабораторной всхожести семян (%)) и цитогенетическим показателям (частоте и спектру патологий митоза (ПМ, %); частоте встречаемости микроядер (%); ядрышковой активности (%)).

Изготовление давленных препаратов проводилось по методике Л.А. Топильской [4] в нашей модификации. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием статистического пакета программ Stadia. Сравнение выборок по частоте ПМ и частоте микроядер проводилось с использованием непараметрических критериев: X-критерия рангов Ван-дер-Вардена, так как данные признаки не подчиняются нормальному распределению. Проверку нормальности распределения осуществляли с использованием критерия хи-квадрат.

Результаты и обсуждения

В течение вегетационного сезона 2010 года на анализированной территории действовало два антициклона. Первый, весенний, пришёлся

на начало мая, в результате чего репродуктивные процессы у сосны были смещены на более ранний период. Второй, летний антициклон

(собственно засуха), начался с конца июня. Таким образом, основное воздействие засуха оказала на две репродуктивные стадии сосны: конец раннего эмбриогенеза, поздний эмбриогенез [5].

Установлено, что в аномально жаркий и сухой 2010 год в обоих районах наблюдалась тенденция снижения (по сравнению с оптимальным 2008 г.) показателей семенной продуктивности и лабораторной всхожести семян, расширение диапазона их изменчивости. Причем, наиболее низкая семенная продуктивность отмечена у потомства деревьев, произрастающих вдоль автотрассы и испытывающих в 2010 г. двойной стресс (техногенный + погодный). Так, в среднем для 10 деревьев число семян в шишке составило $21,3 \pm 0,9$ (против $17,0 \pm 0,8$ в контроле), лабораторная всхожесть семян $57,0 \pm 3,4\%$ и $81,4 \pm 2,2\%$ соответственно. На основе реакции изученных показателей на засуху 2010 года все

деревья были условно разделены на две группы: чувствительные и устойчивые. В группе устойчивых деревьев реакция на неблагоприятные условия была менее выражена и почти не отразилась на их урожайности. Примечательно то, что в оптимальный 2008 год статистически достоверных различий между группой устойчивых и чувствительных деревьев выявлено не было. Это свидетельствует о том, что отбор засухоустойчивых деревьев следует проводить не только в засушливые годы, дифференцирующие деревья по устойчивости генеративной сферы к стрессу.

Показано, что в потомстве деревьев, произрастающих вдоль автомагистрали «Воронеж-Дон», существенно возрастает частота и расширяется спектр ПМ по сравнению с контролем. Так, в среднем для 10 деревьев частота ПМ в районе автотрассы составила $3,1 \pm 0,2\%$ в 2008 году и $5,7 \pm 0,2\%$ - в 2010 году (таблица).

Таблица. Частота встречаемости патологических митозов и микроядер в семенном потомстве деревьев сосны обыкновенной из различных по степени загрязнения мест произрастания (в контрастные по погодным условиям годы)

Показатели	Усманский бор		Автотрасса «Воронеж-Дон»	
	2008	2010	2008	2010
Патологии митоза, % $\bar{X} \pm S\bar{x}$	$1,4 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,1$	$3,1 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,2^*$
Микроядра, %	$0,001 \pm 0,001$	$0,04 \pm 0,01^*$	$0,1 \pm 0,01$	$0,1 \pm 0,01$

Примечание: *различия с 2008г. достоверны при $P < 0,001$

Это в 2-3 раза выше по сравнению с контролем ($1,4 \pm 0,2\%$ в 2008г. и $1,7 \pm 0,1\%$ в 2010 г.) и находится на границе нормальных значений уровня спонтанного мутирования в средней полосе России, принятого за 5% [6, 7]. В районе автотрассы в 2,5 раза увеличился уровень встречаемости микроядер ($0,1 \pm 0,01\%$ против $0,04 \pm 0,01\%$ в контроле). Кроме того, микроядра выявлены не только в интерфазных, но и в делящихся клетках (рисунок 1), что свидетельствует о недостаточной работе репарационных систем клетки в условиях двойного стресса.

При сравнении показателей частоты ПМ по годам (2008 и 2010) достоверных различий между выборками в районе Усманского бора (контроль) не выявлено, тогда как в районе автомагистрали различия в разные годы статистически достоверны и выше в год засухи 2010 го-

да. По-видимому, изменение погодных условий влияет на уровень стрессовой нагрузки на антропогенно загрязненной территории.

Как в контрольном, так и в опытном варианте в год аномальной засухи (2010 г.) между группами чувствительных и устойчивых деревьев по частоте ПМ отмечаются статистически достоверные различия – частота ПМ была выше в семенном потомстве чувствительных деревьев (рисунок 2).

Все встречающиеся типы патологий митоза (выявлено 10 типов) были условно разделены нами на три группы: структурные (хромосомные aberrации), геномные (приводящие к изменению числа хромосом, чаще, к анеуплоидии), множественные (включающие в различном сочетании как структурные, так и геномные нарушения).

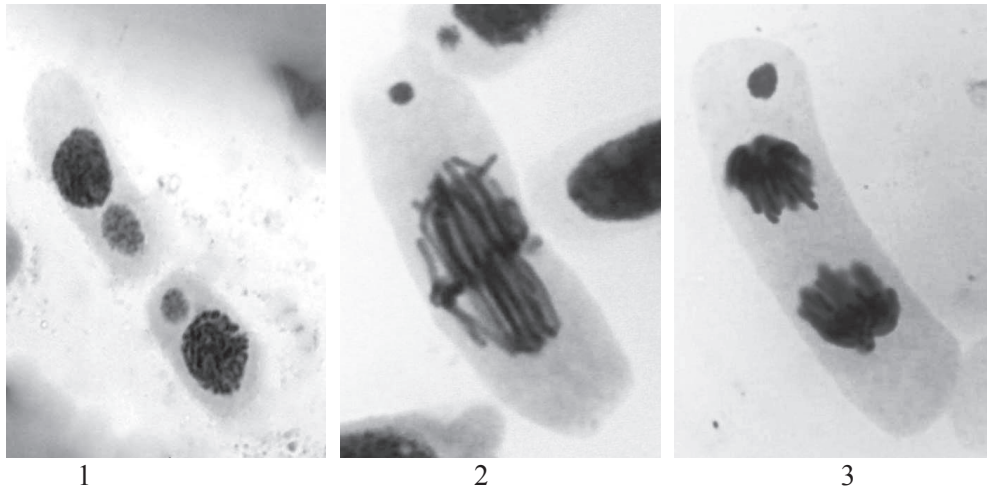


Рис. 1. Микроядра в клетках корневой меристемы проростков сосны обыкновенной: 1 – интерфаза; 2 – метафаза; 3 – анафаза. Увеличение $40 \times 1,5 \times 10$

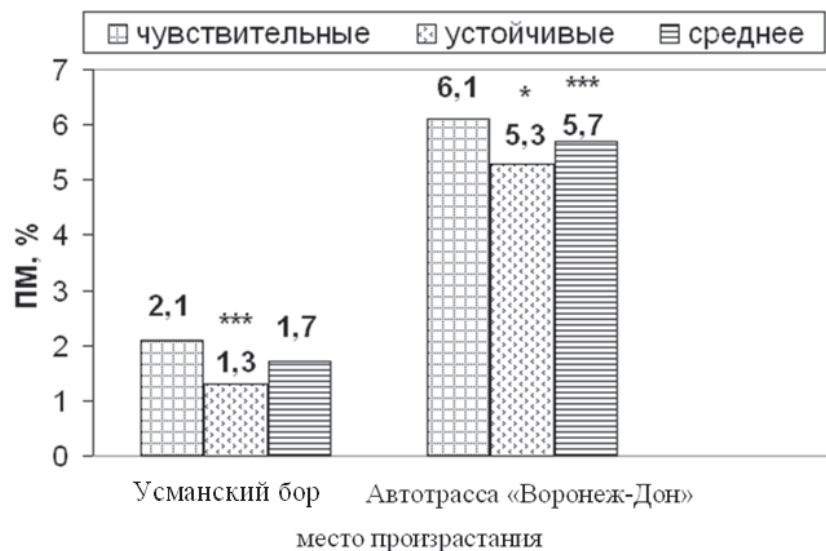


Рис. 2. Частота патологических митозов в семенном потомстве контрастных по чувствительности генеративной сферы к засухе деревьев сосны обыкновенной (чувствительных и устойчивых) из различных мест произрастания, 2010 г.

Примечание: различия между группой чувствительных и группой устойчивых деревьев, а также различия по средним значениям с контролем (Усманский бор) достоверны при * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Выявлено, что на территории, подвергающейся хроническому воздействию выбросов автотранспорта, значительно (в 1,8 раз) повышается доля клеток со структурными нарушениями (простые и сложные мосты, фрагменты хромосом, кольцевые хромосомы в метафазе и анафазе) - 37,2% (против 20,2% - в Усманском бору), что свидетельствует о повышении здесь уровня мутационного процесса (рисунок 3).

Причем, только в потомстве деревьев из района автодороги были выявлены клетки с кольцевыми хромосомами, чаще всего возникающие вследствие делеции обоих плеч хромо-

сомы. В то же время, перераспределение генетического материала между хромосомами может привести к дополнительному резерву изменчивости, увеличению диапазона нормы реакции организма.

Спектр хромосомных нарушений зависел от генотипических особенностей исходного дерева и его групповой принадлежности (чувствительное/устойчивое). Так, в экологически благоприятном районе (Усманский бор) в аномально засушливый год наиболее широкий спектр ПМ (6-8 типов) наблюдался у чувствительных деревьев по сравнению с устойчивыми (3-6 типа).

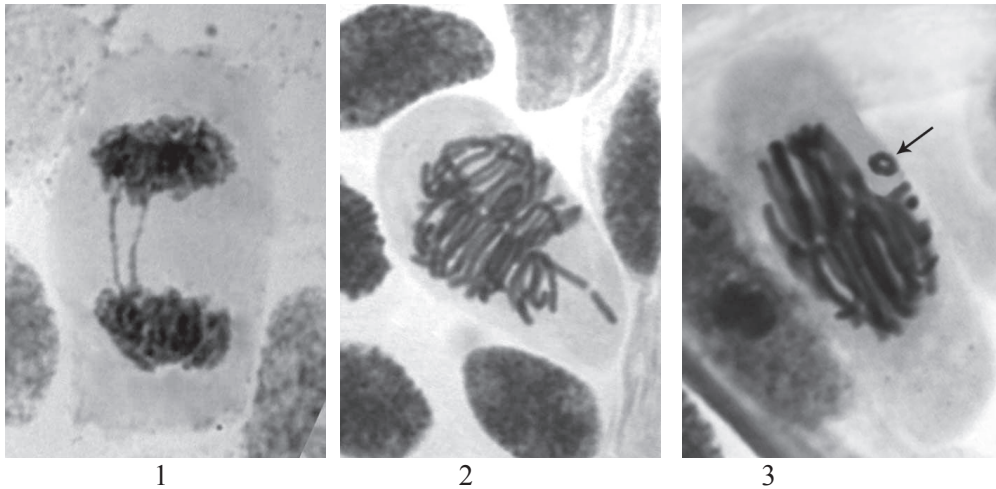


Рис. 3. Структурные нарушения митоза у деревьев, произрастающих вдоль автотрассы «Воронеж-Дон»: 1 – двойной мост в анафазе; 2 – фрагмент хромосомы в метафазе; 3 – кольцевая хромосома в метафазе. Увеличение $40 \times 1,5 \times 10$

Известно, что ядрышковая активность является чувствительным критерием в цитогенетическом мониторинге, причём её возрастание отмечается в экстремальных условиях. Максимально возможное количество ядрышек в клетках сосны обыкновенной – 12 [8, 9]. В контрольном варианте преобладали клетки с 4-6 ядрышками, в районе автотрассы – с 5-7, т.е. ядрышковая активность в обоих районах находится в норме. Однако, в потомстве деревьев, произра-

стающих вдоль автотрассы, отмечено существенное (в 1,8 раз по сравнению с контролем) возрастание количества клеток с максимальным количеством ядрышек (10-12 ядрышек в ядре). Причём, их количество было выше в группе устойчивых деревьев, что может рассматриваться как регуляторный механизм, способствующий усилению белкового метаболизма у деревьев в стрессовых условиях произрастания.

Выводы

В год аномальной засухи (2010 г.) в потомстве деревьев сосны обыкновенной, произрастающих в районах с различной степенью антропогенной нагрузки (экологически благоприятном и вдоль автотрассы), происходит расширение диапазона изменчивости показателей семенной продуктивности (полнозернистость и число семян в шишке) и цитогенетических показателей (частота и спектр нарушений митоза, частота встречаемости микроядер, ядрышковая

активность). Показано, что реакция различных генотипов на стресс (засуха или выбросы автотранспорта + засуха) в обоих районах неоднозначна, что отражает их различные адаптивные возможности и устойчивость к неблагоприятным воздействиям. На основании полученных данных выделена группа устойчивых деревьев, продуцирующих толерантное потомство к воздействию погодных и техногенных факторов стресса.

Литература

1. Переведенцев Ю.П., Гоголь Ф.В., Наумов К.М., Шаталинский К.М. Глобальные и региональные изменения климата на рубеже XX и XXI столетий // Вестник ВГУ. Серия: География. Геоэкология. – 2007. – № 2. – С. 5–12.
2. Стратегический прогноз изменений климата Российской Федерации на период до 2010-2015 гг., и их влияние на отрасли экономики России / М.: Росгидромет, 2005. – С. 6-8.
3. Кузнецова Н.Ф. Чувствительность генеративной сферы сосны обыкновенной к засухе в Воронежской области // Лесоведение. – 2010. – №6. – С. 58–65.
4. Топильская, Л.А., Лучникова С.А., Чувашина Н.П. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленных препаратах // Бюл. ЦГЛ им. И.В. Мичурина. – 1975. – Вып. 22. – С. 58–61.
5. Кузнецова Н.Ф., Машкина О.С., Пардаева Е.Ю. Морфометрическая и цитогенетическая оценка контрастных по засухоустойчивости форм сосны обыкновенной / Достижения I проблемы генетики, селекции та біотехнології: сб. науч. тр. Киев: Логос, 2012. – С. 469-474.

6. Дорошев С.А. Влияние антропогенных стрессоров на изменчивость цитогенетических показателей у сосны обыкновенной / Дорошев С.А.: автореф. дис. ... канд. биол. наук – Воронеж, 2004. – 23 с.
7. Буторина А.К., Черкашина О.Н., Ермолаева О.В., Чернодубов А.И., Авдеева И.А. Цитогенетический мониторинг аутохтонных лесов Усманского и Хреновского боров // Известия РАН: Серия биологическая. – 2007. – № 4. – С. 508–512.
8. Буторина А.К., Калаев В.Н. Шкала чувствительности критериев цитогенетического мониторинга // Цитология. – 1999. – Т. 41, № 12. – С. 1056–1057.
9. Муратова Е.Н., Седелникова Т.С. Структурные перестройки хромосом и полиморфизм нуклеолярных локусов как факторы устойчивости хвойных в экстремальных условиях / Методы оценки состояния и устойчивости лесных экосистем: тез. докл. междунар. совещания, 8–13 августа, Красноярск, 1999. – С. 116–117.

PARDAYEVA E.Yu.^{1,2}, MASHKINA O.S.^{1,2}, KUZNETSOVA N.F.²

¹ Voronezh state university

Russia, 394006, Voronezh, Universitetskaya pl. 1, e-mail: elena.pardaeva@mail.ru

² Research institute of forest genetics and breeding

Russia, 394087, Voronezh, Lomonosov str. 105, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

THE RESEARCH OF CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF SCOTS PINE (*PINUS SYLVESTRIS* L.) SEED PROGENY IN DROUGHT AND TECHNOGENIC POLLUTION CONDITIONS

Aims. To research the indices of seed productivity and cytogenetic variability of seed progeny of Scots pine-trees, which are exposed to weathering and technogenic stress factors, to assess the genome stability and to identify the specificity and reaction norms of different genotypes. **Methods.** The sensibility of generative sphere to stress factors was assessed by indices of seed productivity and cytogenetic parameters. **Results.** There were distinguished some groups of sensitive and resistant trees to stress factors based on the indices of seed productivity. It has been shown that cytogenetic indices for groups of sensitive and resistant trees are different. **Conclusions.** It has been found that the response of different genotypes to stress is different in both regions, that is reflected in the degree of their resistance to the adverse environmental conditions.

Key words: Scots pine, seed productivity, cytogenetic characteristics, extreme conditions, bioindication.

САФРОНОВА Л.Д., ПЕТРОСЯН В.Г., СЫЧЕВА В.Б.

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Москва, Ленинский проспект, 33, e-mail: ldsafronova@gmail.com

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ Т-КОМПЛЕКСНЫХ ДОМОВЫХ МЫШЕЙ (*MUS MUSCULUS*) ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОИНДИКАЦИИ

В работе представлены новый подход для решения одной из задач экологической генетики на основе использования модели t-комплексных домовых мышей (*Mus musculus*). t-комплекс включает сложную систему генов, которые локализованы в околоцентромерном районе 17 хромосомы домового мыши. Рассмотрены результаты изучения сравнительного анализ частот t-гаплотипов *M. musculus*, обитающих в природных популяциях на территории России и смежных государств, и особей, отобранных из лабораторной коллекции t-комплексных мышей, принадлежащей лаборатории микроэволюции

млекопитающих ИПЭЭ РАН. Кроме этого в работе особое внимание уделяется выявлению факторов, оказывающих влияние на частоту t-гаплотипов в дикой популяции мышей, обитающих в различных экологических условиях среды, изучение частот t-гаплотипов в городских популяциях, а также популяции мышей, подвергшихся действию радиации ЧАС. Полученные результаты помогут продвинуться в решении одной из интересных и значимых задач в биоиндикации экологических условий среды (экологической генетики).

Введение

t-комплекс локализован в проксимальной части 17-й хромосомы и представляет собой

набор из четырех неперекрывающихся инверсий общей протяженностью около 20 сМ, т.е.

примерно 0,7 % от всего генома *M. musculus* [15].

Различные варианты t-комплекса являются структурными мутациями, которые широко распространены в природных популяциях домашней мыши и передаются самцами-гетерозиготами с частотой, превышающей ожидаемую при простом менделевском наследовании (50 %) [10, 16]. Встречаемость носителей t-гаплотипов среди потомков может достигать 90 %. К настоящему времени, благодаря многочисленным исследованиям составлена достаточно полная картина распространения t-гаплотипов в пределах ареала домашней мыши [14, 9, 2, 11] [7]. (рис. 1).

Целью данного исследования является разработка и применение нового метода в биоиндикации экологических условий среды на

основе использования модели t-комплексных мышей [6]. Кроме того, работа включает совершенствование методики и проведение сравнительного анализа частот t-гаплотипов, домашних мышей, обитающих в природных популяциях на территории России и смежных государств, и особей из лабораторной коллекции t-комплексных мышей, принадлежащей лаборатории микроэволюции млекопитающих ИПЭЭ РАН.

Вместе с тем, необходимо выявление факторов, которые оказывают влияние на частоту t-гаплотипов в дикой популяции мышей, обитающих в различных экологических условиях среды, а также популяции мышей, подвергшихся действию радиации (ЧАС), и изучение частот t-гаплотипов в городских популяциях.

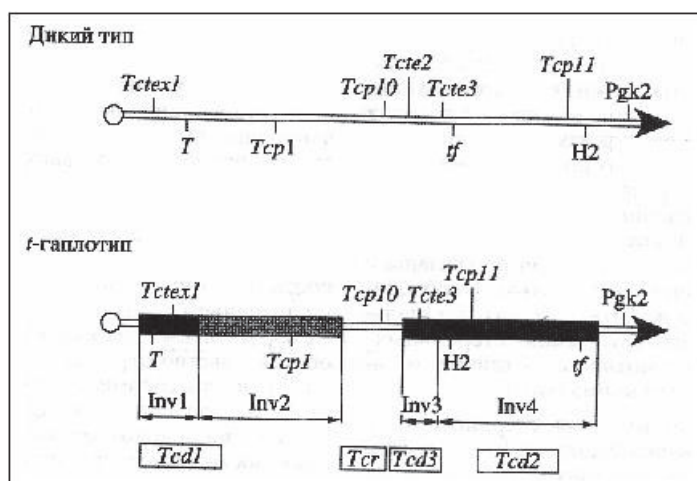


Рис. 1. Схема расположения t-комплекса на проксимальной части 17-й хромосомы мыши. Обозначения: *Tcd1*, *Tcd2*, *Tcd3* – гены-дистортеры, *Tcr* – ген-респондер, *T* – *Brachyury*, *tf* – *tufted* – маркерные мутации, *Tcp1*, *Tctex1*, *Tcpte2*, *Tctei* – кандидаты в дистортерные гены, *H2* – главный комплекс гистосовместимости мыши. *Pgc2* – фосфоглицераткиназы, *Inv 1, 2, 3, 4* – инверсии (обозначены блоками)

Материалы и методы

Основными методическими подходами являются: комплементационный анализ, определение частот t-аллелей в природных популяциях, цитогенетический анализ (электронно-микроскопический анализ синаптонемных комплексов мейотических хромосом).

Были использованы лабораторные мыши из стоков, несущих t-комплекс. Данная коллекция лаборатории проблем микроэволюции ИПЭЭ РАН насчитывает шесть полных и два частичных t-гаплотипа, относящихся к семи основным группам комплементации (*t0*, *t9*, *t12*, *tw1*, *tw5*, *tw73*, *twPa_1*) [2].

Характеристика особей из природных популяций *M. musculus* Москвы и Московской обл. (1 экз.), Таджикистана, Литвы, Монголии и

M. m. spicilegus Молдавии опубликована ранее. Частоты t-аллелей в обследованных природных популяциях вычисляли по формуле Харди-Вайнберга, но при этом была введена поправка на преимущественное наследование t-аллелей от гетерозиготных самцов.

Комплементационный анализ. Для комплементационного анализа использовались лабораторные мыши из стоков, несущих t-комплекс аллелей. Принадлежность t-аллеля к определенной группе комплементации устанавливается скрещиванием гетерозиготных T/t X самцов-носителей tx аллелей – с самками тестированных линий, сбалансированных по леталем.

Определение частот t-аллелей в природных популяциях. Частоты t-аллелей в обследо-

ванных природных популяциях определяются с помощью модифицированной формулы Харди – Вайнберга [3] с учетом поправок на преимущественное наследование t-аллелей от гетерозиготных самцов. Степень соответствия ожидаемой численности генотипов эмпирическим величинам определяется по критерию χ^2 . Анализ частоты носителей t-гаплотипов в природных популяциях *M. musculus* из различных регионов России позволяет установить уровень генетических вариантов t-гаплотипов и идентифицировать факторы, воздействующие на их частоту.

Результаты и обсуждение

Представлен анализ оценок частот генотипов (эмпирических и ожидаемых) в природных популяциях, обитающих на территории России и сопредельных стран с привлечением лабораторной коллекции t-комплексных мышей, поддерживаемых более 30 лет.

Сравнение по критерию χ^2 теоретически ожидаемой численности генотипов +/+, +/t и t/t с величинами, определенными при анализе природных популяций, показало, что это различие недостоверно. Отсутствие статистически значимой разницы между эмпирическими и теоретическими частотами исследуемых генотипов в выборках не отклоняет гипотезу о панмиксности популяций из всех регионов.

Наибольшая частота t-аллелей отмечена в выборке *M. m. wagneri* из Монголии (0.44), наименьшая – в популяции этого же вида из Тигровой балки, Таджикистана (0.12). Несмотря на это различие, нулевая гипотеза о панмиксности популяций из всех регионов не отклоняется.

Анализ показал высокую частоту t-гаплотипов в городских популяциях Москвы, связанную с расселением в урбанизованных местах обитания. Например, полиморфизм t-комплекса показан для 4 тестированных участков Москвы, где средняя частота t-гаплотипов для популяций из этих участков составляет 0.57%. Хотя для диких популяций из московской области такой показатель значительно ниже и составляет 0,28% [1, 7].

Это непосредственно связано со значением и ролью экологических условий, а именно, влиянием антропогенных воздействий на частоту t-гаплотипов в городских популяциях. В городских районах обитания мышей роль колонизируемых стадий могут выполнять участки, подвергшиеся регулярной дератизации. Это хотя может и не привести к полной гибели грызунов, но ведет к нарушению демной социальной структуры популяции, способной противостоять иммигра-

Цитогенетический анализ. Поведение мейотических хромосом у самцов *M. musculus*, несущих t-гаплотипы, проводился с использованием электронно-микроскопического (ЭМ) анализа синаптонемных комплексов (СК) мейотических хромосом. Для ЭМ анализа синаптонемных комплексов сперматоцитов из разных популяций домовых мышей на стадии средней пахитены получены препараты распластанных на поверхности гипотонического раствора сперматоцитов с последующей окраской азотнокислым серебром [13, 5].

ции, которое сопровождается некоторым понижением частот t-носителей. В то же время такое понижение могло бы иметь адаптивное значение для популяции в целом, так как уменьшение частоты преимущественно наследуемых леталей приводит к увеличению скорости восстановлений численности. В этом случае изменение частоты t-гаплотипов можно рассматривать как реакцию генофонда популяций домовых мышей на внешние, в данном случае – антропогенное, воздействия.

Оценка действия радиации на структуру и функции t-комплекса проведена с использованием в качестве генетической системы индикации комплементационного анализа. t-гаплотипы в соответствии со свойствами их летальных факторов подразделяются на ряд комплементационных групп, из которых наиболее изучены t0, t12, tw1, tw5. С помощью данного метода оказалось возможным выявить возникшие под действием радиации летальные мутации, относящиеся к известным или новым комплементационным группам. Было показано влияние повышенного радиационного фона на мышей, несущих летальные t-гаплотипы. На протяжении 1987–1989 гг. животные экспонировались ежегодно в течение месяца в тридцатикилометровой зоне Чернобыльской АЭС на участках с различной степенью загрязненности. Последующий генетический анализ показал снижение фертильности, плодовитости и показателя преимущественной передачи t-несущей хромосомы у облученных животных и отчасти у их потомства, а также различия в степени влияния разных доз радиации на эти показатели у животных с разными t-гаплотипами. Выявлены случаи отсутствия комплементации и снижения комплементационного эффекта в ряде скрещиваний с участием потомства облученных самцов. Частота случаев нарушения комплементации составляет около $8 \cdot 10^{-2}$ и превышает обычную для данных t-гаплотипов рекомбинант-

ную частоту более чем на порядок [4].

Оценка влияния радиации на поведение мейотических хромосом у самцов *Mus musculus*, несущих t-гаплотипы, проводится с использованием электронно-микроскопического (ЭМ) анализа синаптонемных комплексов (СК) мейотических хромосом. Было изучено влияние радиации на поведение мейотических хромосом у самцов

M. musculus несущих t-гаплотипы. Мышей экспонировали в течение полутора месяцев в 30-км зоне Чернобыльской АЭС. С помощью электронно-микроскопического анализа синаптонемных комплексов (СК) исследовали структуру распластанных сперматоцитов у самцов (мышей-родителей), несущих t-гаплотипы, и их потомства (F_1 и F_2) (табл. 1, рис. 2, 3).

Таблица 1. Частота различных типов повреждений СК сперматоцитов мышей родителей, подвергшихся влиянию увеличенного радиоационного фона Чернобыльской АЭС, и их потомства (F_1 , F_2)

№ живот-ных	Т-гаплотипы	Количество клеток	Типы нарушений (%)					Ассоциация аутосом с половыми хромосомами
			Аутосомы			Х-У половые хромосомы		
			разрывы фрагменты	петли	асинаптические конфигурации	асинапсис	кольца	
48	P tw5	33	80	5	20	25	20	3 5
59	P tw12		25	23	38	46	15	
55	F_1 tw5	38	38	21	7	45	36*	9
44	F_1 tw12		36	9	9	38	45**	8
50	F_1 tw12		40	45	15		23* 8*	
58	F_2 tw5	80	14	10	11	14	5	14
56	F_2 tw12		13	13	14	13	5	
57	F_2 tw12		32	9		27	18*	
	Контроль	44	27 %	16 %	7 %	25 %	11 %	7 %
	Среднее	38	34	26	11	26	18* 16**	

Примечания: * – кольцевая х-хромосома, ** – кольцевая у-хромосома.

Продемонстрированы результаты электронно-микроскопического анализа синаптонемных комплексов (СК) на препаратах мейотических хромосом на стадии раннего мейоза [8]. С помощью электронно-микроскопического анализа синаптонемных комплексов (СК) исследована структура распластанных сперматоцитов у самцов. Показано, что длительное хроническое облучение существенно влияет на структуру мейотических хромосом. Идентифицированы различные типы повреждения аутосом и половых бивалентов. Для аутосомных бивалентов характерны разрывы (бреши), фрагменты, микропетли, асинаптические конфигурации; тогда как у половых хромосом наблюдались унивалентные и кольцевые конфигурации. У экспонированных мышей частота повреждений хромосом по ряду признаков выше, чем у потомства и умень-

шается от первого поколения ко второму. Полученные данные подтверждают роль повреждающего действия радиации на структуру мейотических хромосом, выявленного посредством электронно-микроскопического анализа СК, что согласуется с результатами других исследователей.

В основном, результаты анализа повреждения СК у облученных мышей-самцов, подвергшихся воздействию радиации в зоне ЧАЭС, совпадают с описаниями других авторов. В наших исследованиях мы наблюдали почти весь спектр повреждений синаптонемного комплекса, за исключением цепочек мультивалентов и мостов, описанных Масамбуко с соавт. [17]. Эти аномалии СК отражают структурные нарушения, которые обусловлены индуцированными хромосомными повреждениями.

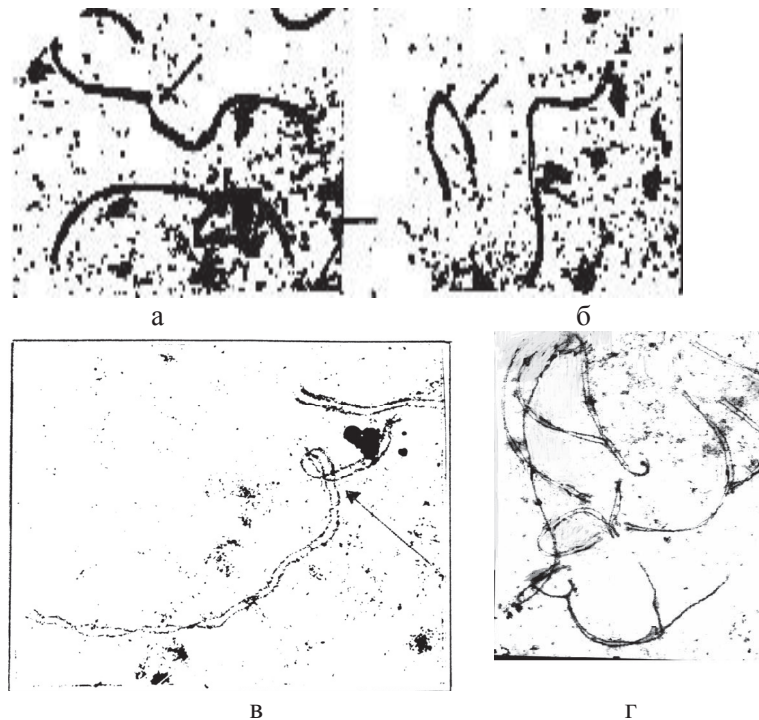


Рис. 2. Электронно-микроскопического фото нарушений СК в сперматоцитах мышей, подвергшихся действию радиации ЧАЭС аутомомных бивалентов в районе: а) разрывы (бреши) одной из осей боковых элементов СК (F_1) (указано стрелкой $\times 2.600$; б) одновременно двух осей боковых элементов СК (указано стрелкой) $\times 3.300$; в) инверсионная петля в структуре осей боковых элементов СК (указано стрелкой (F_2) $\times 2.600$) г) гетероморфный бивалент асинатические конфигурации (с участками асинатиса различной протяженности) с интенсивно окрашенными и утолщенными участками бокового элемента

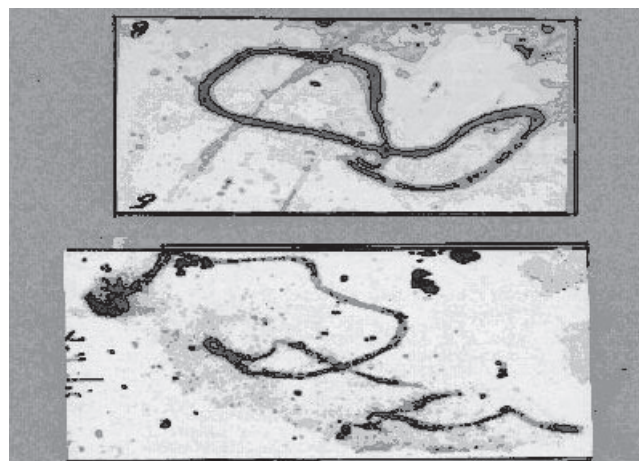


Рис. 3. Разные типы поведения половых хромосом: а) униваленты замкнуты в кольца (кольцевая конфигурация ($\times 3.300$); б) десинапсис (унивалентность) X–Y хромосом ($\times 3.300$)

Несмотря на проведенные многочисленные исследования организационной структуры популяций, поведения самцов, несущих t-гаплотипы, гаметического отбора, конверсии генов, и др., в дальнейшем требуется расширение базы данных и анализ различных моделей для понимания факторов и механизмов, контро-

лирующих нарушение менделеевского соотношения TRD в различных экологических условиях обитания домовых мышей. Экспериментальные данные, полученные на диких мышах, отловленных из различных природных популяций России и сопредельных территорий, представлены оригинальными результатами [7].

Полученные результаты по выявлению факторов, оказывающих влияние на частоту t-гаплотипов в дикой популяции мышей, обитающих в различных экологических условиях среды, изучение частот t-гаплотипов в городских попу-

ляциях, а также популяции мышей, подвергшихся действию радиации ЧАС, дают возможность продвинуться в решении одной из интересных и значимых задач в биоиндикации экологических условий среды (экологической генетики).

Литература

1. Демин Ю.С., Мазин С.М. Сафронова Л.Д. Результаты анализа t – гаплотипов, выделенных из генофонда московской популяции домашней мыши. // Докл. Академии наук СССР. – 1986. – Т. 285, №3. – С. 507–510.
2. Демин Ю.С., Сафронова Л.Д., Шустрова И.В., Орлов В.Н. Описание коллекции t-аллелей домашней мыши (*Mus musculus*) // Успехи сов. генетики. – 1989. – Вып. 16. – С. 90–95.
3. Ли Ч. Введение в популяционную генетику. – М.: Мир, 1978. – 555 с.
4. Сафронова Л.Д., Шустрова И.В., Митрофанов В.Г. Влияние повышенного радиационного фона на мышей, несущих летальные t-гаплотипы // Генетика. – 1998. – Т. 34, N. 5. – С. 682–687.
5. Сафронова Л.Д. Электронно-микроскопический анализ синаптонемных комплексов у самцов-гибридов // Онтогенез. – 1999. – Т. 30, №4. – С. 255–266.
6. Сафронова Л.Д., Петросян В.П., Сафронов В.А. Математическая модель для оценки TRD на основе многолетних данных коллекции T-комплексных мышей. (Mathematical model for TRD evolution on the basis of long term data of T-complex mice collection.) // Информационные системы и WEB – порталы по разнообразию видов и экосистемы. Материалы международного симпозиума. 28 ноября – 1 декабря 2006. – КМК Москва. – С. 256–257.
7. Сафронова Л.Д., Петросян В.Г. t-комплекс – модельная система для экологической генетики (доклад). // «Видовые популяции и сообщества в антропогенно трансформированных ландшафтах: состояние и методы его диагностики». Материалы XI международной научно-практической экологической конференции. 20-25 сентября 2010.
8. Сафронова Л.Д., Шустрова И.В. Электронно-микроскопический анализ синаптонемных комплексов мейоцитов мышей, экспонированных в зоне Чернобыльской АЭС // Вестник Украинского товарищества генетиков и селекционеров. – 2012. – Т. 10, №1. – С. 78–85.
9. Ardlie K.G., Silver L.M. Recent evolution of mouse t-haplotypes at polymorphic microsatellites associated with the t complex responder (Tcr) locus // Genet. Re. – 1996. – Vol. 87. – P.1–10.
10. Bennett D. The T-locus of the mouse // Cell. – 1975. – Vol. 6. – P. 441–446.
11. Ben-Sholomo R., Neufeld E., Berger D., Levington S., Ritte U. The dynamic of t-haplotype in wild populations of the house mouse *Mus musculus domesticus* in Israel // Mamm. Genome. – 2007. – Vol. 18, №3. – P. 164–172.
12. Dod B., Lithel C., Makoundou P., Ort A., Boursot P. Identification and characterization of t-haplotypes in Wild mice populations using molecular markers *M.m.musculus – M.m.domesticus* // Genet. Res. – 2003. – Vol. 81. – P. 103–114.
13. Dresser M.E., Moses M.J. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*).IV. Light and electron microscopy of synapsis and nucleolar development by silver staining // Chromosoma. – 1980. – Vol.76, №1. – P.1–22.
14. Figueroa F., Neufeld E., Ritte U., Klein J. t-specific DNA polymorphism among wild mice from Israel and Spain // Genetics. – 1988. – Vol. 119. – P. 157–160.
15. Hammer M.F. Molecular and chromosomal studies on the origin of t-haplotypes in mice // Amer. Nat. – 1991. – Vol. 137. – P. 359–365.
16. Lyon M. F. Transmission Ratio Distortion in mice // Ann. Rev. Genet. – 2003. – Vol. 37. – P. 393–408.
17. Masumbuko M.B., Freund M.B., Meuer R.D. Sinaptonemal complex alteration in X-irradiation and in oestrogen-treated mice: a comparative study // Mutation Res. – 1992. – Vol. 282. – P. 3–12.
18. Safronova L.D., Riabov I.N. The electron-microscopic analysis of synaptonemal complexes of mice meiocytes exposed in Chernobyl Atomic Station region // Mutation Res. – 1997. – Vol. 379, №1. – P. 108.

SAFRONOVA L.D., PETROSYAN V.G., SYCHEVA V.B.

A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution Russian academy of sciences (SIEE RAS)

e-mail: ldsafronova@gmail.com

USING OF T-COMPLEX MODEL (HOUSE MICE *MUS MUSCULUS*) FOR ECOLOGICAL BIO-INDICATION

The *arm* was solved one of the problems of ecological genetics, using t-complex (t-haplotypes) model of house mice *M. musculus*. The *methods* are complementary analysis and cytogenetic analysis (EM microscopic synaptonemal complexes of spreading meiotic chromosome). The *results and conclusions*. The results of the comparative analysis of the frequencies t-haplotypes, house mouse, spreading in natural popula-

tions in Russia and neighboring countries, and specimens taken from the laboratory collection of t-complex mice belonging to Mammals Microevolution Laboratory of SIEE RAS. These results showed the factors that influence the frequency of t-haplotypes in wild populations of mice spreading in different ecological conditions and the study of t-haplotype frequencies in urban populations, also populations of mice exposed to radiation in the CHAS. These results will progress in addressing one of the most interesting and important problems in the biological indication of environmental conditions of the environment (ecological genetics).

Key words: t-complex model of *Mus musculus*, complementation analysis, cytogenetic analysis, ecological indication.

СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В.

Федеральное 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

КАРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК КРАСНО- И ЖЕЛТОПЫЛЬНИКОВОЙ ФОРМ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В БОЛОТНЫХ И СУХОДОЛЬНЫХ ЭКОТОПАХ

У сосны обыкновенной описаны две внутривидовые формы по окраске микростробилов – *Pinus sylvestris* L. f. (var.) *sulfuranthera* Kozubow – желтопыльниковая и *Pinus sylvestris* L. f. (var.) *erythranthera* Sanio – краснопыльниковая, но процент их участия в составе популяций в различных регионах не одинаков [9]. Установлено, что в микростробилах краснопыльниковой формы содержится значительное количество антоциана [4], наличие которого у растений имеет приспособительное значение в условиях экстремальных температур. Действительно, доля краснопыльниковой формы в сосновых древостоях повышается с нарастанием континентальности климата, а также в условиях интразонального пессимума, связанного с ухудшением температурных условий местообитания, особенно в северных и бо-

лотных экотопах [6, 11, 12]. Показано, что желтопыльниковая и краснопыльниковая формы сосны различаются по эмбриологическим, морфологическим, и селекционным признакам, а также по устойчивости к неблагоприятным факторам среды [1, 2, 8]. Однако кариологический полиморфизм и количественные характеристики генома этих форм сосны, отражающие особенности их адаптации в различных условиях произрастания, не изучались. В настоящей работе приводятся данные сравнительного исследования желтопыльниковой и краснопыльниковой форм сосны обыкновенной, произрастающих в болотных и суходольных экотопах, по кариологическим признакам – числу хромосом, их морфологии, локализации вторичных перетяжек, а также по содержанию ядерной ДНК.

Материалы и методы

Объекты исследования. Исследования проводились в южно-таежной подзоне Западной Сибири на территории Томской области. Объектами исследования послужили экологически контрастные (в соответствии с температурными и почвенно-гидрологическими условиями среды) типы сосновых лесов: сосняки кустарничково-сфагновые Va класса бонитета (низкие ярымы) на глубоководных олиготрофных болотах («Киргизное», «Цыганово», «Бакчарское», «Инкинский ярым»); сосняки лишайниково-зеленомошные и зеленомошно-брусничные I-II классов бонитета на прилегающих к болотам минеральных суходолах. В исследованных популяциях сосны на олиготрофных болотах участие краснопыльниковой формы составляет в

среднем $29 \pm 3.0\%$, в суходольных популяциях данного вида – $7 \pm 1.1\%$.

Методика кариологического исследования. Для кариологического анализа использовали меристематические ткани кончиков корней. Проростки подвергали предфиксационной обработке 1% р-ром колхицина в течение 4-6 часов, промывали в дистиллированной воде, фиксировали спиртово-уксусной смесью (3:1). Окрашивали проростки 1% р-ром ацетогематоксилина после их предобработки 4% р-ром железоаммонийных квасцов в течение 10-15 мин. Для просмотра использовали «давленные» препараты, приготовленные стандартным способом. Препараты просматривали в проходящем свете под микроскопом Axiostar plus (Carl Zeiss), с использованием

системы формирования изображений AxioVision. Подсчет числа хромосом производился в метафазных клетках. Метафазные пластинки с полным набором хромосом, их хорошим разбросом и сходной степенью спирализации фотографировали в иммерсионной системе (объектив $\times 90$). Для каждой хромосомы определяли: суммарную длину диплоидного набора хромосом (ΣL_a , мкм); абсолютную длину (L_a , мкм); относительную длину (L_r , %), центромерный индекс (I_c , %); локализацию вторичных перетяжек (sc). Классификацию хромосом проводили в соответствии с методикой В.Г. Грифа и Н.Д. Агаповой (1986).

Методика количественного определения ДНК. Количественное определение ДНК проводили на спектрофотометре BioRad Smartspec Plus совместно с НП «Сибирский центр лесной сертификации», г. Красноярск. 1. Выделение ДНК. Образцы хвои в бумажных пакетах сушились в течение 40 часов при 40°C в сушильном шкафу Binder. Для количественного определения содержания ДНК брали 150 мг (0.15 г) измель-

Результаты и обсуждение

В диплоидном наборе как желтопыльничковой, так и краснопыльничковой форм сосны обыкновенной, произрастающих в суходольных и болотных экотопах, имеется 24 хромосомы ($2n = 24$). В отдельных случаях отмечалась миксплоидия – нарушение числа хромосом, при котором в проростках наряду с диплоидными содержатся полиплоидные клетки ($2n = 36$, $2n = 48$). На суходоле встречаемость полиплоидных клеток у желтопыльничковой формы сосны составляет 1.52%, у краснопыльничковой формы – 2.09%. На болоте полиплоидные клетки встречаются у желтопыльничковой формы сосны с частотой 6.02%, у краснопыльничковой – с частотой 2.52%. Очевидно, что отклонения числа хромосом от нормального наиболее распространены у желтопыльничковой формы сосны на болоте, а у краснопыльничковой формы – на суходоле.

Хромосомы сосны измеряли на 22 метафазных пластинках желтопыльничковой формы с суходола, на 29 – краснопыльничковой формы с суходола, на 25 – желтопыльничковой формы с болота, на 19 – краснопыльничковой формы с болота. Для вычисления средних параметров хромосом отбирали 13 пластинок желтопыльничковой формы с суходола, 14 пластинок краснопыльничковой формы с суходола, 15 пластинок желтопыльничковой формы с болота и 10 пластинок краснопыльничковой формы с болота, в соот-

венной хвои, помещали в ступки, гомогенизацию материал проводили жидким азотом, количественно переносили 1.5 мл буфера СТАВ в пробирки Eppendorf, встряхивали на Вортексе. Выделение ДНК проводили по протоколу [7]. 2. Растворение ДНК. Осадок растворяли в 100 мкл деионизированной воды. Пробирки встряхивали на Вортексе и помещали в термошейкер на 40 мин. при 1000 об./мин. при 40°C при периодическом встряхивании на Вортексе (2-3 раза). 3. Количественное определение ДНК. 100 мкл исследуемого раствора с растворенной ДНК помещали в стерильные одноразовые пластиковые кюветы BioRad (пропускная способность от 220 нм до 1100 нм), контролем служила деионизированная вода. Расчет производился по формуле: $S_x = C \cdot 10 / \text{сухой вес навески} / 1000$, где C – полученное значение концентрации ДНК (ОД260/ОД280), 10 – коэффициент пересчета на 1 мл (брали 100 мкл), 1000 – коэффициент пересчета концентрации ДНК из микрограмм в миллиграммы.

ветствии со значениями общей длины исследуемых хромосомных наборов в интервале спирализации $x \pm 1\sigma$. Этот интервал составляет для желтопыльничковой формы с суходола 340-400 мкм, краснопыльничковой формы с суходола – 380-440 мкм, желтопыльничковой и краснопыльничковой форм с болота – 320-380 мкм.

Суммарная длина диплоидного набора хромосом сосны с суходола составляет у желтопыльничковой формы 371.3 ± 4.22 мкм, у краснопыльничковой формы – 402.1 ± 4.49 мкм. На болоте суммарная длина диплоидного набора хромосом сосны составляет у желтопыльничковой формы 342.8 ± 4.71 мкм, у краснопыльничковой формы – 350.4 ± 5.48 мкм. Сравнительный анализ показывает, что суммарная длина хромосом диплоидного набора сосны на суходоле достоверно выше, чем на болоте, что согласуется с проведенными ранее исследованиями [10]. При этом как в суходольной, так и в болотной популяциях суммарная длина хромосом оказалась выше у краснопыльничковой формы, по сравнению с желтопыльничковой.

С помощью метода поликариограммного анализа в суходольной и болотной популяциях как желтопыльничковой, так и краснопыльничковой форм сосны обыкновенной выделяется большая группа, состоящая из 9 пар длинных равноплечих (I-IX) хромосом, индивидуально идентифицируются 3 пары более коротких не-

равноплечих (I-XII) хромосом. Все хромосомы относятся к метацентрическому типу. Морфометрические параметры хромосом желтопыльничковой и краснопыльничковой форм сосны, произрастающих в условиях болота и суходола, приведены в таблице. Достоверные отличия выявлены по абсолютной длине хромосом между

болотной и суходольной популяциями сосны. Краснопыльничковая и желтопыльничковая формы сосны различаются между собой по абсолютной и относительной длинам хромосом как в болотных, так и в суходольных условиях произрастания.

Таблица. Морфометрические параметры хромосом желто- и краснопыльничковой форм сосны обыкновенной на суходоле и на болоте

Номера хромосом	Абсолютная длина		Относительная длина		Центромерный индекс	
	$x \pm m_x$, мкм	CV, %	$x \pm m_x$, %	CV, %	$x \pm m_x$, %	CV, %
Суходол (желтопыльничковая форма)						
I- IX	16.6±0.11	10.6	4.4±0.03	10.2	47.9±0.13	4.0
X	13.4±0.24	9.1	3.6±0.06	8.9	45.2±0.44	4.9
XI	12.3±0.28	11.5	3.3±0.07	11.2	42.3±0.49	5.9
XII	10.7±0.18	8.8	2.9±0.05	8.3	41.4±0.45	5.5
Суходол (краснопыльничковая форма)						
I- IX	17.9±0.12	10.6	4.5±0.03	9.6	47.8±0.12	4.1
X	14.4±0.24	9.0	3.6±0.06	8.3	46.0±0.51	5.8
XI	13.2±0.24	9.7	3.3±0.05	8.5	45.1±0.39	4.6
XII	12.0±0.23	10.0	3.0±0.05	9.7	41.6±0.51	6.4
Болото (желтопыльничковая форма)						
I- IX	15.3±0.09	10.2	4.4±0.02	8.9	48.0±0.11	3.7
X	12.6±0.21	9.0	3.7±0.05	7.0	47.0±0.33	3.8
XI	11.7±0.24	11.4	3.4±0.07	11.2	43.5±0.47	5.9
XII	9.8±0.16	9.0	2.9±0.04	8.3	41.6±0.42	5.6
Болото (краснопыльничковая форма)						
I- IX	15.6±0.12	10.8	4.5±0.03	9.6	48.1±0.12	3.3
X	12.7±0.26	9.1	3.6±0.05	6.4	45.8±0.39	3.8
XI	11.8±0.27	10.2	3.4±0.07	8.8	43.2±0.60	6.3
XII	10.1±0.23	10.1	2.9±0.06	9.3	41.9±0.49	5.2

При идентификации отдельных пар хромосом в качестве дополнительных маркеров использовались вторичные перетяжки, в зоне которых локализованы ядрышковые организаторы. В суходольных условиях произрастания у желтопыльничковой формы выявляется по одной перетяжке с локализацией $sc = 45.9 \pm 1.28\%$, $sc = 56.4 \pm 0.72\%$, $sc = 64.7 \pm 0.74\%$ на длинных плечах, соответственно, II, III, IV пар хромосом, у краснопыльничковой формы – по одной перетяжке с локализацией $sc = 35.3 \pm 0.81\%$, $sc = 44.0 \pm 2.08\%$, $sc = 56.2 \pm 0.53\%$, $sc = 62.8 \pm 0.57\%$ на длинных плечах, соответственно, I, II, III, IV пар хромосом. В болотных условиях произрастания у желтопыльничковой формы отмечается наличие одной вторичной перетяжки с локализацией $sc = 35.5 \pm 2.49\%$, $sc = 57.5 \pm 0.37\%$, $sc = 62.9 \pm 0.55\%$ на длинных плечах, соответственно, I, III, IV пар хромосом, а также наличие двух перетяжек с локализацией $sc = 56.7 \pm 1.74\%$ на длинном пле-

че и $sc = 62.5 \pm 1.52\%$ на коротком плече V пары хромосом. У краснопыльничковой формы на болоте выявляется по одной перетяжке с локализацией $sc = 32.9 \pm 2.04\%$, $sc = 57.5 \pm 0.48\%$, $sc = 63.7 \pm 0.54\%$ на длинных плечах, соответственно, I, III, IV пар хромосом, а также две перетяжки с локализацией $sc = 72.9 \pm 2.08\%$ на длинном плече и $63.6 \pm 1.33\%$ на коротком плече V пары хромосом.

Следовательно, общее число вторичных перетяжек в хромосомах деревьев, произрастающих в болотном экотопе, выше по сравнению с суходольным. При этом локализация вторичных перетяжек в соответствующих парах хромосом желтопыльничковой и краснопыльничковой форм сосны в большинстве случаев совпадает. Однако были выявлены и некоторые различия. Так, в суходольном экотопе I пара хромосом краснопыльничковой формы сосны содержит вторичную перетяжку, а желтопыльничковой –

перетяжек не имеет. V пара хромосом сосны, содержащая в болотном экотопе две вторичные перетяжки, характеризуется их одинаковой локализацией у желтопыльниковой и краснопыльниковой форм на коротком плече и различной – на длинном плече. Ранее было показано, что наличие в кариотипе хромосом с «дополнительными» перетяжками, диагностирующее структурные перестройки ядрышковых организаторов типа инверсий или транслокаций, свойственно различным видам хвойных, произрастающим в болотных экотопах [Седельникова и др., 2010].

Сравнительный анализ содержания ядерной ДНК у 32 деревьев сосны обыкновенной в двух болотных экотопах показал, что тренд к увеличению ее количества наблюдается у краснопыльниковой формы по сравнению с желтопыльниковой. Так, концентрация ДНК на болоте «Бакчарское» у желтопыльниковой формы составляет 13.0 ± 0.10 мг/г абсолютно сухого вещества (а.с.в.), у краснопыльниковой – 13.2 ± 0.14 мг/г а.с.в., на болоте «Инкинский рям» – 13.4 ± 0.10 мг/г а.с.в. и 13.5 ± 0.17 мг/г а.с.в., соответственно. Внутрипопуляционная изменчивость содержания ядерной ДНК у краснопыльниковой формы по сравнению с желтопыльниковой также имеет тенденцию к возрастанию. Коэффициент вариации (CV) концентрации ДНК на болоте «Бакчарское» у желтопыльниковой формы составляет 2.2%, у краснопыльниковой – 3.1%, на болоте «Инкинский рям» – 2.0% и 3.5%, соответственно. Опубликованы свидетельства того, что незаметные, на первый взгляд, изменения ДНК у растений в неблагоприятных условиях произрастания могут быть результатом перестройки отдельных генов, обуславливающих

появление новых резистентных фенотипов [5].

Таким образом, проведенное исследование показало, что желтопыльниковая и краснопыльниковая формы сосны имеют ряд различий, проявляющихся как в болотных, так и в суходольных условиях произрастания. Нарушение числа хромосом (миксоплоидия) наиболее характерно для желтопыльниковой формы сосны на болоте и для краснопыльниковой формы на суходоле. В болотных и суходольных экотопах краснопыльниковая форма сосны обыкновенной отличается от желтопыльниковой большими размерами хромосом (суммарной длины диплоидного набора, абсолютной длины, относительной длины). Возможно, такая дифференциация связана с различиями данных форм по количеству ядерной ДНК – краснопыльниковая форма отличается большими значениями ее концентрации и более высокой внутривидовой изменчивостью по сравнению с желтопыльниковой. Общее число вторичных перетяжек, в зоне которых расположены ядрышковые организаторы, в хромосомах деревьев, произрастающих в болотных условиях, выше по сравнению с суходольными. Различия между желтопыльниковой и краснопыльниковой формами сосны на суходоле и на болоте проявляются в специфичности локализации вторичных перетяжек в I и V парах хромосом. Очевидно, что желтопыльниковая и краснопыльниковая формы сосны обыкновенной являются фенотипически и генетически дифференцированными компонентами внутривидового разнообразия, обладающими различным адаптивным преимуществом в гидротермически контрастных болотных и суходольных экотопах.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 30 «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 69.

Литература

1. Бабушкина Л.Г., Зуева Г.В., Анисеев Д.Р. Изменчивость окраски микростробилов сосны обыкновенной в условиях промышленного загрязнения // Лесоведение. – 1997. – №4. – С. 80–85.
2. Божок А.А. Внутривидовая изменчивость сосны обыкновенной в различных экологических условиях Львовской области: автореф. дис... канд. с.-х.н.: 06.03.01; Латвийский НИИ лесохозяйственных проблем. – Рига, 1979. – 16 с.
3. Гриф В.Г., Агапова Н.Д. К методике описания кариотипов растений // Ботан. журн. – 1983. – Т. 71, № 4. – С. 550–553.
4. Козубов Г.М. О краснопыльниковой форме сосны обыкновенной // Ботан. журн. – 1962. – № 2. – С. 276–280.
5. Кунах В.А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений // Молекулярная и прикладная генетика. – 2011. – Т. 12. – С. 7–14.
6. Новикова Т.Н. Сибирские климатипы сосны в географических культурах Западного Забайкалья: дифференциация по росту и цвету микростробилов // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. XXX, № 1-2. – С. 140–144.

7. Падутов В.Е., Баранов О.Ю., Воропаев Е.В. Методы молекулярно-генетического анализа. – Мн.: Юнипол, 2007. – 176 с.
8. Пименов А.В., Седельникова Т.С., Ефремов С.П. Морфология и качество пыльцы желто- и краснопыльничковой форм *Pinus sylvestris* в болотных и сухоходольных условиях произрастания (Томская область) // Ботанический журнал. – 2011. – Т. 96, № 3. – С. 367–376.
9. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. – М.: Наука, 1964. – 190 с.
10. Седельникова Т.С., Муратова Е.Н. Генеративные органы и кариотип сосны обыкновенной на олиготрофных болотах Западной Сибири // Лесоведение. – 1991. – № 3. – С. 34–43.
11. Седельникова Т.С., Пименов А.В., Ефремов С.П. Морфология пыльцы сосны обыкновенной на болотах и суходолах // Лесоведение. – 2004. – № 6. – С. 1–5.
12. Черепнин В.Л. Изменчивость семян сосны обыкновенной. – Новосибирск: Наука, 1980. – 183 с.

SEDEL'NIKOVA T.S., PIMENOV A.V.

Sukachev Institute of Forest SB RAS

Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru

KARYOLOGICAL INVESTIGATION AND ANALYSIS OF DNA CONTENT OF RED-AND YELLOW-COLORED MALE CONES FORMS OF SCOTS PINE IN BOG AND DRY VALLEYS ECOTOPES

Aims. The comparative study of red- and yellow-colored male cones forms of Scots pine growing in bog and dry valleys ecotopes by karyological parameters and DNA content was conducted. **Methods.** The follow chromosomal parameters were determined: absolute length of chromosomes, total length of the diploid complement of chromosomes, relative length of chromosomes, centromeric index, localization of secondary constriction. Evaluation of DNA content was carried out in spectrophotometer BioRad Smartspec Plus by the standard technique (Padutov et al., 2007). **Results.** Red- and yellow-colored male cones forms of Scots pine have differences in length of chromosomes, localization of secondary constrictions, and DNA content both in bog and dry valleys ecotopes. **Conclusions.** Red- and yellow-colored male cones forms of Scots pine are components of intraspecific diversity, possessing different adaptive advantages in bog and dry valleys ecotopes.

Key words: *Pinus sylvestris*, intraspecific forms, karyotype, DNA content.

СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В., ЕФРЕМОВА Т.Т.

Федеральное 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

ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ У СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭДАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Исследование процессов мутагенеза в популяциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), произрастающих в условиях эдафической экстремальности, представляет актуальность для выявления закономерностей адаптации, полиморфизма и эволюции вида, а также может использоваться в качестве одного из методов биоиндикации экологической обстановки. Спектр и частота встречаемости структурных перестроек хромосом и патологий митоза являются одними из наиболее чувствительных критериев цитогенетического мониторинга состояния насаждений хвойных [3]. Хромосомные нарушения и аномалии митоза изучались в популяциях сосны обыкновенной, произрастающих в

неблагоприятных эдафических условиях на меловых субстратах Центрального Черноземья, на почвах, испытывающих влияние сильной засухи на фоне возрастающей аридизации и континентальности климата в Южном Забайкалье, Центральной Тыве и Хакасии, а также на почвах, подвергающихся комплексному техногенному загрязнению промышленными отходами на Южном Урале и в Алтайском крае [5, 6, 7, 9, 10]. В настоящем сообщении представлены результаты изучения хромосомных нарушений и патологий митоза в популяциях сосны обыкновенной в условиях эдафической экстремальности сухо-степного и болотного экотопов.

Материалы и методы

Семенной материал для исследований был собран в искусственных посадках сосны обыкновенной, созданных за пределами ее ареала в условиях сухой степи юга России (окрестности г. Калач-на-Дону, Волгоградская область), а также в естественной популяции и лесокультурном насаждении, произрастающих на евтрофном осушенном болоте «Большое Жуковское» в Западной Сибири (Томский р-н, Томская область). Изученные насаждения сосны обыкновенной произрастают в экстремальных условиях, связанных с недостаточным увлажнением и бедностью песчаных почв сухостепного экотопа и почвенным гидроморфизмом болотного местобитания.

Для анализа хромосомных мутаций ис-

Результаты и обсуждение

Результаты исследования хромосомных нарушений в семенном потомстве деревьев, произрастающих в искусственных посадках в условиях сухой степи, приведены в табл. 1. Общая частота встречаемости нарушений составляет 14.4%. Хотя большая часть метафазных клеток в проростках сосны из сухой степи содержит нормальное число хромосом ($2n = 24$), в потомстве двух растений отмечена миксоплоидия ($2n = 24, 36$; $2n = 24, 48$). Наиболее часто в метафазе митоза встречались хромосомные нарушения, представляющие собой кольцевые структуры различного размера и морфологии, часть из которых выявлялась одновременно с фрагментами.

Таблица 1. Спектр хромосомных и геномных мутаций в кариотипе сосны обыкновенной в экстремальных условиях сухой степи юга России

Тип нарушений	Число клеток с нарушениями, шт.	Встречаемость клеток с нарушениями, %
Кольцевые хромосомы с фрагментами или без фрагментов	10	6.9
Надетые кольцевые хромосомы	1	0.7
Ацентрические кольца	1	0.7
Отдельные фрагменты	4	2.7
Дицентрические хромосомы	3	2.0
Полиплоидные клетки	2	1.4

Анализ метафазных клеток семенного потомства деревьев, произрастающих на евтрофном осушенном болоте, показал, что в отдельных проростках с дерева № 2 из естественной популяции наблюдалась миксоплоидия ($2n = 24, 36$; $2n = 24, 48$). Результаты изучения патологий митоза на стадии ана-телофазы в семенном по-

пользовали меристематические ткани кончиков корней. Приготовление препаратов осуществляли по общепринятой методике. Семена проращивали в чашках Петри. Для исследования метафазных нарушений проростки обрабатывали 1% р-ром колхицина в течение 4-6 часов. После промывания проростки фиксировали спиртовом-уксусной смесью (3:1). Аномалии митоза изучали на стадии ана-телофазы без предобработки колхицином. Окрашивание проростков осуществляли 1% р-ром железоацетогематоксилина. Для просмотра использовали «давленные» препараты, приготовленные стандартным способом. Препараты просматривали под микроскопом (окуляр $\times 10$, объектив $\times 90$).

Известно, что возникновение кольцевых хромосом связано с делециями обоих плеч хромосомы с образованием среднего фрагмента с двумя «липкими» концами и двух концевых фрагментов. Концевые фрагменты объединяются, а средний замыкается в кольцо. Наличие отдельных фрагментов диагностирует «свежий» разрыв в хромосоме. Мутационная форма «надетости» кольца на палочковидную хромосому наблюдается при соматическом кроссинговере. В некоторых случаях в клетках изученных деревьев отмечались асимметричные транслокации хромосом с образованием дицентриков.

томстве модельных деревьев в естественной популяции сосны обыкновенной, переживших резкую смену режима почвенного увлажнения в результате осушительной мелиорации, а также у особей в искусственном насаждении, созданном после осушения, представлены в табл. 2. Установлено, что в потомстве деревьев в естествен-

ной популяции частота встречаемости клеток с аномалиями митоза составляет в среднем $31.2 \pm 7.43\%$, в искусственном насаждении – $15.7 \pm 3.93\%$. Возможно, что перенесенный стресс, свя-

занный с влиянием осушения и изменением эдафических условий произрастания древостоев, привел к увеличению встречаемости патологических митозов в семенном потомстве.

Таблица 2. Встречаемость и спектр ана-телофазных нарушений в семенном потомстве модельных деревьев сосны обыкновенной на евтрофном осушенном болоте

Показатели		Искусственное насаждение			Естественная популяция		
		модель 1	модель 2	модель 3	модель 1	модель 2	модель 3
Число изученных корневых меристем, шт.		40	40	40	40	40	9
Число корневых меристем с нарушениями, шт./%		17 / 42.5	18 / 45.0	23 / 57.0	26 / 65.0	22 / 55.0	8 / 88.9
Число изученных клеток, шт.		301	310	213	244	189	32
Число клеток с нарушениями, шт./%		34 / 11.3	42 / 13.5	47 / 22.4	78 / 32.0	34 / 18.0	14 / 43.7
Типы ана-телофазных нарушений, шт./%	Один или несколько фрагментов	2 / 0.7	2 / 0.6	2 / 0.9	3 / 1.2	-	-
	Многополюсный митоз	2 / 0.7	2 / 0.6	6 / 2.8	6 / 2.4	1 / 0.5	-
	Мост одиночный	4 / 1.3	-	2 / 0.9	2 / 0.8	4 / 2.1	1 / 3.1
	Мост парный	-	2 / 0.6	1 / 0.5	1 / 0.4	2 / 1.1	1 / 3.1
	С-митоз	1 / 0.2	-	-	1 / 0.4	-	-
	Забегающие хромосомы	5 / 1.7	8 / 2.6	8 / 3.8	8 / 3.2	8 / 4.3	2 / 6.2
	Отстающие хромосомы	-	1 / 0.3	1 / 0.5	5 / 2.0	1 / 0.5	-
	Выбросы за пределы пластинки	4 / 1.3	4 / 1.2	1 / 0.5	14 / 5.7	7 / 3.7	4 / 12.5
	Неправильное расхождение хромосом	10 / 3.4	20 / 6.4	25 / 12.0	34 / 13.9	9 / 4.8	6 / 18.7
	Агглютинация хромосом	4 / 1.3	-	-	-	-	-
	Остаточное ядрышко	-	2 / 0.6	1 / 0.5	-	1 / 0.5	-
	Комплексные нарушения	2 / 0.7	2 / 0.6	-	5 / 2.0	1 / 0.5	-

В ана-телофазных клетках исследованных корневых меристем представлен широкий спектр нарушений – мосты, фрагменты, неправильное расхождение хромосом, их забегание, отставание, выбросы за пределы пластинки. При этом часть нарушений встречается в комплексе. Кроме того, в клетках нескольких проростков семян одного из деревьев в искусственном насаждении зафиксированы аномалии "жесткого типа" – агглютинация хромосом и С-митоз. Как правило, эти летальные для клеток нарушения наблюдаются у семенного потомства в насаждениях, находящихся в условиях химического и радиационного загрязнения среды [13].

Выявленные у сосны митотические нарушения можно дифференцировать на две группы. Первая включает одиночные и парные мосты, представляющие собой дицентрические хромосомы, появление которых диагностирует асимметричную транслокацию. Вторая группа, включающая неправильное расхождение хромосом, многополюсный митоз, выбросы хромосом за пределы пластинки, отстающие и забегающие хромосомы, индицирует аномалии центрального участка или нарушения функции сократительных белков веретена деления [1]. В клетках деревьев, произрастающих на евтрофном осушенном болоте, преобладают аномалии митоза,

характерные для второй группы. Известно, что расхождение неодиногового числа хромосом нередко приводит к миксоплоидии, рассматриваемой как один из важных факторов эволюции древесных растений, который способствует реализации их адаптивных возможностей и повышению жизнеспособности [2].

Считается, что у сосны обыкновенной, произрастающей в типичных экотопах, встречаемость патологических митозов не должна превышать 5% [4]. Интересно, что в экстремальных эдафических условиях на меловом субстрате в Воронежской области частота встречаемости нарушений в потомстве сосны соответствует этому уровню [5]. У сосны обыкновенной, произрастающей на техногенных отвалах золотодобывающей промышленности в Красноярском крае, встречаемость хромосомных нарушений существенно выше – 9.5% [11]. Высокие значения встречаемости хромосомных мутаций отмечаются в зоне Чернобыльской АЭС – до 8% и в загрязненных районах г. Воронежа – до 17% [4, 8]. У сосны обыкновенной, произрастающей в условиях дефицита почвенной влаги в островных борах Тывы уровень аномальных митозов достигает 18%, в ленточ-

ных борах степных районов Алтайского края – 51% [6, 10]. В Челябинской области в условиях комплексного промышленного загрязнения воздуха и почвы уровень хромосомных нарушений соответствует 17-20% [7, 12]. Очевидно, что данные, приведенные в литературных источниках, в целом согласуются с полученными нами результатами и свидетельствуют о том, что у сосны обыкновенной в условиях эдафической экстремальности встречаемость метафазных и ана-телофазных хромосомных нарушений повышается.

Таким образом, данные по частоте встречаемости и спектру хромосомных нарушений и аномалий митоза в семенном потомстве деревьев сосны обыкновенной, произрастающих в сухой степи и на евтрофном осушенном болоте, расширяют и дополняют имеющиеся в научной литературе сведения о цитогенетических механизмах адаптации вида к экстремальным эдафическим условиям. Эти данные могут быть использованы в лесокультурной практике, а также при разработке селекционных и мелиоративных мероприятий в сухостепных и гидроморфных экотопах.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 30 «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 69.

Литература

1. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. – М. 1972. – 263 с.
2. Буторина А.К. Факторы эволюции кариотипов древесных // Успехи соврем. биол. – 1989. – Т. 108, Вып. 3 (6). – С. 342–357.
3. Буторина А.К., Калаев В.Н. Анализ чувствительности различных критериев цитогенетического мониторинга // Экология. – 2000. – № 3. – С. 206–210.
4. Буторина А.К., Калаев В.Н., Миронов А.Н., Смородинова В.А., Мазурова И.Э., Дорошев С.А., Сенькевич Е.В. Цитогенетическая изменчивость в популяциях сосны обыкновенной // Экология. – 2001. – № 3. – С. 216–220.
5. Буторина А.К., Мозгалина И.Г. Особенности цитогенетических показателей сосны меловой и сосны обыкновенной // Экология. – 2004. – № 3. – С. 185–189.
6. Егоркина Г.И. Цитогенетические параметры сосны обыкновенной в Алтайском крае // Лесоведение. – 2010. – № 6. – С. 39–45.
7. Калашник Н.А. Хромосомные нарушения как индикатор оценки степени техногенного воздействия на хвойные насаждения // Экология. – 2008. – № 4. – С. 276–286.
8. Кальченко В.А., Федотов И.С. Генетические эффекты острого и хронического воздействия ионизирующих излучений на *Pinus sylvestris* L., произрастающих в зоне отчуждения Чернобыльской АЭС // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 4. – С. 437–447.
9. Машкина О.С., Тихонова И.В., Муратова Е.Н., Мурая Л.С. Цитогенетические особенности семенного потомства карликовых сосен на юге Восточной Сибири // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. XXX, № 1-2. – С. 127–135.
10. Муратова Е.Н., Сунцов А.В. Особенности кариотипа и хромосомные aberrации // Сосна обыкновенная в Южной Сибири. – Красноярск: кн. изд-во, 1988. – С. 37–74.
11. Седельникова Т.С., Пименов А.В., Муратова Е.Н. Хромосомные аномалии у хвойных в экстремальных экотопах // «Фактори експериментальної еволюції організмів»: зб. наук. пр., присвяч. 120-річчю від дня народж. Л.М. Делоне. – К.: Логос, 2011. – Т. 10. – С. 138–142.

12. Шафикова Л.М., Калашник Н.А. Характеристика кариотипа сосны обыкновенной при промышленном загрязнении // Лесоведение. – 2000. – № 2. – С. 30–36.
13. Butorina A.K., Evstratov N. The first detected case of amitosis in pine // Forest genetics. – 1996. – Vol. 3, №. 3. – P. 137–139.

SEDEL'NIKOVA T.S., PIMENOV A.V., EFREMOVA T.T.

Sukachev Institute of Forest SB RAS

Russia, 660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/28, e-mail: tss@ksc.krasn.ru

CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN SCOTS PINE FROM EXTREME EDAPHIC CONDITIONS

Aims. The investigation of occurrence of chromosomal abnormalities in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees growing in extreme edaphic conditions of dry step and bog ecotopes was carried out. **Methods.** The frequency and the spectrum of chromosomal abnormalities in metaphase and ana-telophase cells of Scots pine were determined. **Results.** The results obtained were: the seed progeny of trees growing in extreme edaphic conditions (low moisture, low soil fertility, high humidity) are characterized by high level of chromosomal mutations. **Conclusions.** The data concerning chromosomal abnormalities in seed progeny of Scots pine growing in dry step and bog ecotopes extend and expand available information about cytogenetic mechanisms of adaptation of species to extreme edaphic conditions. These data can be used in silvicultural practices, and when developing breeding and meliorative measures.

Key words: *Pinus sylvestris*, extreme edaphic conditions, chromosomal abnormalities.

СОКОЛОВСЬКА-СЕРГІЄНКО О.Г.

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: monitor@ifrg.kiev.ua

ВПЛИВ РІЗНИХ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ АСИМІЛЯЦІЇ CO₂, АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА ПРОДУКТИВНІСТЬ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Різні сорти культурних рослин, навіть такі, що належать до одного виду, різняться за рівнем стійкості до несприятливих чинників навколишнього середовища, в тому числі і нестачі мінерального живлення. Серед культурних рослин пшениця за своєю харчовою цінністю та екологічною пластичністю є неперевершеною і становить основу продовольчого раціону людства [1, 2]. Питанням стійкості цієї культури до дії різноманітних стресових чинників присвячено багато досліджень, але вплив умов мінерального живлення на захисні механізми фотосинтетичного апарату у зв'язку із генотипними особливостями досліджено значно менше.

Дія стресових чинників як правило супроводжується утворенням у клітинах і органах надмірних кількостей активних форм кисню (АФК), що може призводити до пошкодження макромолекулярних структур і порушення фізіологічних процесів [9]. Захисні системи

клітини реагують на це підвищенням активності антиоксидантних ферментів, щоби якомога повніше елімінувати надлишок АФК. Головними ферментами антиоксидантного захисту фотосинтетичного апарату від АФК є хлоропластні супероксиддисмутаза (СОД) та аскорбатпероксидаза (АПО). У певній кількості АФК утворюються в процесі функціонування фотосинтетичного апарату за нормальних умов і контролюються антиоксидантними системами, але за стресових умов роль антиоксидантних ферментів для виживання клітини суттєво зростає [5, 7].

Метою нашої роботи було дослідити генотипні особливості реакції нових високоінтенсивних сортів озимої пшениці на нестачу мінерального живлення за фізіологічними показниками асиміляційної активності фотосинтетичного апарату та антиоксидантної системи його захисту.

Матеріали і методи

Рослини сортів озимої м'якої пшениці – Фаворитка, Смуглянка і Миронівська 808 – після перезимівлі у природних умовах пересадили на весні у фазі кушіння у вегетаційні посудини на 10 кг ґрунту (по 20 рослин у посудині). Хімічний аналіз ґрунту, взятого для набивання посудин, виявив у ньому такий вихідний вміст макроелементів: азот нітратний – 0,4 мг/кг, азот лужногідролізований – 1,3 мг/100 г, рухомий фосфор за Чиріковим (P₂O₅) – 17,9 мг/100 г, обмінний калій (K₂O) – 6,6 мг/100 г, рН сольовий – 6,1. Рослини вирощували на двох фонах мінерального живлення – високому та низькому. В першому випадку у посудини при набиванні вносили нітроамфоску у розрахунку N80P80K80 мг/кг ґрунту. У фазу виходу в трубку рослини в цих посудинах додатково підживили такою самою кількістю нітроамфоски так, що загальна доза внесених макроелементів становила N160P160K160 мг/кг ґрунту. У посудини із низьким фоном мінерального живлення при набиванні вносили нітроамфоску у розрахунку N32P32K32 мг/кг ґрунту і додатково не підживлювали. Таким чином, доза внесених добрив на низькому фоні мінерального живлення була у 5 разів меншою за високий фон. Посудини розміщували на стелажі вегетаційного майданчика за природного освітлення, вологість ґрунту підтримували на рівні 60-70 % ПВ.

У фазу молочної стиглості визначали інтенсивність вуглекислотного газообміну прапорцевих листків та активність антиоксидантних ферментів хлоропластів. В кінці вегетації визначали складові зернової продуктивності головного пагона (маса зерна з колоса, кількість зерен у колосі, маса 1000 зерен, Кгосп).

Інтенсивність фотосинтезу реєстрували за контрольованих умов на установці, змонтованій

Результати та обговорення

Рослини нових високоінтенсивних сортів озимої пшениці Фаворитка і Смуглянка за інтенсивністю фотосинтезу прапорцевих листків перевищували сорт Миронівська 808 за вирощування як на високому, так і низькому фоні мінерального живлення (рис. 1). Зниження забезпеченості рослин головними макроелементами призвело до зменшення фотосинтезу в листках рослин сорту Фаворитка на 44, Смуглянка – на 40 і Миронівська 808 – на 47 %.

на базі оптико-акустичного інфрачервоного газоаналізатора ГІАМ-5М, увімкненого за диференційною схемою. Невідокремлені від рослин листки розміщували у термостатованій (+25 оС) камері та освітлювали лампою розжарювання КГ-2000 через водяний фільтр для усунення надлишку інфрачервоної радіації у спектрі її випромінювання. Густина променевого потоку на рівні листка становила 400 Вт/м² ФАР. Розрахунки показників газообміну проводили згідно зі стандартними методиками [3].

Хлоропласти для визначення активності антиоксидантних ферментів виділяли механічним способом за температури 0 – 4 оС. Середню наважку (2 г) прапорцевих листків пшениці гомогенізували в 7-кратному об'ємі буферного розчину такого складу: 0,33 М сорбітол, 5 мМ MgCl₂, 0,1 % БСА, 4 мМ аскорбінова кислота та 50 мМ трис-НСІ (рН 7,5). Гомогенат фільтрували через 2 шари капронової тканини та центрифугували на центрифугі К-24D при 80 г та температурі 0 – 4 оС протягом 5 хв для осадження важких часточок. Надосадову рідину зливали в інші попередньо охолоджені центрифужні пробірки та центрифугували при 2000 g 10 хв для отримання фракції хлоропластів. Осад хлоропластів ресуспендували в ізотонічному середовищі з 4 мМ аскорбінової кислоти, 50 мМ трис-НСІ (рН 7,5) об'ємом 2 мл і в подальшому використовували для визначення активності СОД та АПО.

Активність СОД визначали спектрофотометрично за допомогою нітротетразолієвого блакитного при довжині хвилі 560 нм [8]. Активність АПО вимірювали в ультрафіолетовій області спектра при 290 нм за методом Чена й Асади [6]. Вміст хлорофілу в суспензії хлоропластів визначали за методом Арнона [4].

На високому фоні мінерального живлення активність хлоропластних СОД і АПО прапорцевих листків у сортів Фаворитка і Смуглянка була вищою, ніж у Миронівської 808 (рис. 2, 3). Нестача елементів мінерального живлення призвела до збільшення активності антиоксидантних ферментів, але високоінтенсивні сорти все одно перевищували за цим показником сорт старої селекції.

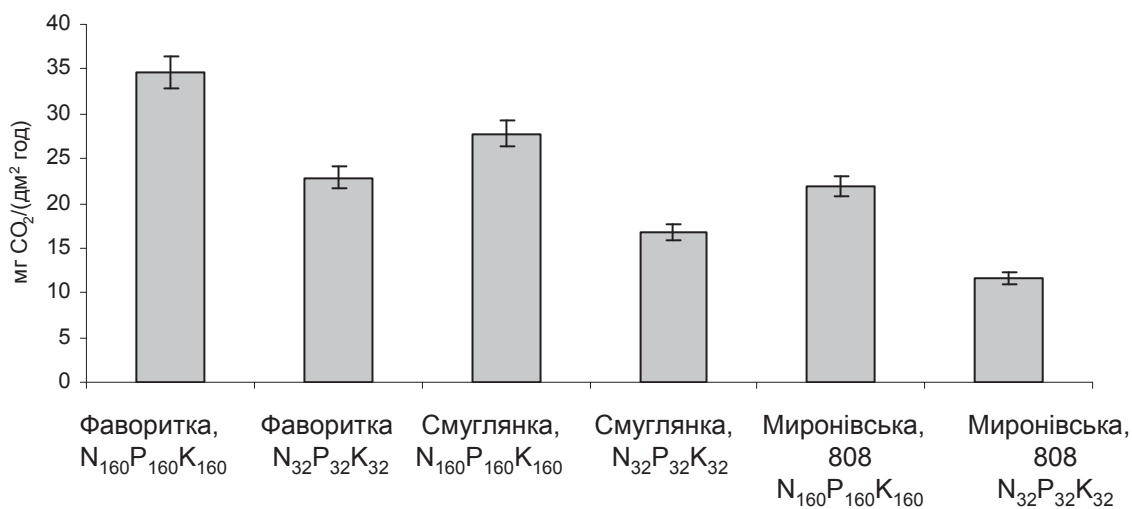


Рис. 1. Інтенсивність фотосинтезу прапорцевих листків озимої пшениці у фазу молочної стиглості за різних умов мінерального живлення

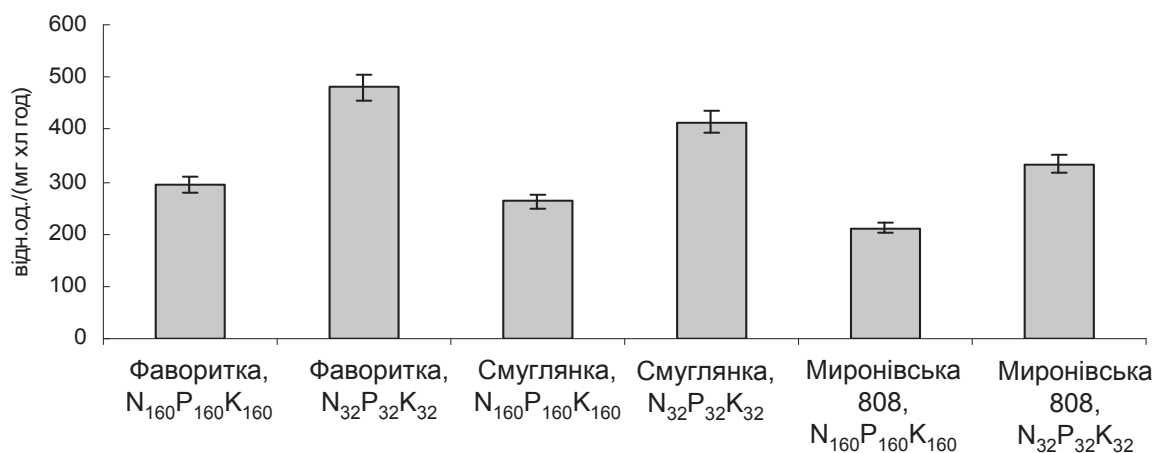


Рис. 2. Активність супероксиддисмутази хлоропластів прапорцевих листків озимої пшениці у фазу молочної стиглості за різних умов мінерального живлення

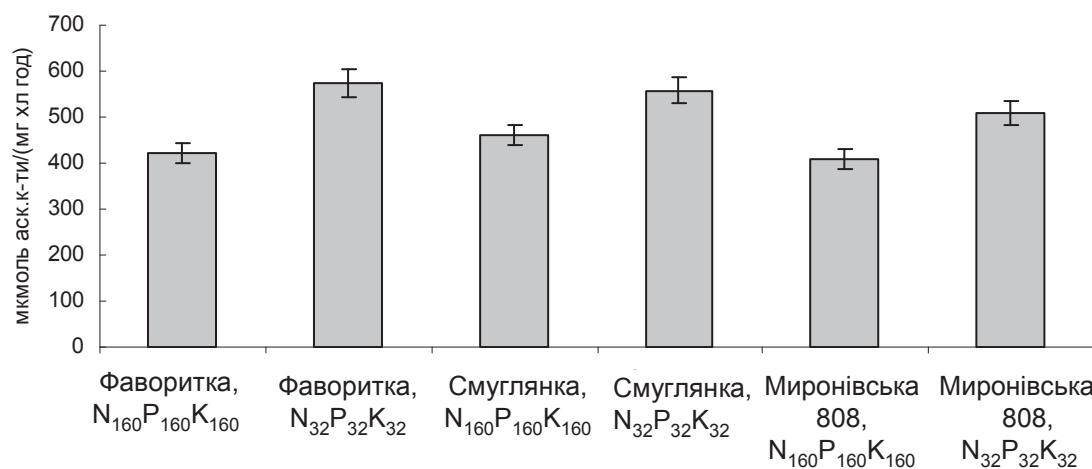


Рис. 3. Вплив різних умов мінерального живлення на активність аскорбатпероксидази хлоропластів прапорцевих листків озимої пшениці

Можна припустити, що при низькому рівні мінерального живлення порушується спряженість функціонування у хлоропластах електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ) та циклу Кальвіна. Це супроводжується утворенням надлишкових кількостей АФК порівняно із нормальними умовами і відповідним підвищенням активності ферментів антиоксидантного захисту. Нестача азоту і фосфору може гальмувати роботу циклу Кальвіна, особливо за змінних світлових і температурних умов навколишнього середовища, за яких перебували дослідні рослини (у вегетаційному досліді контролювалися лише умови мінерального живлення та

водозабезпеченість рослин). Це призводить до надвідновлення компонентів ЕТЛ, що супроводжується передачею електронів на кисень та утворенням супероксидного аніон-радикалу й інших АФК [10]

Зернова продуктивність головного пагона рослин сортів Фаворитка і Смуглянка на високому фоні мінерального живлення практично не різнилась, а у Миронівської 808 була суттєво меншою (табл.). На низькому фоні мінерального живлення зернова продуктивність всіх досліджених сортів зменшилась на 40-50 %, але сучасні сорти зберегли свою перевагу над сортом старої селекції і за цих умов.

Таблиця. Зернова продуктивність головного пагона рослин озимої пшениці різних сортів, вирощених на високому і низькому фоні мінерального живлення

Сорт, варіант	Маса зерна з колоса, г	Маса 1000 зерен, г	Кількість зерен у колосі, шт.	K _{госп}
Смуглянка, N ₁₆₀ P ₁₆₀ K ₁₆₀	1,64±0,07	45,0±1,9	37±2	0,54
Смуглянка, N ₃₂ P ₃₂ K ₃₂	0,85±0,03	37,3±1,8	23±1	0,43
Фаворитка, N ₁₆₀ P ₁₆₀ K ₁₆₀	1,57±0,06	45,8±2,3	34±2	0,53
Фаворитка, N ₃₂ P ₃₂ K ₃₂	0,98±0,04	34,1±1,6	29±1	0,46
Миронівська 808, N ₁₆₀ P ₁₆₀ K ₁₆₀	1,22±0,04	39,7±1,8	31±1	0,46
Миронівська 808, N ₃₂ P ₃₂ K ₃₂	0,76±0,03	31,5±1,3	24±1	0,41

Падіння зернової продуктивності відбулося як внаслідок зменшення озерненості колоса, так і зниження маси зернин. Це свідчить про нестачу в рослинному організмі асимілятив для забезпечення розвитку квіток та зав'язей, а також росту зернівок і наповнення їх ендосперму запасними речовинами. Причиною цієї нестачі, без сумніву, є пригнічення розвитку та

активності фотосинтетичного апарату. Але можна припустити, що вища активність антиоксидантних ферментів хлоропластів у сортів Фаворитка і Смуглянка порівняно із Миронівською 808 сприяє підтриманню інтенсивності фотосинтезу на вищому рівні не тільки за умов оптимального забезпечення елементами мінерального живлення, а й за їх нестачі.

Висновки

За умов нестачі мінерального живлення знижується інтенсивність фотосинтезу прапорцевих листків озимої пшениці і підвищується активність антиоксидантних ферментів хлоропластів, що можна розглядати як компонент захисної реакції рослин на дію негативного чинника. Нові високоінтенсивні сорти пшениці Фа-

воритка і Смуглянка характеризувались вищою активністю асиміляції CO₂, антиоксидантних ферментів і більшою зерновою продуктивністю за умов як оптимального так і зниженого фону мінерального живлення, ніж сорт Миронівська 808.

Література

1. Моргун В.В., Киризий Д.А. Перспективи та сучасні стратегії поліпшення фізіологічних ознак пшениці для підвищення продуктивності // Физиология и биохимия культ. растений. – 2012. – Т. 44, № 6. – С.
2. Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культ. растений. - 2010. – Т. 42, № 5. – С. 371-392.
3. Фотосинтез и биопроductивность: методы определения / Под ред. Мокроносова А.Т., Ковалева А.Г. – М.: Агропромиздат, 1989. – 460 с.

4. Arnon D.I. Copper enzyme in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* // Plant. Physiol. – 1949. – Vol. 24, № 1. – P. 1–15.
5. Asada K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions // Plant Physiol. – 2006 – Vol. 141, № 2. – P. 391–396.
6. Chen G.-X., Asada K. Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their and molecular properties // Plant Cell Physiol. – 1989. – Vol. 30, № 7. – P. 987–998.
7. Foyer C.H., Noctor G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling // New Phytol. – 2000. – Vol. 146. – P. 359–388.
8. Giannopolitis C.N., Ries S.K. Superoxide dismutase. Occurrence in higher plants // Plant Physiol. – 1977. – Vol. 59, № 2. – P. 309–314.
9. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 48. – P. 909–930.
10. Huang Z.A., Jiang D.A., Yang Y. et al. Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants // Photosynthetica. – 2004. – Vol. 42, № 3. – P. 357–364.
11. Maathuis F.J.M. Physiological functions of mineral macronutrients // Current Opinion in Plant Biology. – 2009. – Vol. 12. – P. 250–258.

SOKOLOVSKA-SERGIENKO O.G.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasilkivska str. 31/17, e-mail: monitor@ifrg.kiev.ua*

EFFECT OF MINERAL NUTRITION ON THE CO₂ ASSIMILATION RATE, ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND PRODUCTIVITY OF WINTER WHEAT VARIETIES

Aims. To explore peculiarities of response of new high-yielding winter wheat varieties on mineral nutrition deficit by parameters of activities of photosynthetic apparatus and antioxidant enzymes of chloroplast.

Methods. In the phase of milk ripeness, the chlorophyll content, the CO₂ exchange rate and activity of chloroplast antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX), in flag leaves of winter wheat varieties grown on two levels of mineral nutrition – N₁₆₀P₁₆₀K₁₆₀ and N₃₂P₃₂K₃₂ mg per kg of soil were determined. **Results.** It is shown that under mineral nutrition deficiency the photosynthesis rate in leaves of winter wheat has decreased and activity of SOD and APX has increased. This may be considered as a protective component of plant response to adverse factors. **Conclusions.** New high-yielding wheat Favorytka and Smuhlyanka are characterized by higher activity of CO₂ assimilation, and antioxidant enzymes as well as higher grain productivity under both optimal and low levels of mineral nutrition than old variety Myronivska 808.

Key words: *Triticum aestivum* L., varieties, photosynthesis, antioxidant enzymes, mineral nutrition

СТРАШНЮК В.Ю., ШАЛАМОВ Ю.А.

*Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна
Україна, 61045, Харків, пл. Свободи, 4, e-mail: vladimir.strashnyuk@mail.ru*

ПУФОВАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ У *DROSOPHILA MELANOGASTER* В СВЯЗИ С РАЗЛИЧИЯМИ ПО СТЕПЕНИ ПОЛИТЕНИИ И УСЛОВИЯМИ ТЕМПЕРАТУРЫ

Политенные хромосомы возникают в результате последовательных циклов эндоредупликации каждой из хромосом диплоидного набора и функционируют как интерфазные хромосомы [1]. Они представляют собой удобную модель для визуального изучения генной активности, пространственной и структурной организации генома. Степень политениии – показатель количества элементарных нитей ДНК – отражает репликативную активность хромосом и является одним из показателей уровня метаболизма [2].

Конформационные преобразования хромосомных дисков в пuffy – участки наиболее активного синтеза РНК – является характерным проявлением транскрипционной активности генов [3]. Размеры пuffy коррелируют с уровнем транскрипции, что демонстрируют данные радиоавтографии [4].

Данные о соотношении суммарной транскрипции и степени умножения генома при соматической полиплоидии весьма противоречивы. Мало что известно об изменениях уровня транс-

крипции в высокополитенных клетках [2]. Влияние на пуфовую активность температурных условий, как одного из важнейших экологических факторов для пойкилотермных организмов, также мало изучено.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили инбредные линии *D. melanogaster* Oregon-R (Or), Canton-S (C-S) и гибрид F1 Or × C-S. Степень инбридинга в линиях составляла 58–70 поколений. Культуры дрозофилы развивались на стандартной сахарно-дрожжевой среде в условиях термостатирования. Объем питательной среды в каждом стаканчике составлял 5,0 мл. Исследования проводили в трех вариантах температур: 24 оС (контроль), 17 °С и 28 оС.

Политенные хромосомы исследовали на

Результаты и обсуждение

Установлено, что относительные размеры пуфов зависят от степени политенции хромосом, о чем свидетельствуют приведенные микрофотографии (рис. 1). Отношение пуф/диск в хромосомах со степенью политенции 512С и 2048С в линии Oregon-R (рис. 2) различается для разных пуфов, в среднем, на 19,4–41,3 % ($p < 0,05–0,001$). Результаты исследования согласуются с данными о значительных колебаниях размеров пуфов у дрозофилы в пределах одной железы [6], что авторы объясняют периодическим характером функционирования хромосомных локусов.

Результаты исследования свидетельствуют о существовании механизма компенсации различий в степени умножения генома на уровне транскрипции, что может быть обусловлено регулирующей по типу отрицательной обратной связи.

На пуфовую активность политенных хромосом существенное влияние оказывают температурные условия, в которых развиваются личинки. На рис. 3 представлены микрофотографии, демонстрирующие зависимость пуфовой активности от температуры. Исследования проведены на хромосомах со степенью политенции 1024С. При низкой температуре (17 °С) размеры пуфов заметно меньше, чем в контроле (24 °С), а при 28 °С они увеличиваются.

На рис. 4 приведены данные, демонстрирующие эту зависимость у инбредных линий

Целью работы было исследование пуфовой активности политенных хромосом в клетках слюнных желез *Drosophila melanogaster* Meig. в связи с варьирующей степенью политенции и температурными условиями развития.

давленных ацетоорсеиновых препаратах слюнных желез. Исследования проводили на стадии 0-часовой предкуколки. Различия по степени политенции хромосом (СПХ) оценивали цитоморфометрическим методом [5]. Пуфовую активность оценивали по размерам пуфов, определяемых с помощью окуляр-микрометра при увеличении ×800. Размеры пуфов соотносили с поперечными размерами хромосом в районе близлежащего диска, не вовлеченного в процесс пуфирования (отношение пуф/диск).

Oregon-R, Canton-S и гибрида F1 Or × C-S. В контроле существенных генотипических различий по размерам пуфов не наблюдали. Однако они были заметны в неоптимальных температурных условиях (17 °С и 28 °С). Главным образом, это было связано с повышенной чувствительностью к температурному фактору линии Oregon-R. В среднем, изменения размеров пуфов в диапазоне температур 17–28 оС составили, в зависимости от генотипа, 6,1–48,3 % ($p < 0,05–0,001$).

Зависимые от температуры изменения пуфовой активности противоположны изменениям СПХ, которая снижается с увеличением температуры. Как было показано ранее [7], в диапазоне температур 18–28 °С степень умножения генома в слюнных железах 0-часовых предкуколок уменьшается, в зависимости от генотипа, на 12,9–39,4 %. Эти изменения сопряжены с сокращением длительности предимагинального развития примерно в 2,5 р. Модификации степени умножения генома в разных температурных условиях, по-видимому, представляют собой компенсационный механизм, посредством которого достигается необходимый уровень синтеза РНК в ядре при изменении скорости биохимических процессов. Таким образом, показано участие эндоредупликации в механизме температурных адаптаций у дрозофилы.

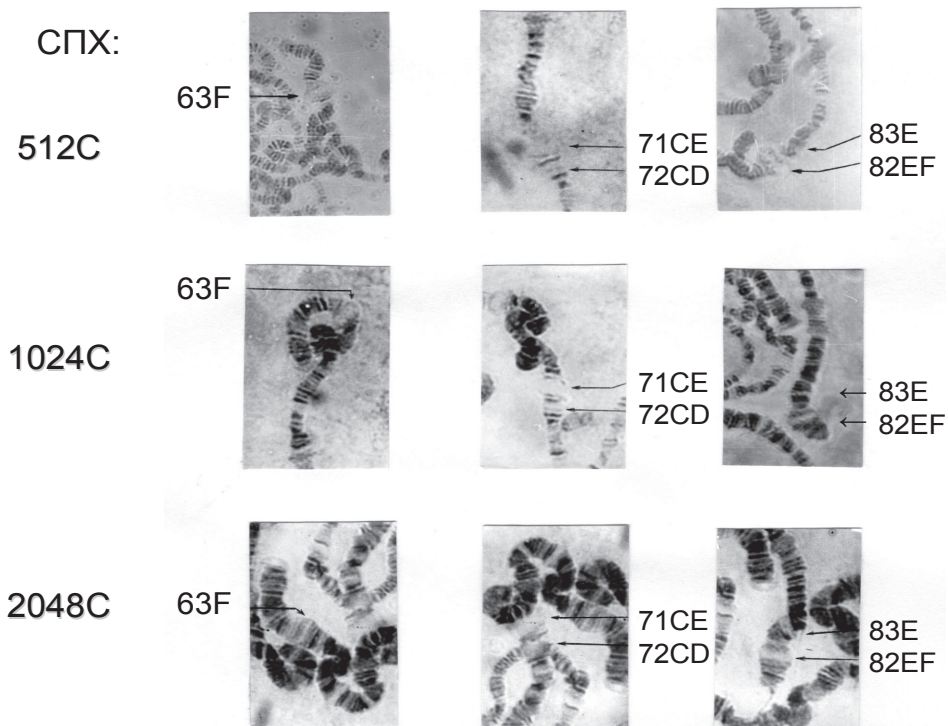


Рис 1. Размеры пuffed политенных хромосом в линии *Oregon-R D. melanogaster* на стадии 0-часовой предкуколки при разной степени политении: окрашивание ацетоорсеином, увеличение $\times 400$

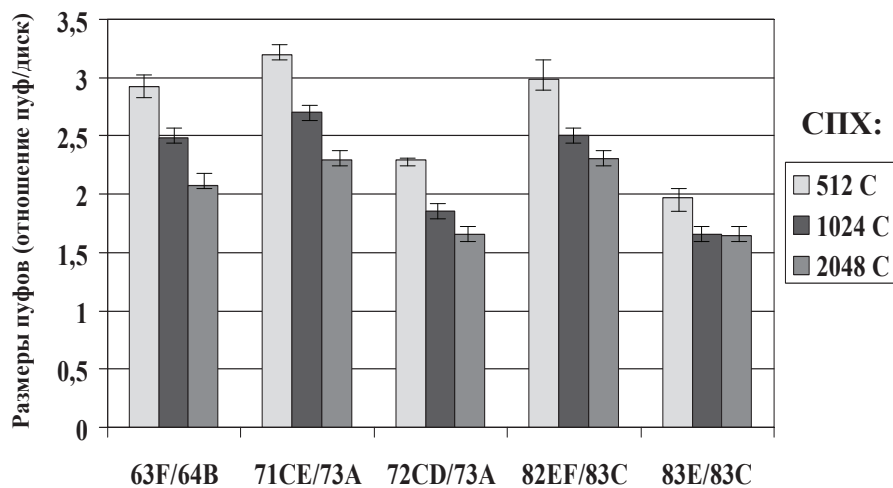


Рис. 2. Размеры пuffed в зависимости от степени политении хромосом на стадии 0-часовой предкуколки в линии *Oregon-R D. melanogaster*

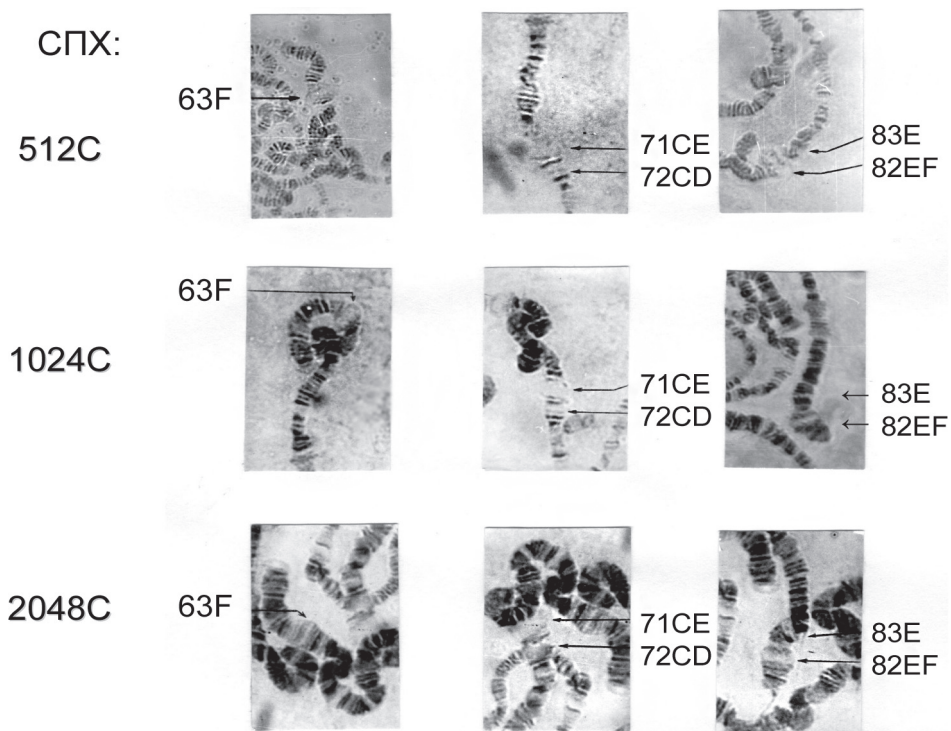


Рис. 3. Размеры пухов политенных хромосом у 0-часовых предкуколок дрозофилы в зависимости от температурных условий: окрашивание ацеорсеином, увеличение $\times 400$

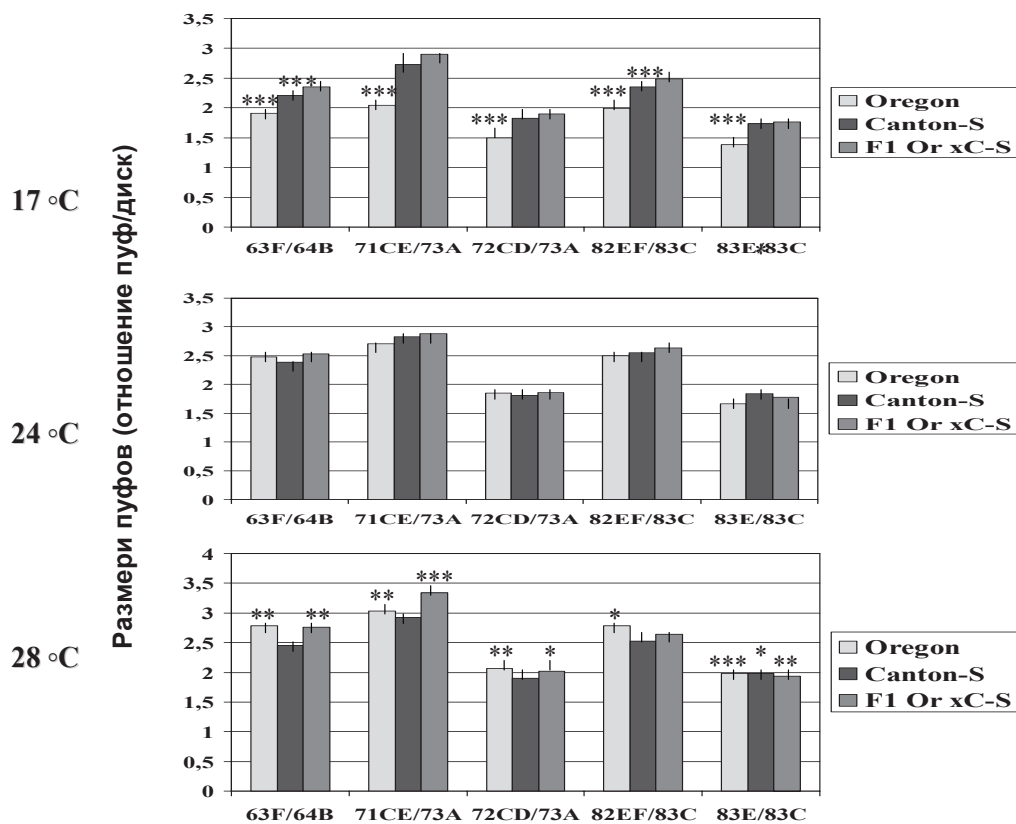


Рис. 4. Размеры пухов политенных хромосом у 0-часовых предкуколок у инбредных линий и гибридов дрозофилы в зависимости от температурных условий: отличия от контроля (24 °C) * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Выводы

Относительные размеры пухов находятся в обратной зависимости от степени политенности хромосом в слюнных железах дрозофилы. В диапазоне температур 17–28 °С размеры поздних экдизоновых пухов у 0-часовых предкуколок дрозофилы возрастают, в среднем, на 6,1–48,3 %.

Полученные данные демонстрируют наличие отрицательной корреляции между степенью умножения генома и пуховой активностью политенных хромосом дрозофилы в связи с варьирующей степенью политенности и температурными условиями развития.

Литература

1. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., Semeshin V.F. et al. Polytene chromosomes: 70 years in genetic research // *Int. Rev. Cytol.* – 2004. – Vol. 241. – P. 203–275.
2. Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка. – М. Наука, 1981. – 260 с.
3. Жимулёв И.Ф. Хромомерная организация политенных хромосом. – Новосибирск: ВО «Наука». Сибирская издательская фирма, 1994. – 565 с.
4. Pelling G. Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labelled with tritium // *Nature.* – 1959. – Vol. 184. – P. 655–656.
5. Страшнюк В. Ю., Непейвода С. Н., Шахбазов В. Г. Цитоморфометрическое исследование политенных хромосом *Drosophila melanogaster* Meig. в связи с эффектом гетерозиса, отбором по адаптивно важным признакам и полом. // *Генетика.* – 1995. – Т. 31, № 1. – С.24–29.
6. Беляева Е.С., Жимулев И.Ф. О вариабельности размеров пухов у *Drosophila melanogaster* // *Генетика.* – 1974. – Т.10, №5. С. 74–80.
7. Страшнюк В.Ю., Аль-Хамед С., Непейвода С.Н., Шахбазов В.Г. Цитогенетическое и цитобиофизическое исследование механизмов температурных адаптаций и эффекта гетерозиса у *Drosophila melanogaster* Meig. // *Генетика.* – 1997. – Т. 33, № 6. – С. 793–799.

STRASHNYUK V.Yu., SHALAMOV Yu.A.

V. N. Karazin National University of Kharkiv

Ukraine, 61022, Kharkiv, Svoboda sq. 2, e-mail: vladimir.strashnyuk@mail.ru

PUFFING ACTIVITY IN POLYTENE CHROMOSOMES OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN RELATION TO DIFFERENCES IN POLYTENY LEVEL AND TEMPERATURE CONDITIONS

Aims. The purpose of investigation was to study the puffing activity in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes in relation to variable polyteny level and temperature conditions. **Methods.** The polytene chromosomes were examined on squash aceto-orcein salivary gland preparations. Polyteny level of chromosomes and puff dimensions were defined by cytomorphometric method. **Results.** The relative puff dimensions in polytene chromosomes of 0-hour prepupae were found to correlate negatively with polyteny level of chromosomes. The late ecdysone puffs grew in size in temperature interval 17–28 °С in average by 6,1–48,3 per cent. **Conclusions.** The obtained data demonstrate the negative correlation between the genome amplification and puffing activity in relation to variable polyteny level and temperature conditions.

Key words: *Drosophila melanogaster*, puffing activity, polyteny level, temperature.

ТАШИРЕВ А.Б., ГЛАДКА Г.В., РОМАНОВСКАЯ В.А.

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К.Заболотного НАН Украины

Украина, Д 03670, Киев, ул. Заболотного, 154, e-mail: victoriaroman@ukr.net

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ И СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ АНТАРКТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ

Холод является наиболее распространенным стрессом среди природных экстремальных условий на нашей планете. Так, в 90% массы океанов Земли температура 5°С и ниже. В наземных экосистемах Аляски (85%), России

(55%), Канады (55%) и большей части Антарктиды низкие температуры сохраняются длительный период. Ранее нами из наземных экосистем Западной Антарктики и прилегающих к ней островов Аргентинского архипелага выделены

аэробные хемоорганотрофные микроорганизмы [2, 4]. Учитывая экстремальные условия Антарктики (низкую температуру, высокий уровень солнечной радиации и повышенную минерализацию в прибрежных экосистемах региона), мы

Материалы и методы

Объектами исследования служили аэробные хемоорганотрофные микроорганизмы, изолированные ранее при 1–5°C [2] и при 30°C [4] из различных экосистем Антарктики (почва, фитоценозы, биоплёнки обрастания на скалах). Для культивирования бактерий использовали среду Nutrient Agar фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. и глюкозо-картофельную агаризованную среду. Дрожжи выращивали на солодовом агаризованном сусле. Влияние экстремальных факторов на выживаемость микроорганизмов изучали

Результаты и обсуждение

У 55 изолятов, доминирующих в фитоценозах и орнитогенной почве Антарктики, изучены психро- и галотолерантность и определены доминирующие морфовиды на основании морфолого-культуральных признаков. Для изучения резистентности к УФ радиации из них отобрано 16 штаммов бактерий, которые представляли все выявленные морфовиды (роды *Cryobacterium*, *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Halomonas*, *Psychrobacter*), и 9 штаммов дрожжей с характерной пигментацией колоний (угольно-чёрные, красные, молочно-белые).

Влияние УФ радиации. Наличие озоновой «дыры» в Антарктике обуславливает высокий уровень солнечного излучения в регионе. Поэтому мы предположили, что антарктические микроорганизмы должны быть устойчивы к УФ. Действительно, практически все микроорганизмы, изолированные из фитоценозов и почв Антарктики, были резистентны к УФ (рис. 1 и 2). Для большинства бактерий пороговая доза УФ составляла 40–60 Дж/м², для дрожжей – 80–120 Дж/м². Это важный показатель резистентности к УФ, т.к. чем больше пороговая доза облучения (то есть доза, до которой повреждения ДНК могут полностью репарироваться), тем, соответственно, выше способность бактерий к выживанию в экстремальных условиях повышенного УФ излучения.

Летальные дозы УФ для грамотрицательных и грамположительных бактерий различались незначительно (табл.). Наиболее устойчивы к УФ штаммы *Micrococcus* sp. 3194 и 3398, *Methylobacterium* sp. 3294, 3392 и *Cryobacterium* sp. 3179, у которых ЛД_{99,99} составляла 210–360

предположили, что микроорганизмы данного региона должны быть резистентны к этим факторам, что и определило цель наших исследований, а также необходимость рассмотреть стратегию их выживания в экстремальных условиях.

у 55 штаммов, которые доминировали в исследованных природных образцах. Устойчивость к ультрафиолетовому излучению определяли как описано в работе [3]. Для количественной оценки данного показателя вычисляли пороговую дозу УФ радиации, которая является мерой способности клеток к репарации повреждений ДНК, а также летальные дозы УФ (ЛД₉₀ и ЛД_{99,99}). Психро- и галотолерантность микроорганизмов определяли общепринятыми методами в диапазоне 1–40°C и 0.1–200 г NaCl/л, соответственно.

Дж/м² (рис. 1). Пигментированные штаммы дрожжей (чёрные и красные) были высоко резистентны к УФ (ЛД_{99,99} составляла 600–1200 Дж/м²), в то время, как для белых дрожжей ЛД_{99,99} – 250 Дж/м² (рис. 2). Видимо, пигменты минимизировали клеточные повреждения у дрожжей при УФ облучении. Уровень устойчивости микроорганизмов к УФ сохранился после пяти лет их хранения в лабораторных условиях (при периодических пересевах четыре раза в год), что свидетельствует о генетической стабильности данного признака. Психро- и галотолерантность. Эти признаки изучены у 55 штаммов (40 бактерий и 15 дрожжей). В таблице представлена часть из них (25 штаммов), но они отражают весь спектр морфовидов антарктических изолятов. Показано, что все исследованные антарктические бактерии и дрожжи способны расти при низкой температуре (1°C или 5°C). Среди них выявлены психрофилы, для которых оптимальная температура роста (Т_{opt}) не превышает 15°C, а максимальная – не выше 20°C; а также психротолерантные микроорганизмы, для которых Т_{opt} роста выше 15°C, а максимальная – превышает 20°C. Среди изученных нами антарктических бактерий 70% были психротолерантными, 30% – психрофильными. Все исследованные штаммы антарктических дрожжей были психротолерантными, хотя они способны расти при крайне низких температурах (1–5°C). Чтобы оценить микробную активность в природных условиях Антарктики, мы рассчитали долю (часть) штаммов, которые могут расти при разных температурах в диапазоне 1–40°C. Оказалось, что в диапазоне 1–5°C росло до 80% бак-

терий и 60% дрожжей. Все психротолерантные штаммы росли, как при 1–5°C, так и при 25–30°C. Следовательно, антарктические штаммы способны расти как в температурном диапазоне,

характерном для Антарктики (1–10°C), так и в короткий летний период, когда температура достигает 20°C и выше.

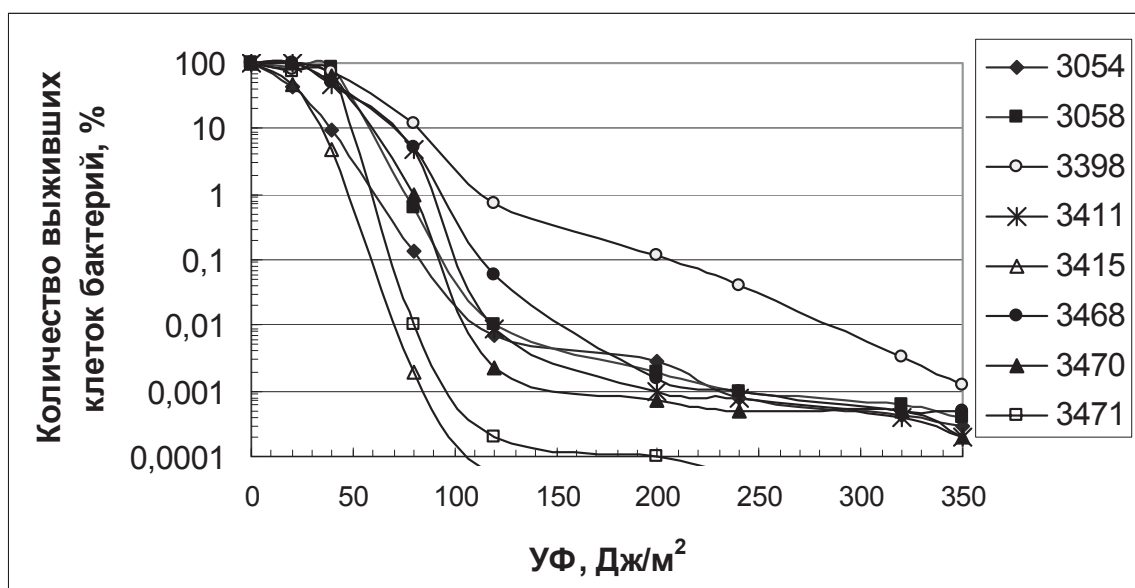


Рис. 1. Дозовые кривые выживаемости антарктических бактерий после УФ облучения. Обозначения на рисунке соответствуют номерам штаммов. 3054, 3058, 3411 – *Corynebacterium* sp.; 3398 – *Micrococcus* sp.; 3415 – *Halomonas* sp.; 3468 – *Psychrobacter* sp.; 3470 и 3471 – *Cryobacterium* sp.

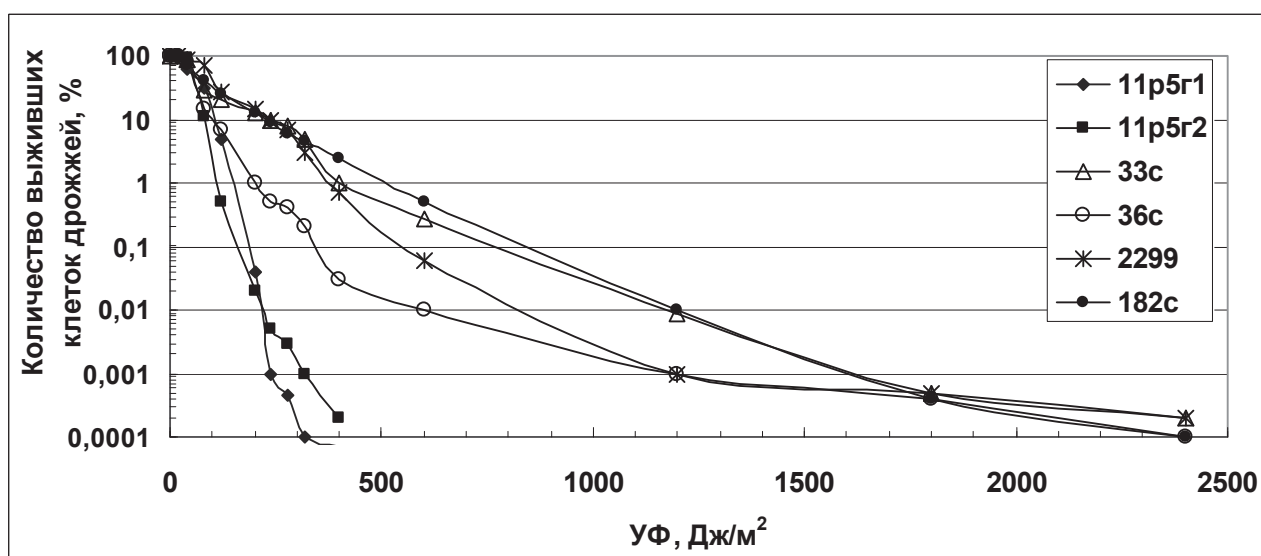


Рис. 2. Дозовые кривые выживаемости антарктических дрожжей после УФ облучения. Обозначения на рисунке соответствуют номерам штаммов: 11p5g1, 11p5g2 (белые); 33c, 182c (красные); 36c, 2299 – *Exophiala nigra* (чёрные)

Проведенные нами эксперименты показали, что более половины антарктических бактерий были умеренно галофильными (растут в среде, содержащей 2.5–15% NaCl). Наиболее устойчивыми к NaCl были отдельные представители *Halomonas* sp. и *Cryobacterium* sp. (рост при 15% и 10% NaCl, соответственно) (табл.). Все исследованные антарктические дрожжи росли в

диапазоне 0–10% NaCl в среде, некоторые – в диапазоне 0–15% NaCl (табл.). Можно предположить, что формирование наземных микроценозов в Антарктике находится под влиянием мирового океана, т.к. в прибрежной зоне континента и на островах во время регулярных штормов происходит постоянное орошение наземных ценозов морской водой с высокой минерализацией.

Таблица. Экофизиологические особенности микроорганизмов, изолированных из наземных экосистем Антарктики

№ штам-мА	Изолирован из экосистемы	Род или морфотип (пигментация)	Летальные дозы УФ, Дж/м ²		Растут в диапазоне	
			ЛД ₉₀	ЛД _{99,99}	NaCl, %	T, °C
Грамотрицательные бактерии						
3088	Почва чёрная	<i>Psychrobacter</i> sp.	50	75	0–0.1	1–30
3468	Почва с мхом	<i>Psychrobacter</i> sp.	60	120	0–0.1	1–30
3469	Зелёный мох	<i>Psychrobacter</i> sp.	80	160	0–0.1	1–30
3294	¹ Чёрный лишайник	<i>Methylobacterium</i> sp.	80	210	0–2.5	1–30
3392	Почва каменистая	<i>Methylobacterium</i> sp.	100	310	0–2.5	5–30
3189	¹ Чёрный лишайник	<i>Halomonas</i> sp.	50	200	0–15	5–30
3415	Зелёный мох	<i>Halomonas</i> sp.	50	70	0–5	1–30
Грамположительные бактерии						
3179	¹ Чёрный лишайник	<i>Cryobacterium</i> sp.	85	320	0–10	1–30
3275	² Трава	<i>Cryobacterium</i> sp.	50	200	0–5	1–20
3471	Почва со мхом	<i>Cryobacterium</i> sp.	60	80	0–2.5	1–20
3470	Зелёный мох	<i>Cryobacterium</i> sp.	60	110	0–0.1	1–20
3054	Биоплёнка на скале	<i>Corynebacterium</i> sp.	80	170	0–2.5	1–20
3058	Биоплёнка на скале	<i>Corynebacterium</i> sp.	65	110	0–2.5	1–30
3411	² Трава	<i>Corynebacterium</i> sp.	80	120	0–2.5	1–30
3194	¹ Чёрный лишайник	<i>Micrococcus</i> sp.	105	360	0–7.5	5–30
3398	Биоплёнка на скале	<i>Micrococcus</i> sp.	70	270	0–5	1–30
Дрожжи						
36с	Почва на скале	³ угольно-чёрные	140	600	0–15	5–30
237	Почва глинистая	³ угольно-чёрные	170	650	0–15	5–30
2299	Почва	³ угольно-чёрные	200	800	0–15	5–30
14с	Лишайник	красные	150	1100	0–10	1–37
33с	Почва под мхом	красные	280	1200	0–10	1–37
48с	Почва под мхом	красные	180	900	0–10	1–37
182с	¹ Чёрный лишайник	красные	250	1200	0–15	1–37
11р.1	Тёмно-зелёный мох	белые	100	240	0–10	1–30
11р.2	Тёмно-зелёный мох	белые	100	250	0–10	1–30

Примечания: ^{1,2}Изолированы из экосистем: ¹чёрные лишайники на вертикальных скалах (клифах), ²трава *Decshampcia antarctica*. ³Угольно-чёрные дрожжи – *Exophiala nigra*.

Стратегия выживания микроорганизмов в экстремальных условиях Антарктики, в частности при высоком уровне солнечного излучения, может обеспечиваться несколькими способами: (1) механизмами, которые минимизируют клеточные повреждения; (2) системами репарации, которые устраняют повреждения ДНК. Минимизация повреждений может происходить за счёт пигментов (меланинов и каротиноидов). Известно, что эти пигменты являются эффективными антиоксидантами, которые обезвреживают токсичные формы кислорода, образующиеся при различных видах радиации. Так, например, пигментированные дрожжи были более устойчивы к УФ, чем белые (табл.). У бактерий такая зависимость не выявлена:

высокую устойчивость к УФ проявили как непигментированные штаммы *Micrococcus* sp., так и оранжевые штаммы *Cryobacterium* sp. или розовые штаммы *Methylobacterium* sp. (табл.). Видимо, при отсутствии пигментов бактерии реализовали другие системы защиты.

Для устранения повреждений ДНК, которые возникают при различных типах радиации, в том числе и при солнечном коротковолновом УФ излучении, наиболее важным является наличие у клеток эффективных систем репарации повреждений ДНК. Такое направление стратегии выживания используют экстремально радиорезистентные бактерии (например, *Deinococcus radiodurans*) [5]. Как нами показано, антарктические бактерии и дрожжи характери-

зуются высокими пороговыми дозами УФ, а чем больше пороговая доза УФ, тем выше способность бактерий к репарации. Анализ дозовых кривых выживаемости антарктических штаммов после УФ облучения (рис. 2) показал, что их резистентность к УФ, вероятно, обусловлена наличием активных систем репарации ДНК.

Психрофилия микроорганизмов обеспечивается сложными метаболическими системами, в частности особенностями их ферментных белков и мембранных липидов. Увеличение у последних содержания ненасыщенных жирных кислот позволяет мембранам находиться в функционально активном жидкостно-кристаллическом состоянии при низких температурах. Способность к психрофилии определяется также синтезом в клетках значительного количества ключевых ферментов, что позволяет клетке активно функционировать даже при низкой температу-

ре [1].

Мы считаем маловероятным, что такие метаболически сложные механизмы, как УФ-резистентность и психротолерантность микроорганизмов, могли сформироваться как адаптивная реакция на действие абиотических стрессовых факторов, характерных для Антарктики. Особенно, если принять во внимание аэрозольный, орнитогенный и антропогенный трансконтинентальный перенос микрофлоры в экосистемы Антарктики. Видимо, в условиях низких температур и высокого уровня УФ радиации преимущество для выживания в Антарктике получили микроорганизмы, которые изначально были способны расти при низкой температуре (1–5°C), и которые имели эффективные механизмы репарации клеточных повреждений (в частности, повреждений ДНК), и/или пигменты (каротиноиды и меланины).

Выводы

Стратегия выживания микроорганизмов в экстремальных условиях Антарктики направлена на природную селекцию микроорганизмов, которые изначально были устойчивы к высокому уровню УФ радиации, а также на естественный отбор психрофильных/психротолерантных бак-

терий и дрожжей. Представленные данные позволяют предположить, что первопричиной формирования и эволюции микробных сообществ в Антарктике послужили низкая температура, высокий уровень УФ, а также географическая изоляция островов.

Литература

1. Ермилова Е.В. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. – Санкт-Петербург: Изд. С.-Петербургского ун-та, 2007. – 299 с.
2. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Гладка Г.В. Распространение психрофильных микроорганизмов в наземных биотопах Антарктики // Микробиол. журнал. – 2012. – Т. 74, №1. – С. 3–8.
3. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Черная Н.А., Рокитко П.В., Левишко А.С. Устойчивость к УФ радиации антарктических микроорганизмов // Микробиол. журнал. – 2011. – Т. 73, № 3. – С. 3-8
4. Таширев А.Б., Романовская В.А., Рокитко П.В., Шилин С.О., Черная Н.А., Таширева А.А. Микробиологический анализ наземных биотопов Антарктики // Микробиол. журнал. – 2010. – Т. 72, № 2. – С. 4-11
5. Daly M.J., Minton K.W. Resistance to radiation // Science. – 1995. – Vol. 270, № 24. – P. 1318.

TASHYREV A., GLADKA G., ROMANOVSKAYA V.

*Institute of Microbiology and Virology of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine
Ukraine, D 03680, Kyiv, Zabolotny str., 154 e-mail: victoriaroman@ukr.net*

EVOLUTIONARY ECOLOGY and STRATEGY of SURVIVAL of ANTARCTIC MICROORGANISMS in EXTREME CONDITIONS

Aims. Microorganisms live in ecosystems of Antarctic in extreme conditions: low temperature, a high level of a solar radiation and the raised mineralization in coastal regions. In this connection ecophysiological properties of the bacteria isolated from soils, biofilms on rocks and phytocenosis of Antarctic have been studied. **Methods.** The aerobic microorganisms isolated earlier at 1–5°C and 30°C from various ecosystems of Antarctic have been studied. Resistance to UV radiation, psychro- and halotolerance have been defined by standard methods. **Results.** It is shown that Antarctic bacteria are presented: (1) psychrophilic and psychrotolerant bacteria (grow in a range 1–20°C or 1–30°C); (2) moderate halophiles (*Halomonas* sp. and *Cryobacterium* sp.), resistant to 10–15% NaCl; (3) UV-resistant bacteria. Strains *Micrococcus* sp. 3194, 3398, *Methylobacterium* sp. 3294, 3392 and *Cryobacterium* sp. 3179 were most resistant to UV (LD_{99,99} compounded 210–360 J/m²). It is not revealed psychrophilic yeast from the same ecosystems, but all were psy-

chro- and halotolerant (grew in a range 1-30°C and 10-15% NaCl). Pigmented strains of yeast (black and red) were highly resistant to UV ($LD_{99,99}$ compounded 600-1200 J/m²), while for white yeast $LD_{99,99} = 250$ J/m². **Conclusions.** Strategy of a survival of microorganisms in Antarctic is directed on natural selection and sampling of microorganisms which initially were psychrotolerant and UV-resistant. If to take into consideration aerosol, ornithogenic and anthropogenic transfer of a microflora to Antarctic, the presented data allows to assume that the low temperature, high level UV, and also geographical isolation of islands are the primary cause for formation and evolution of microbial communities in Antarctic.

Key words: strategy of survival, antarctic bacteria/yeast, resistance to UV, psychrotolerance, halotolerance, evolution.

FOMINA M.O.

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho St. 154, e-mail: mfomina55@gmail.com

PHYLOGENETIC FINGERPRINTING OF MICROBIAL COMMUNITIES IN METAL POLLUTED SOILS USING RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS (RISA)

Introduction

Soils constantly act as a sink for many hazardous contaminants and maintaining soil fertility and health is a big challenge. Hence, protecting the diversity of microbial communities is an important part of soil conservation. Microbial communities are among the most important soil components playing a key role in, e.g. nutrient cycling, plant symbioses, decomposition, metal and mineral transformations, and other critical ecosystem processes. In particular, fungi are known to play fundamental biogeochemical roles in most terrestrial ecosystems and many can survive and grow under extreme conditions, and are capable of utilizing a large range of simple and complex organic substrates [1]. However, fungi have frequently been ignored or neglected in biodiversity conservation.

In this study, it was attempted to demonstrate the benefits of culture-independent PCR-based fin-

gerprinting technique called ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) in the examination of the effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (pyrene) either alone or in combination with increasing concentrations of copper on fungal communities in soil microcosms.

Ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) is a rapid and powerful tool for characterizing complex microbial communities and for detecting community composition changes in response to environmental disturbance [3]. Shifted RISA bands can be excised, cloned and sequenced to identify the populations involved in any community adaptations. This technique is based on gel separation of gene fragments by length differentiation of the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA in fungi.

Materials and Methods

The microcosms were designed to resemble the PAH and metal contaminated ecosystem by using sandy soil [pH 6.7 & water content 19% (w/w)]. The soil has no previous history of PAH and metal contaminations. Microcosms were prepared by weighing 50 g (dry weight) soil into glass jars (59 mm diameter, 98.5 mm height, Sigma, Germany). A 10 mm hole was made in polypropylene lid and this hole was plugged with a polyurethane foam stopper to allow air flow. Soil guideline of the Ministry of the Environment of the Province of Ontario (MOE) was used to spike soil samples (Pyrene: 250 mg/kg, copper: 300 mg/kg, *see* Table 1). 250 mg of pyrene (Sigma, Germany) was dissolved in analytical grade acetone (BDH, UK) and mixed with 50g of dried

sandy soil thoroughly by shaking vigorously. The soil samples were left for 2 hrs to evaporate acetone. Then cupric phosphate [Cu₃(PO₄)₂] was added to the soil. Water content was maintained at 19% by addition of sterile Milli-Q water as necessary. Microcosms were incubated in dark at 20°C. On Day 21 soil samples were taken for molecular characterization.

For RISA, 0.5 g aliquots of each soil sample were taken from each microcosm vessel in triplicate on day 21 and DNA was extracted by using an Ultra-Clean™ Soil DNA isolation kit (Mo Bio, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. A purification procedure was performed by using a High Pure™ PCR product

clean-up kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions except for the application of elution buffer. The products were eluted in sterile Milli-Q water as the elution buffer supplied may interfere with the PCR and sequencing processes. The fungal intergenic region containing the two ITS and the 5.8S rRNA gene (ITS1-5.8S-

ITS2) was amplified using primer set ITS1f (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Negative controls were included in each reaction to ensure no contamination in experimental materials.

Table 1. Concentrations of pyrene and copper in the microcosm experiment (mg kg⁻¹)

Pollutant	Treatment				
	C Control soil	P ^a Pyrene	Pyrene + Cu ^b		
			(1)	(2)	(3)
Pyrene	-	250	250	250	250
Cu	-	-	300	600	900

^a Soil spiked with pyrene only (250 mg kg⁻¹);

^b Soils spiked with pyrene and cupric phosphate: (1) 300 mg kg⁻¹, (2) 600 mg kg⁻¹ and (3) 900 mg kg⁻¹

To facilitate treatment comparisons within single gels, all PCR products from each treatment were pooled prior to analysis. Electrophoresis was performed with a Bio-Rad Protean II Xi Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 5% nondenaturing polyacrylamide gels were casted for RISA. Twenty microliters of (approximately 400 ng) of each PCR product was mixed with 2x gel loading dye (Bio-Rad) and electrophoresed at 60 V for 12 h at room temperature with 1x-tris acetate EDTA (TAE) buffer along with standard marker Step Ladder, 50 bp (Sigma, St Louis, MO, USA). Gels were stained with SYBR Green I (Sigma-Aldrich) for 30 min, and gel images were taken by using a ProXPRESSTM 2D Proteomic Imaging System (PerkinElmer, Munich, Germany). Individual bands of interest were excised from polyacrylamide gels with a sterile surgical blade under UV. DNA was extracted by using the crush and soak method [2] with slight modification. A small hole was made using a syringe needle in the bottom of a 0.2-ml PCR tube, and the excised gel slices were placed in this tube. The PCR tube was placed into a 1.5-ml tube, and the assembly was centrifuged at 16 110 g for 10 min until the entire gel slices were collected in the lower tube. Then 1 ml of crush and soak solution containing 500 mmol l⁻¹ of NH₄OAc (BDH), 0.1% SDS and 0.1 mmol l⁻¹ EDTA (Sigma-Aldrich) was added to the crushed gel slices and incubated overnight at 37°C with shaking at 150 rpm. After centrifugation for 10 min, the supernatant was recovered avoiding transfer of fragments of acrylamide. One volume of ice-cold molecular grade ethanol (Sigma-Aldrich) and 0.1 volume of 3 mol l⁻¹ NaOAc (pH 5.2)

(BDH) were added to re-precipitate DNA. The resulting pellet was rinsed once with 70% ethanol, dried under vacuum and re-suspended in 20 µl of 1x-tris EDTA (TE) buffer (pH 8.0). The recovered DNA was then stored at -20°C until use.

Each band was re-amplified using the original primer set as described previously and the PCR products were further purified using a High Pure™ PCR product clean-up kit. The re-amplified PCR products were cloned into the pDrive Cloning Vector (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol and sequenced. The sequences obtained from RISA bands were compared to ITS gene sequences in the NCBI GenBank database using the BlastN search option and their closely related sequences were downloaded. The recovered sequences as well as the closest identified relatives were manually imported and aligned in Molecular Evolutionary Genetics Analysis (mega) Software ver. 4.0 using ClustalW. Evolutionary distances were calculated using the method of maximum composite likelihood and phylogenetic trees were generated from the distance matrixes using a neighbour-joining tree-building algorithm. The robustness of inferred tree topologies was evaluated by using the bootstrap test (1000 bootstrap replication) available in MEGA 4.0, and the branching nodes only with bootstrap values of >50% are indicated. The main focus of this study was on RISA band CoPa1 disappearing in the presence of copper contamination. DNA sequences obtained from the clones of this band were submitted to the NCBI database with accession numbers FJ235855 and FJ235856.

Results and Discussion

This study describes a microcosm-based approach performed to examine the effect of pyrene alone and pyrene supplied in combination with insoluble copper phosphate on soil fungal populations. The microcosm was established in the context of PAH-bioremediation because pyrene, a fused tetracyclic aromatic hydrocarbon, is often employed as an indicator for monitoring PAH-contaminated sites. The microcosms were designed to resemble a PAH and metal co-contaminated soil ecosystem because many PAH polluted sites are usually co-contaminated with various metal species. The original soil was artificially contaminated with pyrene (250 mg kg⁻¹) and Cu (≥ 300 mg kg⁻¹) equivalent to the MOE soil guideline limit. It is well known that Cu contamination negatively affects soil microbial biomass and their enzymatic activities and many microorganisms are generally assumed to be sensitive to Cu stress unless they can express some mechanism of resistance. Cu and Cu-containing compounds have been widely applied as bactericides and fungicides in agriculture. It can be assumed that Cu contamination may reduce the metabolic potential of any indigenous PAH-utilizing microbial populations. This could partially explain the reason why biotechnologies for in situ organic pollutant treatment may be seriously limited by the presence of toxic metals. In this study, we have focussed on fungal populations. Fungi offer certain advantages over bacteria for high molecular weight PAH bioremediation in soil habitats because initial attack on high molecular weight PAHs by fungal exoenzymes appears to be more likely than attack by bacterial intracellular enzymes alone. It was hoped that excision and identification of shifted RISA gel bands quantification would provide information about the dominance of particularly competitive fungal species or the elimination of sensitive ones.

The band(s) CoPa1 shifting in the presence of copper in microcosm became the main focus of this study. It was excised from day 21 RISA gels (Fig. 1) for microbial identification. Two clone insets from CoPa1 RISA band were randomly selected for DNA sequencing analysis because the excised DNA may consist of several phylogenetically different sequences even though it shows a single band. In our

case, both replicates of each F-RISA band were identical (Table 2), but comigration of phylogenetically heterogeneous sequences can also occur. The gel band and its putative taxonomic affinities were assigned to at least genus level and the band was identified as *Cryptococcus pseudolongus* which was able to endure pyrene contamination, but was susceptible to copper toxicity.

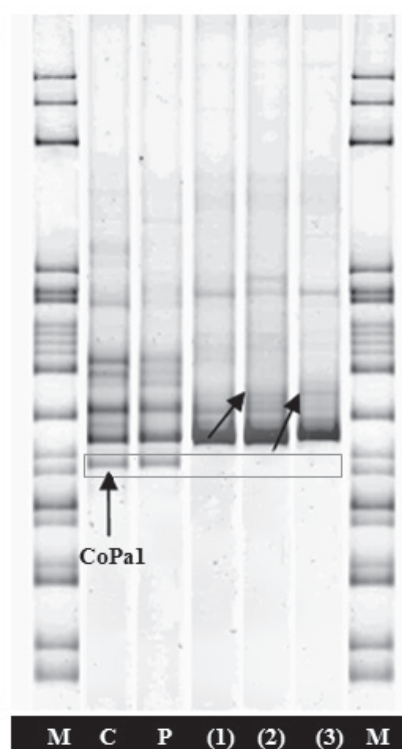


Fig. 1. RISA gel image of the fungal community composition in microcosm soil samples (day 21). Lanes M: marker; lane C: control soil; lane P: pyrene-spiked soil; lanes (1), (2), (3): pyrene and Cu-spiked soils. Two arrows on lanes (2) and (3) also show potentially interesting bands that manifest only at high Cu contamination.

Table 2. Description of RISA band CoPa1 clones and their putative taxonomic affinities.

Accession number	Length (bp)	Presence in RISA profile			Closest match	Sequence Similarity/Overlap (%)	Putative taxonomic affinity
		C	P	P+Cu			
FJ235855	492	+	+	–	<i>Cryptococcus pseudolongus</i> (AB105353.1)	100/97	<i>Cryptococcus pseudolongus</i>
FJ235856	492	+	+	–	<i>Cryptococcus pseudolongus</i> (AB105353.1)	100/97	<i>Cryptococcus pseudolongus</i>

Conclusions

RISA is a rapid and simple culture-independent approach for phylogenetic fingerprinting of dynamic microbial, fungal communities in polluted soils.

The members of communities responding certain way to organic and inorganic contaminants in soil can be visualised by RISA and phylogenetically identified.

It was shown by RISA followed by band

identification that copper-sensitive fungal community member belongs to species *Cryptococcus pseudolongus*.

For practical use of microorganisms identified as perspective by phylogenetic insights provided by RISA, culture-independent approaches should be combined with conventional culture-dependant approaches involving isolation of alive members of microbial communities.

Literature

1. Gadd G.M. Fungi and their role in the biosphere / Jorgensen, S.E. and Fath, B. (eds.) Encyclopedia of Ecology. - Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2008. – P. 1709-1717.
2. Maxam A.M. and Gilbert W. A new method for sequencing DNA // PNAS. – 1977. – Vol. 74. – P. 560–564.
3. Ranjard L., Brothier E. and Nazaret S. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking // Appl Environ Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – P. 5334–5339.

FOMINA M.O.

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine

Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho St. 154, e-mail: mfomina55@gmail.com

PHYLOGENETIC FINGERPRINTING OF MICROBIAL COMMUNITIES IN METAL POLLUTED SOILS USING RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS (RISA)

Aims. The aim of this study was to demonstrate the benefits of culture-independent PCR-based fingerprinting technique called ribosomal intergenic spacer analysis (RISA) in the examination of the effects of a polycyclic aromatic hydrocarbon (pyrene) and selected toxic metal (copper) on fungal communities in soil microcosms. **Methods.** Shifts in soil fungal communities in response to pyrene and copper contamination were studied by ribosomal intergenic spacer analysis (RISA). **Results.** It was found that CoPa1 band was present at the same position in control and pyrene lanes, but it showed very weak intensity or disappeared in all Cu-added soils. This band of microbial community member susceptible to copper toxicity was identified as *Cryptococcus pseudolongus*. **Conclusions.** RISA is a useful culture-independent approach for phylogenetic fingerprinting of dynamic microbial, fungal communities in polluted soils. The members of communities responding certain way to organic and inorganic contaminants in soil can be visualised by RISA and phylogenetically identified with the perspective of their use as bioindicators of specific contaminants.

Key words: RISA, soil, copper, pyrene, fungi, communities.

ЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМІВ У ПРИРОДІ ТА ЕКСПЕРИМЕНТІ

АНТОНЮК М.З., ШТЕФЮК Т.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України,
Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com

ПОЛІМОРФІЗМ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА АЛЕЛЯМИ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ

Мікросателітні локуси (SSR) є одним з найзручніших молекулярно-генетичних інструментів, придатних для дослідження генетичних розбіжностей, можливості яких обмежуються лише спроможністю їх пов'язування з поліморфним на даному матеріалі SSR-локусом [1]. Дослідити стійкі до борошністої роси інтрогресивні лінії м'якої пшениці на предмет можливості маркування гена стійкості мікросателітним локусом є справою наскільки звичною сьогодні, настільки ж і необхідною. Наявність молекулярного маркера гена не тільки полегшує його передачу на тло сучасного комерційно успішного генотипу пшениці, а і сприяє оптимізації фундаментальних досліджень з залученням відповідного рослинного матеріалу. Роботи в цьому напрямку завжди починаються з дослідження

Матеріали і методи

Геномна ДНК сорту Аврора, геномно-заміщених амфідиплоїдів Авродес, Аврозис, Авролати, 18 ліній — похідних Авродесу, 3 ліній — похідних Аврозису, 12 ліній — похідних Авролати було ампліфіковано з праймерами до мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 3D *Triticum aestivum* (табл. 1). Лінії гексаплоїдні, цитологічно стабільні, стійкі до борошністої роси [3]. Виділення ДНК з листя та етіологованих паростків досліджуваних рослин проводили за модифікованою на основі буферу СТАВ. Реакційна ПЛР-суміш об'ємом 30 мкл містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезокситрифосфату, 1,5 мМ MgCl₂,

Результати та обговорення

Геномно-заміщені амфідиплоїди та отримані за їхньою участю лінії, як і сама м'яка пшениця, є самозапильовачами. Процес формування геномів інтрогресивних ліній теоретично взагалі не передбачав між хромосомної рекомбінації генетичного матеріалу через характерну структуру геномно-заміщених амфідиплоїдів. Будь-який з них відрізнявся від генотипу Аврора лише одним із трьох субгеномів (рис. 1). У гіб-

алельного поліморфізму мікросателітних локусів, адже саме від його наявності залежить доцільність наступного кроку – створення картуючої популяції. Кожна з досліджуваних ліній є похідним одного з геномно-заміщених амфідиплоїдів з геномною формулою AABVXX, де AABV є тетраплоїдним компонентом м'якої пшениці сорту Аврора, а XX – геномом *Aegilops speltoides* у Авродесу (AABVSS), *Ae. sharonensis* у Аврозису (AABV^{sh}S^{sh}) та *Ae. umbellulata* у Авролати (AABVUU) [2]. Лінії було створено від схрещування сорту Аврора з одним із амфідиплоїдів [3], тому на початку дослідження припускали, що за будь-яким з досліджених мікросателітних локусів лінія буде відповідати генотипу або Аврори, або амфідиплоїда.

1,2 у Таq-полімерази (Fermentas, Литва) у рекомендованому виробником буфері. Умови проходження ампліфікації (30 циклів, ампліфікатор Applied Biosystem 2700: початкова денатурація – 94°C, 5 хв; денатурація – 94°C, 30 с; гібридизація – 60°C та 48°C, 30 с; елонгація – 72°C, 30 с; кінцева елонгація – 72°C, 10 хв. Продукти ампліфікації у суміші 10-12 мкл ампліфікату з буфером нанесення (99% формаміду, 0,025 М ЕДТА, рН 8,0, бромфеноловий синій, ксиленціанол) розділяли у 6%-ому ПААГ за денатуруючих умов із додаванням 6М сечовини. Гель фарбували за допомогою нітрату срібла.

риді F₁ від схрещування амфідиплоїда з пшеницею кон'югували та могли рекомбінувати хромосоми лише субгеномів А та В, однакові у компонентів схрещування. Хромосоми третього субгеному, наприклад S^{sh} від Аврозиса та D від Аврори, не кон'югують через відсутність гомології, тому рекомбінація внаслідок кросинговеру між ними відбуватися не може. Тому стабілізація інтрогресивних ліній не вимагає тривалих

самозапилення, і 42-хромосомна лінія є гомозиготною, якщо формує 21 бівалент у мейозі, тобто не є подвійним моносоміком. Те, що з хромосомами субгеному D не кон'югують S^{sh} - та U-

хромосоми було показано раніше, в той же час у гібриді AABBSD спостерігали формування мультівалентів [2].

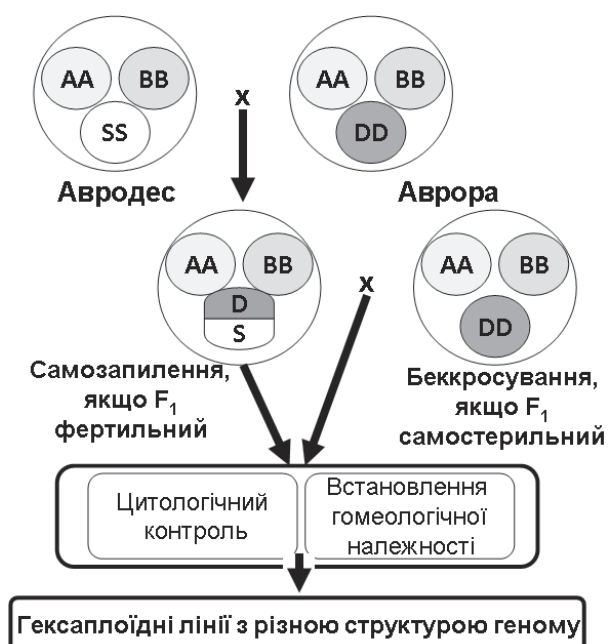


Рис. 1. Шлях створення інтрогресивних ліній з застосуванням геномно-заміщених амфідиплоїдів на прикладі ліній *T. aestivum* / *Ae. speltoides*.

Цитологічний контроль включає визначення кількості хромосом у мітозах первинних корінців паростків рослин та встановлення конфігурації максимальної асоціації хромосом у M1 МКП ліній та гібридів від їхнього схрещування з Авророю. Гомеологічну належність чужинного хроматину встановлювали за допомогою біохімічних генів, специфічних до певних хромосом геному пшениці.

Отже, інтрогресивні лінії мають бути гомозиготними незважаючи на те, скільки інтрогресій вони мають у своєму геномі. Тому вони мають демонструвати лише один алель за кожним з вивчених мікросателітних локусів: властивий або Аврорі, або геномно-заміщеному амфідиплоїду. Насправді крім вказаних варіантів генотипів спостерігали нові алелі, не властиві жодній з батьківських форм, а також генотипи, гетерозиготні за алелями мікросателітів (табл. 1). Порядок розташування мікросателітних локусів хромосоми 3D зліва направо у таблиці відповідає їхній локалізації на хромосомі від термінального кінця короткого плеча до термінального кінця довгого плеча (рис. 2). Найближчими до центромери є локуси *Xcfd201-3DS* та *Xcfd223-3DS*. За цими локусами жоден з геномно-заміщених амфідиплоїдів не відрізняється від Аврори і крім кількох випадків відсутності ампліфікації (0-алель) в лініях 33-2, 166, 212-2 та 2599 всі лінії демонстрували одноманітність. Не відрізнялись від очікуваного генотипи ліній за локусами *Xcfd141-3DS* та *Xcfd9-3DL*. Кожна з них була подібно або до Аврори, або до відповідної геномно-заміщеної форми. За локуса-

ми *Xcfd152-3DS*, *Xcfd55-3DS*, *Xcfd64-3DS*, *Xcfd34-3DS*, *Xcfd211-3DL*, *Xwmc552-3DL* та *Xgdm72-3DL* розташованими на хромосомі дистально від центромери, всі лінії демонструють певні відмінності хромосоми 3D від цієї хромосоми у Аврорі, хоча жодна з них не повторює спектр Аврозису за всіма вивченими мікросателітними локусами (табл. 1). Кожна з досліджених ліній є стійкою до борошнистої роси, хоча сорт Аврора вражається нею з балом 4–3. Це є підставою вважати, що лінії мають чужинний хроматин, отриманий, скоріше за все, від хромосом третьої гомеологічної групи [4]. Судячи з результатів мікросателітного аналізу, жодна лінія не є хромосомно-заміщеною за хромосомою 3D і це підтверджує результати попередніх досліджень [5]. Цілком легитимним та таким, що диктується закономірностями цитологічного процесу, який призводить до утворення інтрогресивних ліній є припущення про наявність чужинних транслокацій у геномі ліній. Результати мікросателітного аналізу для з'ясування геномної структури, перебудованої за рахунок транс локації в тій чи іншій лінії, застосовувати складно.

Порівняння алелів мікросателітних локусів,

які властиві одному з компонентів схрещування для утворення ініціального гібриду F₁ далеко не завжди дає можливість стверджувати однозначно наявність чужинного сегмента на пшеничній хромосомі. Так, для ліній 4, 1112 можна припустити, що дистальна частина короткого плеча заміщена

чужинним фрагментом. Те саме — для довгого плеча ліній 4, 39, 83, 1112. Всі ці лінії — похідні Авродеса, що його гібрид з Авророю формує мультиваленти. У цьому випадку можливі не лише транслокації, а й міжхромосомні рекомбінації хроматину.

Таблиця 1. Алельний поліморфізм інтрогресивних ліній за мікросателітними локусами, специфічними до хромосоми 3D

Амфідиплоїди та лінії, що від них походять	SSR-локуси локалізовані на 3DS							SSR-локуси локалізовані на 3DL			
	<i>Xcfd152</i> -3DS	<i>Xcfd55</i> -3DS	<i>Xcfd141</i> -3DS	<i>Xcfd64</i> -3DS	<i>Xcfd34</i> -3DS	<i>Xcfd201</i> -3DS	<i>1Xcfd223</i> -3DS	<i>Xcfd9</i> -3DL	<i>Xcfd211</i> -3DL	<i>Xwmc552</i> -3DL	<i>Xgdm72</i> -3DL
Авродес	0 ¹⁾	0	0	1	2	1	1	0	2	0	0
3	H1	H1-1	1	H1-1	1	1	1	1	1	H1	1
3-1	H2	0	1	1	1	1	1	0	2	H1	1
4	0	0	0	1	0	1	1	0	2	0	0
7	1	H2	0	H2	2	1	1	1	1	1	H1
12-1	1	H1	1	1	H1	1	1	0	1	H1	1
25	1	0	1	H2	1	1	1	0	2	H1	0
33-2	1	1	1	1	0	1	0	1	1	H1	1
38	H2	0	0	1	H1	1	1	1	2	0	1
39	0	1	0	1	0	1	1	0	2	0	0
53	1	1	1	1	2	1	1	1	2	H1	1
55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	H2
70	1	1	1	1	H2	1	1	1	1	1	1
83	H2	0	0	1	2	1	1	1	1	0	0
1105-1	1	H2	0	H3	1	1	1	1	2	1	1
1092	0	H2	1	H3	2	1	1	1	2	H1	1
1106	1	H2	1	H3	H1	1	1	1	2	1	0
1112	0	0	0	H3	2	1	1	1	2	0	0
1114	H3-1	H1-1	1	1	0	1	1	1	H1	H2-1	1
Аврозис	0	1	0	2	0	1	1	—	2	0	0
113	1	H1	1	1-2	H1-1	1	1	—	1-2	1	1
141	H1-1	1	1	1	1	1	1	—	1-2	1	H1
143	H2	H2	1	1	1	1	1	—	1	1	1
Авролата	0	1	1	0	0	1	1	0	2	2	0
166	H1	H1	1	1	1	0	1	1	1	H1	H1
190	1	1	1	1	H1	1	1	1	H1	1	H1
206	1	H1-1	1	H1	H1	1	1	1	2	1	1
207	H1	1	1	1	H2	1	1	1	1	H1	1
212-2	H2	H1	1	1	0	0	1	1	H1	1	1
215	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	H2
216-3	1	H1	1	1	H1	1	1	1	1	H2	1
217	1	1	1	H2	1	1	1	1	2	1	H2
221-1	1	H1	1	1	0	1	1	0	1	H2	1
221-2	1	H1	1	1	H1	1	1	0	1	H3	1
254	H1	0	1	H1	H3	1	1	1	2	H2	H2
2599	H2	H1	1	1	0	0	1		1	1	1

Примітки: 0 — ампліфікація не відбулася, 1 — алель, притаманний Аврорі, 2 — алель, притаманний геномно-заміщеному амфідиплоїду, Н — новий алель.

У всіх інших випадках, коли лінії демонструють наявність мікросателітного алеля, власного геномно-заміщеному амфідиплоїду, такі алелі чергуються з алелями Аврори (лінії 25, 38, 39, 1105-1, 215, 217), і це змушує піддати сумніву наявність транслокації, хоча дві останні лінії – це похідні Авролати і рекомбінації тут ми не очікували. Найбільш цікавою особливістю таблиці 1 є наявність великої кількості алелів, позначених літерою «Н» — новий. Їх не було лише у чотирьох локусів, згаданих вище, з 11 вивчених. Порівняння ліній різного походження, а також різних мікросателітів з тих 7, за якими було виявлено нові алелі, показало, що статистично процес утворення нових алелів не характеризується специфічністю, пов'язаною з джерелом чужинного хроматину, плечем хромосоми (табл. 2). Щодо мікросателітного локуса, то три з чотирьох локусів, в яких нових алелів не було, є проксимальними до центромери. Чинником виникнення нових алелів мікросателітних локусів можуть бути внутрішньохромосомні перебудови у геномі гібридних рослин, які фіксувалися під час стабілізації інтрогресивних ліній пшениці. Тому результати мікросателітного аналізу ма-

ють обмежене значення для доказу факту інтрогресії цілої хромосоми, її плеча або частини плеча без даних цитологічного аналізу.

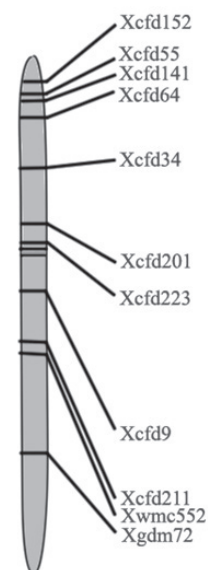


Рис. 2. Розташування вивчених мікросателітних локусів на хромосомі 3D.

Таблиця 2. Рівень алельної мінливості за мікросателітними локусами у залежності від походження інтрогресивних ліній та положенні локусів на хромосомі

Характеристика алелів	Кількість ліній з певними алелями						
	<i>Xcfd15</i> 2-3DS	<i>Xcfd55</i> 3DS	<i>Xcfd64</i> 3DS	<i>Xcfd34</i> 3DS	<i>Xcfd21</i> 1-3DL	<i>Xwmc5</i> 52-3DL	<i>Xgdm7</i> 2-3DL
Лінії — похідні Авродеса							
батьківський	14	11	11	10	17	10	17
Новий	4	7	7	8	1	8	1
Лінії — похідні Авролати							
батьківський	8	4	9	6	10	6	7
Новий	4	8	3	6	2	6	5

По дві лінії, які виглядають гетерозиготами за 1–3 мікросателітними локусами, було знайдено серед похідних Авродеса та Аврозиса та одна — Авролати. Пояснити це явище важко. Раніше, на матеріалі вивчення генетичного поліморфізму за геном β -*AmyD1*, ми висловлювали припущення, що гетерозиготність пояснюється

виникненням гетерогенних дуплікацій за рахунок внутрішньохромосомних перебудов під час становлення рослинних ліній. Однак при вивченні поліморфізму за геном β -*AmyA1* було показано, що алелі змінюються скоріше за все в процесі гаметогенезу, що може бути пов'язано з дією транспозонів [6].

Висновки

Інтрогресивні лінії м'якої пшениці, стійкі до борошністої роси через наявність чужинного хроматину 3-ї гомологічної групи хромосом *Triticinae* продемонстрували алельний полімор-

фізм за мікросателітними локусами, специфічними до хромосоми 3D. Поліморфізм виходить за межі, встановлені генотипами, які брали участь у створенні гібридів F_1 , від яких походять

інтрогресивні лінії. Наявність лише батьківських локусів властива локусам з проксимальною до центромери локалізацією. Локусам з дистальною локалізацією притаманна мінливість, яка спричинює появу нових у порівнянні з батьківськими генотипами алелів мікросателітних локусів. Рівень алельної мінливості за вивченими мікросателітними локусами хромосом 3-ої гомеологічної групи пшеницевих виявився однаковим для трьох досліджених груп інтрогресивних ліній, що мали інтрогресії від *Ae. speltoites*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata*. Оскільки алель-

ний поліморфізм серед ліній виходить за межі батьківських форм ініціальних гібридів, він не може бути поясненим лише прямою інтрогресією чужинного хроматину до геному м'якої пшениці. Результати аналізу можна використовувати для скринування популяцій, що розщеплюються, від схрещування ліній, стійких до борошністої роси, з генотипом Аврора для ідентифікації мікросателітного маркера гену стійкості хоча б в межах чужинного фрагменту хроматину.

Література

1. Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants // *Euphytica*. – 2011. – Vol. 177. – P. 309–334.
2. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // *Вестник с.-х. науки*. – 1984. – №10. – С. 58–66.
3. 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.
4. Антонюк М. З., Бодильова М.В., Єфіменко Т.С. Поліморфізм за SSR-локусами 3D хромосоми серед генотипів пшениці - реципієнтів чужинного гена стійкості до борошністої роси (*Pm*) // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*. – 2010 – Т. 8, №1 – С. 10 – 17.
5. Antonyuk M.Z., Bodylyova M.V., Ternovskaya T.K. Genome structure of introgressive lines *Triticum aestivum/Aegilops sharonensis* // *Cytology and Genetics*. – 2009. – Vol. 43, №6. – С. 58-67.
6. Антонюк М.З., Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Перманентна генетична мінливість у інтрогресивних ліній та амфідиплоїдів *Triticeae* // *Цитология и генетика*. – 2013. – Vol. 47., №4 (у друці).

ANTONYUK M.Z., SHTEFYUK T.V., TERNOVSKA T.K.

National University of Kyiv-Mohyla Academy, MONMS Ukraine

Ukraine, 04070, Kyiv, G. Skovorody str., 2, e-mail: m_antonyuk@yahoo.com

COMMON WHEAT INTROGRESSIVE LINE POLYMORPHISM FOR MICROSATELLITE LOCUS ALLELES

Aims. Evaluation of possibilities to use microsatellite loci as potential molecular markers of alien chromatin in the genomes of wheat introgressive lines, which contain genetic material from *Ae. speltoites*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata* and are resistant to powdery mildew. Evaluation of acceptability of SSR analysis for specification of introgressive lines genome structure. **Methods.** PCR of genome DNA of wheat genotypes for identification of microsatellite loci specific to 3D chromosome. **Results.** The identified polymorphisms of SSR loci were represented by new polymorphic variants, which are different from parental genotypes used for F1 development and by heterozygotes. Microsatellite loci located more distal to centromere were shown to be more polymorphic. **Conclusions.** Polymorphism of SSR loci limits the potential of their use for investigation of introgressive lines genome structure. Microsatellites can be used for screening segregating populations taking into consideration the possibility of new allele appearance.

Key words: wheat, introgressive lines, powdery mildew, microsatellites.

ВОРОНОВА Н.В., РИЗЕВСКИЙ С.В., КУРЧЕНКО В.П., БУГА С.В.

Белорусский государственный университет

Беларусь, 220030, г. Минск, пр. Независимости, 4, e-mail: voronoff@list.ru

ОЦЕНКА УРОВНЯ НАСЫЩЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ С У ТЛЕЙ (*HEMIPTERA: STERNORRHYNCHA: APHIDOIDEA*) КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ВОЗРАСТА ТАКСОНОВ

Эволюционные математические модели, используемые для установления филогенетических взаимоотношений таксонов, базируются на оценке качества и количества нуклеотидных замен, наблюдаемых в сравниваемых последовательностях ортологичных генов [1]. Современные алгоритмы сравнения учитывают эмпирически выявляемые различия в частотах отдельных транзиций и трансверсий, позицию в кодоне, в которой произошла замена, а так же, отчасти, функцию анализируемой последовательности, поскольку давление отбора на разные структурные части генома также различно [2]. Это оптимизирует методы расчета генетических дистанций, повышая их точность. Тем не менее, в ситуациях, когда для анализа использован ген, находящийся под действием строго функционального ограничения (то есть с высоким уровнем элиминации мутантов), а сравниваемые таксоны многочисленны, исследователи сталкиваются с развитием так называемого эффекта насыщения последовательности ДНК.

Насыщение последовательности ДНК представляет собой вырождение филогенетического сигнала в конкретном гене, обусловленное тем, что аминокислотная последовательность, кодируемая этим геном, максимально консервативна. Количество и характер нуклеотидных замен, возможных в подобном участке генома, строго ограничиваются необходимостью сохранения функциональной активности кодируемого белка. Существование ограничений такого рода приводит к тому, что через некое эволюционное расстояние нуклеотиды в варибельных локусах начнут повторяться, экранируя ранее произошедшие замены, и, таким образом, исключая из

анализа ряды эволюционных событий, произошедших в конкретном локусе [3]. Косвенно формирование эффекта насыщения последовательности ДНК можно установить по преобладанию количества наблюдаемых трансверсий над количеством транзиций [4]. Поскольку у близких таксонов соотношение транзиций и трансверсий в последовательности генов обычно варьирует от 5 до 30, его смещение в сторону преобладания числа трансверсий, часто наблюдаемое при сравнении последовательностей далеких таксонов, может быть только следствием экранирования произошедших ранее транзиций новыми заменами в тех же однонуклеотидных локусах.

Очевидно, что уровень насыщения последовательности высоко консервативного гена будет тем выше, чем больше время дивергенции таксонов. В связи с этим было решено установить, существует ли корреляция между уровнем насыщения гена субъединицы I цитохромоксидазы с (*COI*) и возрастом таксонов у тлей, а также оценить возможность использования данного показателя для построения хронологических дендрограмм. Поскольку ген *COI* локализуется в митохондриальном геноме, не имеет полных ядерных копий и кодирует важнейшую в функциональном отношении структурную единицу терминального комплекса дыхательной цепи, несинонимичные мутации в его последовательности чрезвычайно редки. Это ограничивает число возможных нуклеотидных замен в последовательности гена и, по нашему мнению, должно сравнительно быстро приводить к ее насыщению.

Материалы и методы

Для эволюционного анализа в общей сложности использовали последовательности *COI* 340 видов тлей надсемейства *Aphidoidea* (классификация согласно Remadier и Remadier [5]). Сборы исследуемых видов тлей произвели в 2008–2010 гг. на территории Беларуси [6]. Для выделения ДНК использовали DNA Purification Kit (Fermentas), адаптировав методику производителя специально для работы с тлями. Для по-

лучения фрагмента *COI* использовали праймеры LCO1490/HCO2198 [7]. Секвенирование продуктов осуществили на 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), с BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). Обработку результатов секвенирования провели с использованием программы визуализатора Chromas Lite 2.01. Кроме того были использованы последовательности *COI*

тлей, полученные из международных баз нуклеотидных последовательностей GenBank и CBOL (табл. 1).

Программное обеспечение для проведения эволюционного анализа включало: MEGA5 (определение модели нуклеотидных замещений, расчет нуклеотидных смещений, генетических дистанций), DnaSP v5 (расчет статистических

параметров нуклеотидных последовательностей), DAMBE (расчет числа и соотношения транзиций и трансверсий, индекса насыщения нуклеотидных замещений), BioEdit (составление консенсусных нуклеотидных последовательностей), WebLogo (составление консенсусных аминокислотных последовательностей).

Таблица 1. Таксономическая структура массива данных и число выявленных гаплотипов COI-5 секции тлей надсемейства *Aphidoidea*

Подсемейства	Число проанализированных родов	Число проанализированных видов	Число выявленных гаплотипов COI
<i>Anoeciinae</i>	1	1	1
<i>Aphidinae</i>	6	233	223
<i>Calaphidinae</i>	17	20	20
<i>Chaitophorinae</i>	2	6	6
<i>Drepanisiphinae</i>	2	4	4
<i>Eriosomatinae</i>	25	37	37
<i>Greenideinae</i>	1	2	2
<i>Hormaphidinae</i>	7	7	7
<i>Lachninae</i>	9	16	16
<i>Lizeriinae</i>	1	1	1
<i>Mindarinae</i>	1	2	2
<i>Neophyllaphidinae</i>	1	1	1
<i>Phyllaphidinae</i>	2	3	3
<i>Pterocommatinae</i>	2	5	5
<i>Saltusaphidinae</i>	3	3	3
<i>Tamaliinae</i>	1	4	4

Результаты и обсуждение

Было проведено сравнение последовательностей COI-5 региона в четырех подтрибах тлей: *Aphidina*, *Rhopalosiphina* трибы *Aphidini*, и *Macrosiphina*, *Anuraphidina* трибы *Macrosiphini* подсемейства *Aphidinae*. Во всех подтрибах число обнаруженных гаплотипов приближалось к числу анализируемых таксонов, что свидетельствует о низком внутривидовом разнообразии COI (табл. 2). Соотношение наблюдаемых транзиций и трансверсий очень низко во всех подтрибах. Индекс мутационного насыщения указывает на наличие незначительного насыщения ДНК.

Частота гаплотипов, близкая к единице, обеспечивает высокое постоянство аминокислотного состава белка. На уровне надсемейства в консенсусной аминокислотной последовательности COI-5 секции длиной 206 аминокислот обнаруживается только 14 переменных позиций, причем лишь по 5-ти из них перемен-

ность можно не считать крайне низкой (рис. 1).

Тестирование насыщения последовательности ДНК с использованием алгоритмов пакета DAMBE показало, что в подсемействах *Calaphidinae*, *Eriosomatinae* и *Lachninae* обнаруживается насыщение последовательности COI при приближении генетических дистанций к значению 0,1. На графике, отражающем отношение числа наблюдаемых транзиций и трансверсий к генетической дистанции между последовательностями, видно, что количество трансверсий начинает превышать количество транзиций в подсемействе *Lachninae* – при дистанции, равной 0,03, в *Eriosomatinae* – при дистанции, равной 0,08, в *Calaphidinae* – при генетической дистанции, равной 0,09. В подсемействе *Aphidinae* заметного насыщения последовательности ДНК не происходит (рис. 2).

Таблица 2. Общая характеристика последовательности COI-5 секции отдельных триб тлей подсемейства *Aphidinae*

Параметр	<i>Aphidina</i>	<i>Rhopalosiphina</i>	<i>Macrosiphina</i>	<i>Anuraphidina</i>
Число проанализированных таксонов	63	13	116	41
Число гаплотипов (Hap)	60	13	114	40
Дивергенция гаплотипов (Hd)	0,998±0,003	1,000±0,030	1,000±0,001	0,999±0,006
Модель нуклеотидных замещений	TN93+G+I	GTR+G+I	TN93+G+I	TN93+G+I
Число переменных сайтов (V)	228	155	215	183
Число парсимонично информативных сайтов	182	92	195	140
Количество транзиций (Ti), %	4,684±0,009	4,320±0,008	3,945±0,009	3,739±0,008
Количество трансверсий (Tv), %	2,469±0,007	2,951±0,012	3,168±0,011	2,512±0,112
Общее Ti/Tv смещение	2,59	2,82	2,31	2,86
Нуклеотидное разнообразие (Pi)	0,068±0,001	0,075±0,006	0,061±0,002	0,071±0,002
Коррекция Джукса-Кантора (JC-Pi)	0,0719	0,0794	0,0637	0,0747
G+T содержание, %	24,821	23,458	24,423	24,022
Индекс мутационного насыщения (Iss)	0,105	0,138	0,111	0,136
Iss/Iss.c статистика	6,831	5,347	6,468	5,294



Рис. 1. Консенсусная аминокислотная последовательность COI-5 секции тлей надсемейства *Aphidoidea*

Надсемейство *Aphidoidea* возникло 280–250 миллионов лет назад. В настоящее время полагают, что дивергенция подсемейств происходила в следующем порядке: *Lachninae*, *Eriosomatinae*, *Calaphidinae*, *Aphidinae* [8]. Как было сказано выше, степень насыщения последовательностей ДНК являются функцией эволюционного возраста таксонов. При построении кладограммы филогенетических взаимоотношений подсемейств надсемейства *Aphidoidea*, отделение ветвей на которой соответствует величине генетической дистанции, при которой обнаруживается насыщение последовательности

ДНК, подсемейства располагаются в соответствии с их эволюционным возрастом (рис. 3).

Данный факт позволяет сделать вывод о существовании корреляции между степенью насыщения последовательности *COI* и эволюционным возрастом таксонов у тлей. Таким образом, насыщение последовательности, определяемое как смещение соотношения наблюдаемых транзиций и трансверсий в сторону преобладания трансверсий, может служить косвенным показателем хронологических взаимоотношений таксонов в группе.

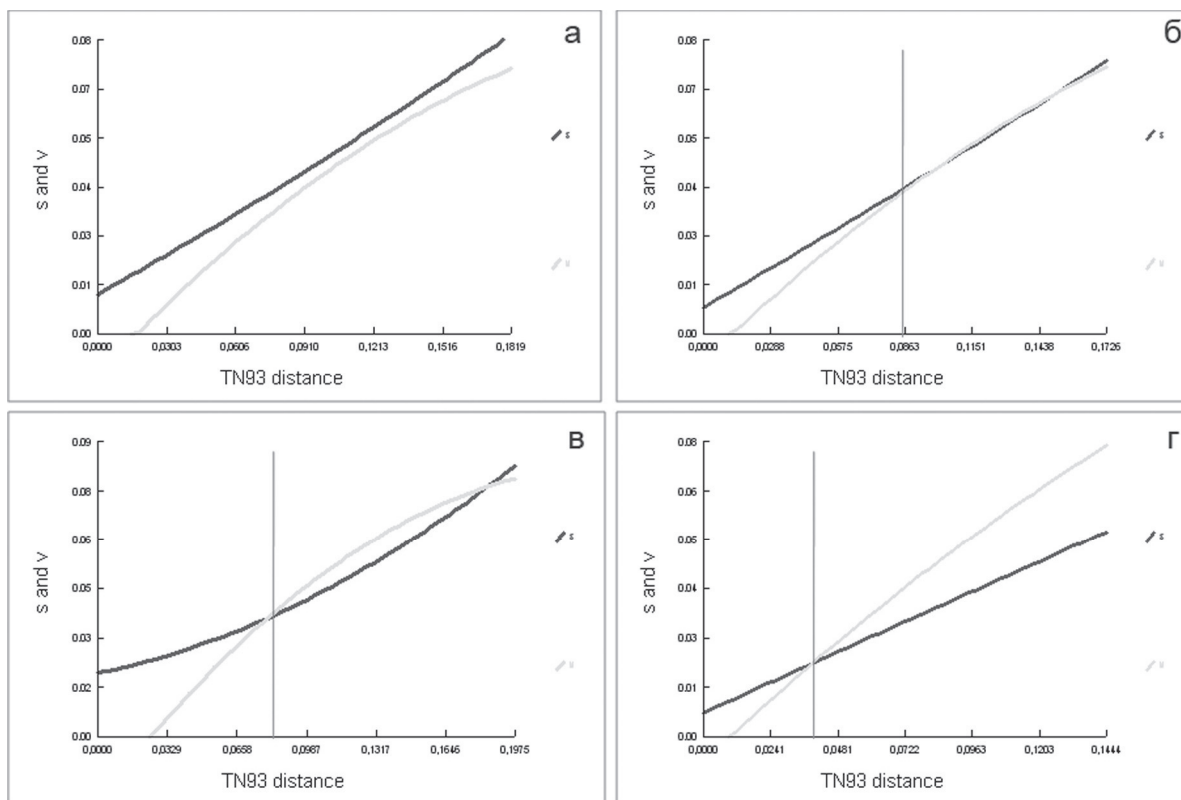


Рис. 2. Сравнительная дивергенция транзиций (s) и трансверсий (v) в COI-5 секции тлей надсемейства *Aphidoidea*: а – *Aphidinae*, б – *Calaphidinae*, в – *Eriosomatinae*, г – *Lachninae*

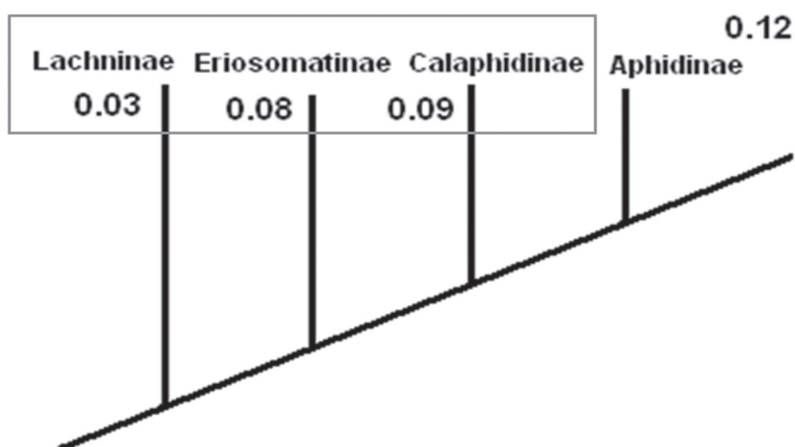


Рис. 3. Кладограмма филогенетических взаимоотношений подсемейств надсемейства *Aphidoidea*

Выводы

На основании полученных данных можно заключить, что:

1. Последовательность *COI* тлей насыщается на уровне подсемейств, что выражается в падении соотношения наблюдаемых транзиций и трансверсий.

2. Насыщение последовательности *COI* у тлей обусловлено высокой консервативностью

аминокислотной последовательности кодируемого геном белка.

3. Из изученных подсемейств наиболее высока вырожденность последовательности *COI* в подсемействах *Eriosomatinae* и *Lachninae*. Наименее – в подсемействе *Aphidinae*, что хорошо соотносится с эволюционным возрастом таксонов.

4. Насыщение последовательности, определяемое как смещение соотношения наблюдаемых транзиций и трансверсий в сторону преобладания трансверсий, может служить показателем хронологических взаимоотношений таксонов в группе.

Литература

1. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. – Oxford University Press, Oxford, 2000. – 350 p.
2. Otsuka J., Kawai Y., Sugaya N. The influence of selection on the evolutionary distance estimated from the base changes observed between homologous nucleotide sequences // *Journal of Theoretical Biology*. – 2001. – Vol. 213, Issue 2. – P. 129–144.
3. Ho S.Y.W., Phillips M.J., Cooper A., Drummond A.J. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times // *Molecular Biology and Evolution*. – 2005. – Vol. 22, №7. – P. 1561–1568.
4. Broughton R.E., Stanley S.E., Durrett R.T. Quantification of homoplasy for nucleotide transitions and transversions and a reexamination of assumptions in weighted phylogenetic analysis // *Syst. Biol.* – 2000. – Vol. 49, Issue 4. – P. 617–627.
5. Remaudière G., Remaudière M. *Catalogue of the World's Aphididae. Homoptera Aphidoidea*. – INRA Editions, Versailles, France, 1997. – 478 p.
6. Воронова Н.В., Курченко В.П., Буга С.В. Подбор молекулярно-генетических маркеров для видовой диагностики тлей и построения филогений // *Труды Белорусского государственного университета*. – 2011. – Т. 6, Ч. 1. – С. 181–192.
7. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. – 1994. – Vol. 3, №5. – P. 294–299.
8. Ortiz-Rivas B., Martínez-Torres D. Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (*Hemiptera: Aphididae*) and the basal position of the subfamily *Lachninae* // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2010. – Vol. 55. – P. 305–317.

VORONOVA N.V., RIZEVSKIY S.V., KURCHENKO V.P., BUGA S.V.

Belarusian State University

Belarus, 220030, Nezavisimosti str.4, e-mail: voronoff@list.ru

ASSESSING SATURATION LEVEL ON COI GENE IN APHIDS AS A METHOD FOR DETERMINATION OF RELATIVE AGE OF TAXA

Aims. DNA saturation effect forms in evolutionary conservative genes as a result of repeated nucleotide substitutions which occur at the same variable loci. In order to find out whether there is a correlation between the level of the DNA saturation in COI gene and the age of taxa in aphids, 340 COI sequences from aphids were compared. **Methods.** Evolutionary analysis was conducted using the software: MEGA5, DnaSP v5, BioEdit, WebLogo. The DNA saturation level was determined with DAMBE as the transition/transversion ratio for pairs of sequences versus genetic distance. **Results.** It was found that the DNA saturation effect forms in subfamilies: *Lachninae* when the genetic distance is 0.03, *Eriosomatinae* when the genetic distance is 0.08, *Calaphidinae* when the genetic distance is 0.09. DNA saturation is not registered in subfamily *Aphidinae*. When constructing the subfamilies phylogenetic cladogram, the subfamilies are arranged according to their evolutionary age. **Conclusions.** DNA saturation, defined as the shift of the ratio of the observed transitions and transversions in the predominance of transversions, may serve as an indicator of the chronological relationships of taxa.

Key words: DNA saturation, transition-transversion bias, COI, aphids.

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

СКРИНИНГ ГЕНОМНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГАМЕТОФИТНЫМ АПОМИКСИСОМ У РАСТЕНИЙ *BOECHERA HOLBOELLII* (СЕМЕЙСТВО BRASSICACEAE)

Апомиксис определяют как бесполое размножение цветковых растений без мейоза и фертилизации [1–3]. Очевидно апомиксис – это интригующая особенность растений, позволяющая осуществлять клонирование материнского организма через семена. Апомиксис не согласуется с эволюционными представлениями об апомиксисе как якобы эволюционном тупике в отсутствие рекомбинации и скрещиваний, поскольку показан высокий уровень генного, хромосомного и морфологического разнообразия в агамных комплексах. Фундаментальная важность проблем пола и мейоза / рекомбинации определяют важность проблемы апомиксиса (асексуальности). Исследование молекулярных механизмов функционирования апомиксиса преследует главную мечту селекционеров – использовать апомиксис для закрепления гетерозиса в селекции важнейших сельскохозяйственных культур. Биотехнологический потенциал апомиксиса основан на «преодолении» генетической сегрегации и создании основ новой «зеленой революции».

В последнее время возрос интерес к пониманию молекулярных механизмов апомиксиса.

Материалы и методы

В работе использовали североамериканские эндемичные формы рода *Boechera* с различными репродуктивными модами и уровнями плоидности из ведущих лабораторий Нидерландов и Германии (табл. 1).

Тотальную ДНК экстрагировали из проростков и листьев растений фенольно-детергентным методом. В связи с малым количеством растительного материала некоторых образцов все выделенные варианты ДНК были повторно наработаны методом полногеномной амплификации, позволяющим осуществлять эквивалентное накопление всех ДНК последовательностей генома в количествах, достаточных для молекулярно-генетического анализа с помощью *phi* 29 полимеразы.

SSAP и SCAR маркеры апомиксиса секвенировали на приборах ABI 310 DNA Sequencer или Beckman Coulter Sequencer. Гомологию нуклеотидных последовательностей анализировали на

Становится понятным, что генетика апомиксиса является более сложной, чем было принято предполагать раньше [3–5]. Молекулярные основы апомиксиса не легко детектировать у растений. Апомиксис, видимо, контролируется комплексом генов вместе с некоторыми факторами внешней среды. После того, как были секвенированы геномы арабидопсиса и риса, стали доступны новые стратегии функциональной геномики для понимания ключевых регуляторных элементов мейоза, партеногенеза и развития эндосперма. В настоящее время в области апомиксиса работает около 100 групп и лабораторий. Известно, что апомиксис находится под сложным генетическим контролем, но основы его наследования часто остаются противоречивыми и труднообъяснимыми. Тем не менее, на активное использование молекулярно-генетических маркеров возлагают надежды в поиске генов, контролирующих апомиксис. Выделение генов апомиксиса является ключевым направлением в апомиксисных исследованиях. Цель работы – выделение и идентификация геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом.

сайте национального центра по биоинформатике (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih>, используя BLASTN программу. Специфичные ПЦР праймеры были подобраны при помощи специальных программ DNASTAR. ПЦР выполняли в общем объеме 20 мкл, содержащем 1x буфер, 10 пмоль каждого из праймеров, 10 – 50 нг матричной ДНК, 250 мкмоль каждого из dNTP и 2 ед. Taq полимеразы. Условия проведения ПЦР были следующие: 94 °C 2 мин; 30 – 35 циклов при 94 °C – 45 сек, отжиг праймера при специфической температуре (около 55 °C) – 1 мин, 72 °C – 1 мин; финальная элонгация при 72 °C – 10 мин. ПЦР проводили в приборе Терцик и фрагменты разделяли в ПАА или агарозном гелях. Визуализацию ДНК в полиакриламидном геле осуществляли серебром, а в агарозном геле – бромистым этидием.

Детекцию геномных последовательностей, гомологичных полученных нами пробам на основе SCAR маркеров, осуществляли методом Саузерн

гибридизации. Препараты ДНК гидролизовали рестриктазами BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI и PstI (Fermentas). Перенос фрагментов ДНК из геля осуществляли по методу Саузерна с некоторыми

модификациями. Реакцию случайного праймирования ДНК зондов, гибридизацию, и регистрацию хемилюминесцентного сигнала осуществляли, как описано в прописи фирмы Roche.

Таблица 1. Коллекция форм растений рода *Boechera* с бесполосеменным (Apo) и половым (Sex) способами размножения

№№	Виды и формы растений	Особенности размножения	Источник происхождения
Голландская коллекция			
1	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #36-1	Apo	Dr. Kim Boutilier, Plant Research International, Netherlands
2	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #6-3	Apo	
3	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 3x #5-10	Apo	
4	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #4-2	Apo	
5	<i>Arabis holboellii</i> Colorado 2x #8-7	Apo	
6	<i>Arabis drummondii</i> 2x #10	Sex	
Немецкая коллекция			
7	<i>Arabis holboellii</i> Rc#1	Apo	Dr. Thomas Mitchell-Olds, Max Planck Institute of Chemical Ecology, Germany
8	<i>Arabis holboellii</i> cg#25	Apo	
9	<i>Arabis drummondii</i> 4	Sex	
10	<i>Arabis drummondii</i> 11	Sex	

Результаты и обсуждение

Работа состояла из двух больших этапов и включала (1) конвертацию мультилокусных SSAP маркеров в монолокусные SCAR маркеры для создания гибридизационных проб и (2) собственно детекцию геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом методом Саузерн блот гибридизации.

На первом этапе было завершено верификационное секвенирование созданных SCAR_Cin_220 (проба 1), SCAR_Cin_240 (проба 2), SCAR_Cin_380 (проба 3) и SCAR_Isaak_230 (проба 4) маркеров апомиксиса. В генбанке установлено сходство SCAR_Cin_220 с 5 последовательностями (гомология 85 - 93%), сходство SCAR_Cin_240 с 9 последовательностями арабидопсиса (гомология 91%), SCAR_Cin_380 сходство с короткими последовательностями до 20 нуклеотидов (существенной гомологии нет), сходство SCAR_Isaak_230 с 2 анонимными последовательностями (гомология 100%).

Саузерн гибридизация дала предварительные результаты, совпадающие с результатами, полученными прежде методом ПЦР. Так, у генотипа с апомиктичным размножением при использовании пробы 1 – SCAR_Cin_220 детектируется PstI фрагмент размером около 2 Kb (рис. 1). При использовании пробы 2 – SCAR_Cin_240 у генотипа с апомиктичным размножением детектируются Eco130I фрагменты размером около 1 и 6 Kb, HindIII фрагменты – около 1.5 и 6 Kb, MvaI фрагменты – около 1 и 8 Kb (рис. 2). Известно, что средний размер растительных генов 2 – 4 кб. Можно предполагать, что

обнаруженные фрагменты, являются участками генов.

Несмотря на активное использование боечер в качестве модельного объекта при изучении генетики полового размножения и апомиксиса, к настоящему моменту не известно ни одного SCAR маркера у боечер. Единичные примеры, приведенные в табл. 2, демонстрируют степень новизны полученных нами результатов.

Таким образом, в ходе выполненной работы году было завершено множественное независимое секвенирование полученных SCAR_Cin_380 и SCAR_Isaak_230, а также дополнительно SCAR_Cin_220 и SCAR_Cin_240, маркеров апомиксиса у растений рода *Boechera*. Начаты эксперименты по детекции геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом, методом Саузерн гибридизации на основе рестриктаз BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI и PstI. К сожалению, выделить геномные локусы пока не удалось ни в одной лаборатории, ведущей исследования в этой области. В перспективе выполнение настоящего проекта позволит идентифицировать геномные локусы, ассоциированные с гаметофитным апомиксисом. Полученные нами результаты позволяют надеяться на успех в идентификации геномных локусов, вовлеченных в генетический контроль апомиксиса, при скрининге на больших выборках коллекционного материала.

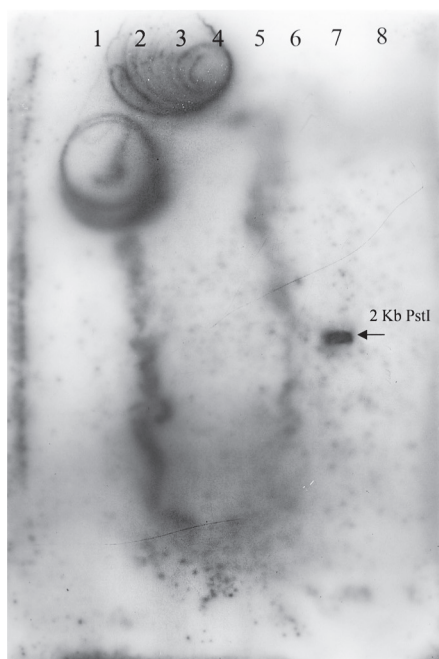


Рис. 1. Саузерн блот гибридизация апомиктического (нечетная дорожка) и амфимиктического (четная дорожка) растения *Boechera* с гибридизации с пробой 1

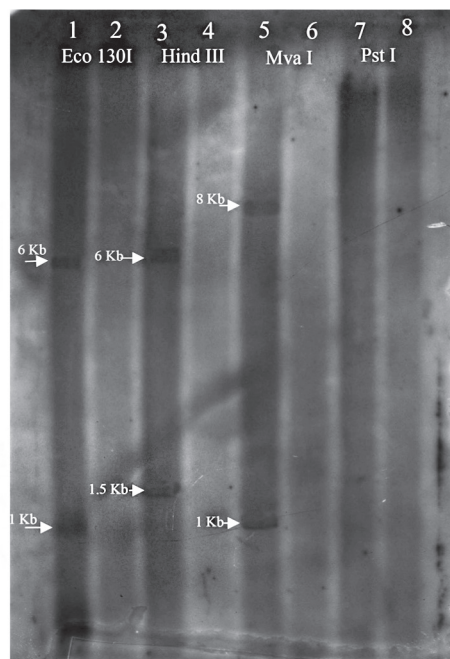


Рис. 2. Результаты Саузерн блот гибридизации апомиктического (нечетная дорожка) и амфимиктического (четная дорожка) растения *Boechera* с пробой 2

Таблица 2. Известные монолокусные маркеры апомиксиса

№ №	Вид	Монолокусные маркеры	Геномная область	Ссылки
1.	<i>Poa pretense</i>	SCAR маркеры Parth1 и Sex1	неизвестна	Италия: [6]
2	<i>Pennisetum squamulatum</i> и <i>Cenchrus ciliaris</i>	SCAR маркеры	ASGR (the apospory-specific genomic region)	США: [7]
3.	<i>Hypericum perforatum</i>	SCAR маркер → CAPS (cleaved amplified polymorphic site)	сходство с белком, принадлежащим к ARIADNE семейству белков, классу RING-finger белков с предполагаемой функцией убикутин-протеин лигаз E3.	ФРГ: [8]
4.	<i>Hieracium caespitosum</i>	4 SCAR маркера 3 SCAR маркера	локус потери апомейоза (LOA) локус потери партеногенеза (LOP)	Австралия и Новая Зеландия: [9]
5.	<i>Allium ramosum</i>	4 SCAR маркера диплоспории	неизвестна	Япония: [10]

Выводы

1. На основе найденных прежде мультилокусных SSAP маркеров апомиксиса были получены SCAR маркеры апомиксиса: SCAR_Cin_220, SCAR_Cin_240.

2. Осуществлена амплификация SCAR_Cin_220, SCAR_Cin_240 с препаратами ДНК из видов с половым размножением

(*Boechera stricta*) и апомиксисом (*Boechera holboellii*). Показана возможная гемизиготность полученных маркеров апомиксиса SCAR маркеров апомиксиса (существующих в виде единственного аллеля).

3. Выполнено верификационное секвенирование созданных SCAR_Cin_220 (проба 1),

SCAR_Cin_240 (проба 2) маркеров апомиксиса. В генбанке установлено сходство SCAR_Cin_220 с 5 последовательностями (гомология 85–93%), сходство SCAR_Cin_240 с 9 последовательностями арабидопсиса (гомология 91%).

4. Эксперименты по детекции геномных локусов, ассоциированных с апомиксисом, методом Саузерн гибридизации позволили выявить следующие маркеры:

У генотипа с апомиктичным размножени-

ем при гибридизации с пробой 1 детектируется PstI фрагмент размером около 2 Кб.

У генотипа с апомиктичным размножени-ем при гибридизации с пробой 2 детектируются Eco130I фрагменты размером около 1 и 6 Кб, HindIII фрагменты – около 1.5 и 6 Кб, MvaI фрагменты – около 1 и 8 Кб.

У генотипа с апомиктичным размножени-ем при гибридизации с пробой 3 детектируется PstI фрагмент размером около 4 Кб.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты №11-04-97039 р_поволжье_а и №13-04-01404-а).

Литература

1. Gerashchenkov G., Rozhnova N. Genetic Control of Gametophytic Apomixis: Current Status of Knowledge // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. – 2004. – Vol. 58. – P. 167–174.
2. Ozias-Akins P., van Dijk P.J. Mendelian Genetics of Apomixis in Plants // Annu. Rev. Genet. – 2007. – Vol. 41. – P. 509–537.
3. Rodriguez-Leal D. and Vielle-Calzada J.-P. Regulation of apomixis: learning from sexual experience // Curr. Opin. Plant Biol. – 2012. – <http://dx.doi.org/10.1016/>
4. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А. Мобильные генетические элементы в эволюции пола у растений // Генетика. – 2010. – Т. 46. – С. 1445–1457.
5. Albertini E., Barcaccia G., Mazzucato A., Sharbel T.F., and Falcinelli M. Chapter 20 Apomixis in the Era of Biotechnology // E.C. Pua and M.R. Davey (eds.), Plant Developmental Biology – Biotechnological Perspectives. – 2010. – Vol. 1. – P. 405–436.
6. Albertini E., Barcaccia G., Porceddu A. et al. Mode of reproduction is detected by Parth1 and Sex1 SCAR markers in a wide range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties // Mol. Breed. – 2001. – Vol. 7. – P. 293–300.
7. Akiyama Y., Conner J.A., Goel S. et al. High-resolution physical mapping in Pennisetum squamulatum reveals extensive chromosomal heteromorphism of the genomic region associated with apomixis // Plant Physiol. – 2004. – Vol. 134. – P. 1733–1741.
8. Schallau A., Arzenton F., Johnston A.J. et al. Identification and genetic analysis of the APOSPORY locus in *Hypericum perforatum* L. // Plant J. – 2010. – Vol. 62. – P. 773–784.
9. Okada T., Ito K., Johnson S.D., et al. Chromosomes Carrying Meiotic Avoidance Loci in Three Apomictic Eudicot Hieracium Subgenus Pilosella Species Share Structural Features with Two Monocot Apomicts // Plant Physiol. – 2011. – Vol. 157. – P. 1327–1341.
10. Yamashita K., Nakazawa Y., Namai K. et al. Modes of inheritance of two apomixis components, diplospory and parthenogenesis, in Chinese chive (*Allium ramosum*) revealed by analysis of the segregating population generated by back-crossing between amphimictic and apomictic diploids // Breeding Science. – 2012. – Vol. 62. – P. 160–169.

GERASHCHENKOV G.A., ROZHNOVA N.A.

*Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences
Russia, 45005, Ufa, prospekt Oktyabrya, e-mail: apomixis@anrb.ru*

SCREENING OF GENOME LOCI ASSOCIATED WITH GAMETOPHYTE APOMIXIS AT BOECHERA HOLBOELLII PLANTS (BRASSICACEAE FAMILY)

Aims. Apomixis is the seeds-without-sex reproduction of floral plants at which germs in seeds arise from cells of maternal genotype without participation both genetic recombination and syngamy (fusion of male and female gametes). Nevertheless the genetic control of apomixis is not clear and speculative till now. The goal of work was to perform isolation and identification of genome loci associated with apomixis in *Boecheira* plants. **Methods.** DNA sequencing was performed to convert SSAP markers to SCAR markers of apomixis. Southern hybridization experiments on the basis BamHI, EcoRI, Eco130I, HindIII, MvaI and PstI for the detection polymorphisms among apomixis and amphimixis genomes were used. **Results.** It has been completed plural independent sequencing of created SCAR markers of apomixis (all 4 probes). The similarity and homology of the markers with known DNA sequences were established. In Southern hybridization

experiments among one apomixis and one amphimixis genotypes different genome marker fragments of apomixis were detected. **Conclusions.** The obtained results are the important precondition for the detection and identifications of the general genome fragments (genes) in a range from 1 up to 10 Kb at bulk samples of plant genomes with sexual and asexual reproduction in the following investigations.

Key words: *Boecheira holboellii*, apomixis, molecular markers, DNA sequencing, Southern hybridization.

ГУЛЬКО Т.П.^{1,5}, ДРАГУЛЯН М.В.¹, РЫМАР С.Е.^{1,5}, КОРДИУМ В.А.¹, ЛЕВКИВ М.Ю.², БУБНОВ Р.В.^{3,4}

¹*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины*

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

²*Киевский национальный университет им. Тараса Шевченка*

Украина, 01601, Київ, ул. Володимирська, 64/13

³*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины*

Украина, 03143, Киев, ул. Акад. Заболотного 154

⁴*Центр ультразвуковой диагностики и интервенционной сонографии Клинической больницы «Феофания» Государственного Управления делами*

Украина, 03680, Киев, ул. Акад. Заболотного 21

⁵*ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМНУ»*

Украина, 04114, м. Киев, ул. Вышгородская, 67

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ У КРЫС ЛИНИИ WISTAR РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Цирроз печени – хроническое полиэтиологическое прогрессирующее заболевание, протекающее с поражением паренхиматозных интестинциальных тканей органа с последующей дистрофией и некрозом гепатоцитов, нарушением архитектоники органа и развитием той или иной степени недостаточности печени [1]. Нынешние традиционные и хирургические методы лечения

цирроза печени малоэффективны, а порой и травматичны, поэтому использование модельного цирроза печени на животных дает возможность поиска новых подходов к лечению болезни. В связи с этим целью нашего опыта было получение модельного цирроза печени у самцов лабораторных крыс линии Wistar разного возраста.

Материалы и методы

В работе были использованы крысы линии Wistar 3-х и 8-и месячного возраста, массой 200г и 450г соответственно. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Цирроз печени вызывали внутрибрюшинным введением опытным крысам 30%-ного масляного раствора (CCl₄) (0,01 мл/кг) 1 раз в неделю. Контрольным животным аналогичным образом вводили идентичный объем физиологического раствора. Клиническое наблюдение за животными велось ежедневно. На начало эксперимента у всех опытных и контрольных крыс были зафиксированы исходные биологические и физиологические параметры следующими метода-

ми (подсчет лейкоцитарной формулы, определение АЛТ, АСТ и прижизненное ультразвуковое исследование – УЗИ – по предложенному нами методу) [5]. Животные выводились из эксперимента на 14, 28 и 42 сутки. Крыс декапитировали под легким эфирным наркозом. Извлеченную печень в течении 48час фиксировали в 10% формалине. Затем промывали ткань и помещали в физиологический раствор, забуференный 0,1% М фосфатным буфером (рН 7,4), содержащий 30% сахарозы. На замораживающем микротоме готовили срезы толщиной 50мкм. В работе использовали гистологический метод окраски препаратов гематоксилин-эозином.

Результаты и обсуждение

В результате анализа лейкоцитарной формулы у молодых животных на 2-й неделе эксперимента выявлено интенсивное увеличение количества эозинофилов – в 3 раза; базофилов – в 2 раза, палочкоядерных нейтрофилов – в 1,7 раза, моноцитов – в 1,5 раза, и незначительное

снижение сегментоядерных нейтрофилов – в 0,5 раза по сравнению с контрольной группой животных (табл.1). У старых самцов крыс вторая неделя эксперимента характеризовалась незначительным увеличением количества палочкоядерных нейтрофилов.

Известно, что деструкция мембранных структур гепатоцитов, вызванная перекисным окислением липидов (ПОЛ) приводит к цитолизу, о присутствии которого обычно судят по изменению % эозинофилов в клиническом анализе крови [4]. Наши данные, представленные в табл.1, свидетельствуют о том, что процент эо-

зинофилов в группе 3-х месячных крыс увеличивается на 2-ой неделе эксперимента и в дальнейшем держится на достаточно высоком уровне, что указывает на постоянно протекающую гибель гепатоцитов в патологически измененном организме.

Таблица 1. Динамика изменения форменных элементов крови крыс под воздействием CCl_4

Форменные элементы крови	Молодые крысы (n=12) (недели)			Старые крысы (n=3) (недели)			Контрольная группа крыс (К) (n=4)
	2-я	4-я	6-я	2-я	4-я	6-я	
Эозинофилы, %	3,0±0,0	2,5±0,5	3,0±0,0	0	0	0	0
Базофилы, %	4,0±0,5	4,5±0,5	4,0±0,0	0	0	0	2,0±0,0
Палочкоядерные нейтрофильные гранулоциты, %	9,5±0,5	9,0±0,0	8,5±0,5	9,0±0,0	8,0±0,0	9,0±0,0	5,5±0,5
Сегментоядерные нейтрофильные гранулоциты, %	7,5±0,5	7±0,0	7,5±0,5	16,0±0,0	15,0±0,0	17,0±0,0	14,0±0,0
Лимфоциты, %	73,0±0,0	73,0±0,0	73,0±0,0	74,0±0,0	75,0±0,0	72,0±0,0	72,5±0,5
Моноциты, %	3,0±0,0	3,5±0,5	3,0±0,0	1,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0	2,0±0,0

Результаты изучения изменений биологических показателей (АСТ и АЛТ), представленные на рисунке 1А, свидетельствуют о том, что развитие цирроза печени у крыс 3-х месячного возраста почти в 10 раз повышаются уровни аспартатаминотрансферазы (АСТ) и аланинаминотрансферазы (АЛТ), что согласуется с литературными данными исследования цирроза печени у человека [4]. Преобладание АСТ над АЛТ является биохимическим показателем цитолиза

гепатоцитов [7]. Наши данные свидетельствуют о выраженной интоксикации организма 3-х месячных крыс на протяжении всего эксперимента.

В группе 8-месячных крыс показатели АСТ и АЛТ увеличивались, но не значительно, причем уровень АЛТ был выше уровня АСТ (рис. 1, Б), что по литературным данным свидетельствует о возможном заболевании сердечно-сосудистой системы [7].

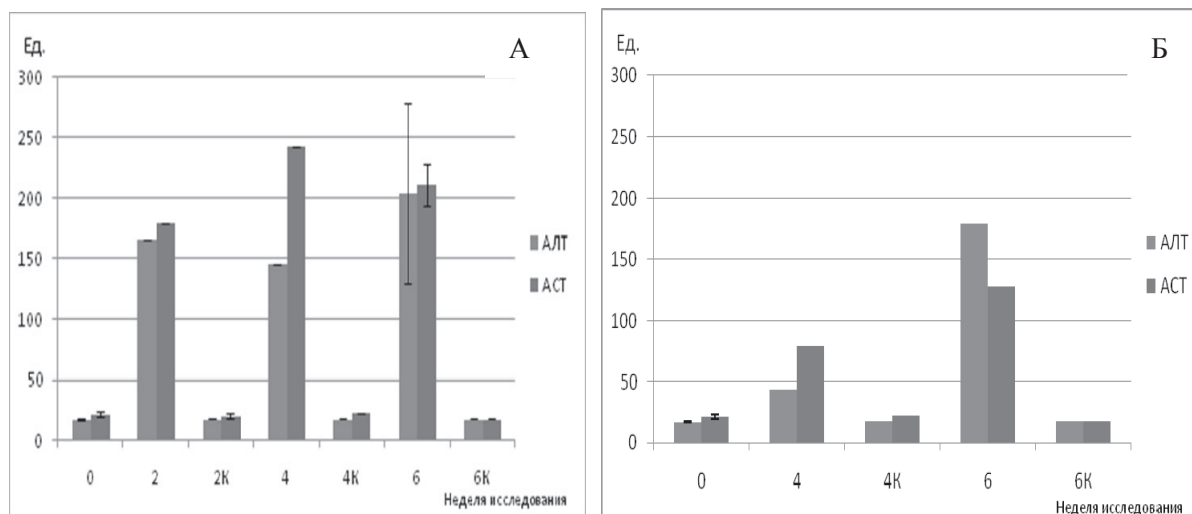


Рис. 1. Динамика изменений биологических показателей крови (АСТ и АЛТ) крыс линии Wistar при воздействии CCl_4 :: А) группа 3-х месячных крыс; Б) группа 8-месячных крыс

В результате гистологического анализа тканей печени было отмечено, что, у 3-х месячных крыс уже после 2 недель эксперимента в области портальных зон наблюдаются заметные очаговые изменения, как в паренхиме так и

строме печени. Соединительнотканые прослойки стромы довольно расширены и содержат стромальные клетки, возможно, фибробласты, а также лимфоциты и эритроциты.

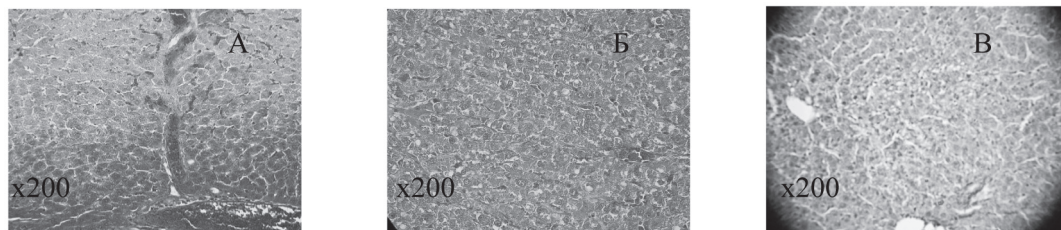


Рис. 2. Динамика развития фиброза и цирроза печени крысы после внутривенного введения СС14: А) печень крысы контрольной группы; Б) печень 3-х месячной крысы через 4 недели; В) печень 8-ти месячной крысы через 6 недель

Спустя 4 недели, у 3-х месячных крыс в центральных отделах долек наблюдаются участки некроза, гепатоциты в состоянии жировой дистрофии. Непрерывная гибель клеток стимулирует регенерацию этого органа, что неизбежно ведет за собой разрастание соединительной ткани в печени, при котором изменяется ее дольковая структура и сосудистая система (рис. 2, Б). Сходную динамику соединительной ткани и паренхимы в ходе развития цирроза у крыс наблюдали и другие авторы [2, 3]. Через 6 недель строение долек оказывается полностью нарушенным. Некроз захватывает более 2/3 портального тракта.

Данные изменения наблюдались в тканях цирротической печени 3-х месячных крыс, в то время как у 8-ми месячных животных, если и наблюдались изменения, то не все и в меньшей степени (рис. 2, В). Это объясняется тем, что возникновение свободных радикалов в результате ПОЛ в более старом организме происходит не с такой скоростью, как в молодом [7].

Данные ультразвукового исследования

(УЗИ) у 3-х месячных крыс через 6 недель после введения СС14 установили повышение эхогенности паренхимы, свойственные для жировой инфильтрации, фиброза, наличие портальной гипертензии со значительным расширением воротной и селезеночной вен, усилением в них кровотока, а также признаки нефропатии (гепаторенального синдрома).

К сожалению, четкие клинические особенности различных форм заболеваний печени отсутствуют, что существенно затрудняет диагностику. А по данным УЗИ одним из частых диагнозов является жировая дистрофия печени, которая способствует многим заболеваниям печени [6]. Поэтому признаки жировой дистрофии под УЗД печени в группе 8-ми месячных крыс через 6 недель эксперимента нельзя 100% расценивать, как цирроз, или промежуточную его форму – фиброз. Остальные органы животных 8-ми месячной группы были в норме и кровотоков главных вен и артерий органов у них не был изменен.

Выводы

1. У животных 3-х месячного возраста хроническое отравление СС14 через 6 недель приводит к развитию заболевания цирроза печени, сходным по этапам развития и формам проявления с таковыми у человека.

2. В перспективе представится возможность использовать эту модель в разработках более эффективных методов лечения этой болезни.

Литература

1. Бабак О.Я. Проблема филогенеза неалкогольной жировой болезни печени // Сучасна гастроентерологія. – 2007. – №4. – С. 4–10.
2. Безбородкина Н.Н., Оковитый С.В., Кудрявцева М.В., Кирик О.В., Зарубина И.В., Кудрявцев Б.Н. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени крыс // Цитология. – 2008. – Т. 50, №3. – С. 228–236.

3. Джояшвили Н.А., Калилина Н.И., Белоглазова И.Б. и др. Генная терапия фактором роста гепатоцитов приводит к регрессии экспериментального фиброза печени // РЖГГК. – 2010. – №4. – С. 22–28.
4. Назар П.С., Осадча О.І., Левон М.М. Зміни біохімічних показників загального аналізу крові в осіб із алкогольним ураженням печінки // Буковинський медичний вісник. – 2012. – Т. 16, №1. – С. 59–62.
5. Пат. України, № заявки U 2012 09526 Спосіб експерименту для моделювання біологічних процесів / Бубнов Р.В., Співак М.Я., Жолобак Н.М. (вх. № 975762, 06.08.2012).
6. Смольякова В.И., Плотникова М.Б., Чернышева Г.А., Иванов И.С., Просенко А.Е., Кандалинцева Н.В. Антиоксидантные эффекты тиофана при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном // Экспериментальные и клинические исследования. Бюллетень сибирской медицины. – 2010. – №5. – С. 98–101.
7. Топчий Н.В., Топорков А.С. Эссенциальные фосфолипиды — выбираем оптимальный вариант? [Электронный ресурс]. Независимое издание для практикующих врачей. – 2013. – Режим доступа: http://www.rmj.ru/articles_8536.htm

GULKO T.P.¹, DRAGULYAN M.V.¹, RYMAR S.E.¹, KORDYUM V.A.¹, LEVKIV M.U.², BUBNOV R.V.^{3,4}

¹*Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine*

Ukraine, 03143, Kyiv, str. Akad. Zabolotnogo 150, e-mail: kordium@imbg.org.ua

²*Kievsky National University Taras Shevchenko*

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str, 64

³*Institute of Microbiology and Virology. DK Zabolotny NAS of Ukraine*

Ukraine, 03143, Kyiv, str. Akad. Zabolotnogo 154

⁴*Tsentr ultrasound and sonography intervetsionnoy Clinical Hospital "Theophany" of the State Administration*

Ukraine, 036803, Kyiv, str. Akad. Zabolotnogo 21

⁵*State Institute of Genetic and Regenerative Medicine National Academy of Medical Sciences of Ukraine 04114, Kyiv, 67 Vishgorodska str.*

SIMULATION OF LIVER CIRRHOSIS IN RATS WISTAR DIFFERENT AGES

Aim. Getting a model of cirrhosis in male Wistar laboratory rats of different ages. **Methods.** Obtaining models of liver cirrhosis in rats of Wistar 3 and 8 months of age, and was carried out by intraperitoneal injection of 30% animal oil solution of CCl₄ (0,01 ml/kg) 1 day a week. The dynamics of the disease studied biochemical (measurement of ALT, AST), cytology (blood count), histological and radiological (SPL) methods. **Results.** Based on the analysis of a model of cirrhosis in rats of different ages, from 3-month animals were observed formation of necrosis in the second week of liver fibrosis on the fourth week, finally cirrhosis formed on the second week of the experiment. The old 8-month rat or the 2nd or the 4th week CCl₄ administration changes in the structure of the liver was observed. By the 6-week experiment histology showed the appearance of minor changes in the structure of the liver, similar to the beginning of the development of necrosis in the periphery of the body. **Conclusions.** Analysis of studying the characteristics of a model of cirrhosis of the liver in rats of different ages above mentioned methods can be considered animal model induced by 3 months of age, as close to human disease, and use it in the future for the development of more effective treatments for this disease.

Key words: hepatic necrosis, fibrosis, cirrhosis, rats Wistar, age factor.

ЄФІМЕНКО Т.С., АНТОНЮК М.З., МАРТИНЕНКО В.С.

Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України

Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

СТВОРЕННЯ ЧУЖИННО-ЗАМІЩЕНИХ ТА ЧУЖИННО-ДОДАНИХ ЛІНІЙ *TRITICUM AESTIVUM* / *AEGILOPS MUTICA*

Aegilops mutica Boiss (*Amblyopyrum muticum* (Boiss) Eig), однорічний дикорослий родич пшениці, є стійким до грибних захворювань, в тому числі до листової іржі та борош-

нистої роси. На сьогодні саме борошніста роса м'якої пшениці є однією з найбільш суттєвих хвороб пшениці у країнах з помірним кліматом, в тому числі і в Україні. Сучасні сорти пшениці

захищені від ураження збудника борошнистої роси генетично, переважно генами *R (Pm)* вертикальної стійкості, які хоча і забезпечують повну резистентність рослин пшениці, проте швидко долаються новими расами збудника через постійну коєволюцію двох спряжених генетичних систем. Тому питання залучення до генофонду пшениці нових генів *Pm* не втрачає своєї актуальності. Кількість ідентифікованих генів *Pm* досягла вже 43, переважна частина їх — чу-

Матеріали і методи

Геномно-заміщений амфідиплоїд Авротика, сорт озимої м'якої пшениці Аврора, гібриди F_1 , F_2 , F_3 та F_4 від схрещування Авротика х Аврора (рис. 1). Гібриди F_1 було отримано шляхом штучної гібридизації, материнською рослиною була Авротика. Гібриди наступних поколінь отримували через самозапилення індивідуальних колосів під ізоляторами. Фертильність рослин визначали на головному колосі виходячи з очікуваної кількості 2 зернівки на колосок. Індивідуальні рослини F_2 – F_4 оцінювали за стійкістю до борошнистої роси та ознаками морфології, що за ними було виявлено градації, інші, ніж у сорту Аврора: остистість, форма, щільність колосу, колір зеленої та зрілої рослини, опушення рослини, жорсткість колоскової луски та роз-

Результати та обговорення

Лінії м'якої пшениці було створено нами з застосуванням методу «змішування» хромосом двох чужинних геномів у гексаплоїдному гібриді між двома пшеничними формами, які мають однаковий субгеном AABV та розрізняються лише третім субгеномом [3]. Гексаплоїд Авротика (AABVTT) є амфідиплоїдом тетраплоїдного компоненту AABV м'якої пшениці сорту Аврора та диплоїдного егілопсу *Ae. mutica* (TT). Авротика характеризується резистентністю до польових популяцій борошнистої роси та листової іржі, а за зимостійкістю помітно перевершує всі сучасні сорти м'якої пшениці, які вирощувались у полі в однакових з нею умовах. Згідно до методу змішування геномів було отримано гібрид F_1 між Авророю та Авротикою, стійкий до борошнистої роси (рис. 1). Подальша робота з матеріалом залежала від фертильності рослин F_1 : якби вони були самостерильними, потрібно було б бекросувати їх з Авророю, як це робилося раніше при створенні інтрогресивних ліній

жинного походження. Найбільш розповсюдженими та тривалими за терміном збереження стійкості до патогену є гени егілопсів секції *Sitopsis*. Щодо *Ae. mutica*, двома дослідницькими групами підтверджено перспективу створення інтрогресивних ліній пшениці, стійких до борошнистої роси за рахунок інтрогресій від *Ae. mutica*: на базі геному *Triticum dicoccum* [1] та геному м'якої пшениці Чайніз Спринг [2].

поділ на ній пігменту, ламкість колосового стрижня. Хромосомні числа рослин F_2 – F_4 визначали у метафазі мітозу на тимчасових чавлених препаратах первинних корінців пшениці за загальноприйнятою методикою.

Геномну ДНК виділяли на методикою з буфером на основі СТАВ. Дот-блот-гібридизацію проводили у відповідності до рекомендації виробника набору реактивів (Fermentas, Литва). ПЛІР проводили: 30 мкл реакційної суміші містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезокситрифосфату, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1,2 у Taq-полімерази (Fermentas, Литва), умови проходження ампліфікації — у відповідності до рекомендацій оригінатора певного SSR-локусу.

— похідних Авролати (AABBUU) та Аврозису (AABBS^{sh}S^{sh}). Гібриди AABBDT виявилися самофертильними, якими були свого часу гібриди між Авродесом (AABBSS) та Авророю. Із насіння F_2 паростки вдалось отримати та визначити їх хромосомні числа в 137 випадках (табл. 1), з них в полі було вирощено лише 97 рослин, насіння від самозапилення отримали від 76 рослин з кількістю хромосом від 37 до 46. Фертильність ізольованих колосів на рослинах F_1 та таких, що залишилися без ізоляторів, була однаковою, варіюючи від 1,5% до 18% озерненості (табл. 1). Перевірка електрофоретичних спектрів гліадинів показала, що у білкових спектрах зернівок F_2 не було таких компонентів, походження яких не можна було б зв'язати з Авротикою чи Авророю, що вказує на відсутність перезаплення навіть на неізольованих колосах. Тем не менш, насіння, отримане на неізольованих колосах рослин F_1 , в подальшій роботі не використовували.

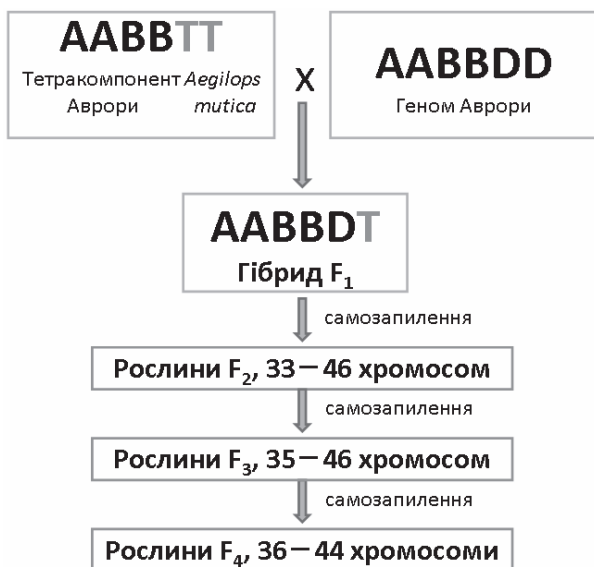


Рис. 1. Схема створення ліній *T. aestivum* / *Ae. mutica* методом «змішування» хромосом третього субгеному у гібриді F₁ між сортом м'якої пшениці (Аврора) та генотипом амфідиплоїдом Авротика, геном якого містить тетраплоїдний компонент AABB сорту Аврора та геном TT егілопса

Цитогенетичний механізм формування ліній, де цілі хромосоми егілопса заміщують хромосоми пшеничного субгеному D або додаються до повного геному пшениці, полягає у наступному. Теоретично, в M1 мейозу МКП рослин F₁ з генотипами формулами AABBDT або AABBDS має бути 14 бівалентів та 14 унівалентів, оскільки хромосоми геному D не мають кон'югувати з хромосомами T або S. У анафазі для будь-якого унівалента реалізується одна з трьох імовірностей: залишитися у цитоплазмі (за даними літератури, 0,5), відійти до одного полюсу веретена поділу (0,25), відійти до іншого полюсу (0,25). В двох останніх випадках унівалент бере участь у створенні гамет, проте різних. Оптимальна умова формування гексаплоїдної зиготи — об'єднання 21-хромосомних гамет, а це за вказаних умов є подією низькоімовірною. Саме тому гібриди F₁ з різними третіми субгенами характеризуються самотерильністю, якщо не працює якийсь механізм, який дозволяє кон'югувати хромосомам D з хромосомами егілопса. У M1 мейозу МКП гібрида AABBDT

спостерігали збільшення кількості бівалентів проти очікуваної та формування насіння від самозапилення рослинами F₁. Раніше, коли створювали чужинно-заміщені лінії на основі Авродесу, появу у метафазі 1 мейозу МКП F₁ зайвих бівалентів можна було пояснити наявністю у гібриді F₁ AABBDS геному S, який пригнічує дію гена *Ph1* та сприяє тим самим кон'югації гомеологічних хромосом. Про геном T відомо, що при схрещуванні *Ae. mutica* з видами егілопсу, які несуть геном D, у гібридах F₁ хромосоми T геному кон'югують з хромосомами геному D майже регулярно [4, 5]. Саме цим слід пояснювати збільшення кількості бівалентів проти очікуваних 14 у гібридах F₁ між Авророю та Авротикою. Мультивалентів у M1 МКП таких гібридів не спостерігали, так що немає підстав вважати, що геном T сприяє кон'югації негомологічних хромосом. Можливо, що саме кон'югацією хромосом T та D в гібридах F₁ та F₂ від схрещування Авротика x Аврора пояснюється висока самофертильність гібридних рослин і велика кількість 42-хромосомних паростків F₃ та F₄.

Таблиця 1. Самофертильність та розкид хромосомних чисел у поколіннях F₂ – F₄ від схрещування Авротика x Аврора

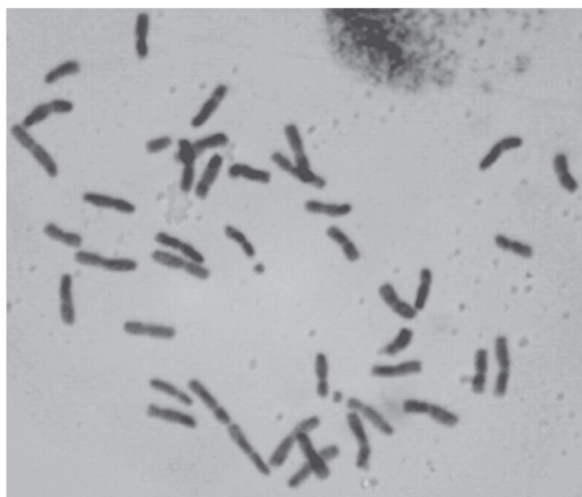
Покоління	Фертильність		Кількість паростків з кількістю хромосом													
	мін.	макс.	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
F ₂	1,5	18	2	2	7	4	5	17	12	31	24	17	8	6	1	1
F ₃	8,5	49,5	—	—	—	—	8	12	10	44	92	36	28	8	3	—
F ₄	20,5	80	—	—	—	1	1	13	24	81	142	47	12	6	—	—

Для створення чужинно-заміщених ліній становлять інтерес лише рослини з такими числами хромосом, від яких у перспективі можна отримати 42-хромосомні еуплоїди. Розкид хро-

мосомних чисел у рослин F₂, що визначали у первинних корінцях паростків, був від 33 до 46 хромосом, хоча не всі були життєздатними та фертильними. Для вирощування та отримання

насіння генерації F_3 добирали рослини з кількістю хромосом не меншою, ніж 40, найбільш перспективних для створення гексаплоїдних ліній. 40-хромосомна рослина може бути подвійним моносоміком, який є потенційним засновником двох різних чужинно-заміщених ліній, лише б був життєздатним та самофертильним. Однак процес формування гібридних геномів не обмежується лише сортуванням хромосом двох різних геномів, він може супроводжуватися між- та

–внутрішньохромосомними перебудовами у гібридному геномі. Це припущення частково засвідчується вже простим спостереженням метафазних пластинок. Крім гексаплоїдних рослин з наявністю, за даними дот-блот гібридизації, чужинного хроматину, зустрічаються паростки, хромосомний набір яких включає телоцентрики, три супутникові хромосоми замість двох, телоцентрики з супутниками (рис. 2).



а)



б)

Рис. 2. Метафазні пластинки у клітинах корінців паростків F_4 . а) 42 хромосоми, одна з яких є телоцентричною; б) 44 хромосоми, в тому числі один телоцентрик та три хромосоми із спутниками

З 92 рослин F_3 , оцінених у польових умовах 2010 року, 44 були стійкими до борошнистої роси. Від 32 з них отримали насіння, у паростках яких визначили кількість хромосом, що варіювала від 40 до 42. Три рослини виявилися 42-хромосомними стійкими лініями, що не розщеплюються за кількістю хромосом.

Загалом, розмах варіювання за кількістю хромосом у F_4 був 36–44, сім рослин серед них були такими, що дали тільки 42-хромосомних нащадків. Проведення процедури дот-блот гібридизації з зондом, виготовленим із ДНК *Ae. mutica*, свідчить, що всі вони дають позитивну реакцію гібридизації своєї геномної ДНК з таким зондом, тобто мають у складі геному хроматин геному Т. З цими 42-хромосомними рослинами вже можна починати роботу з визначення кількості чужинних заміщень та їхнього обсягу через вивчення асоціації хромосом у М1 МПК мейозу. Після цього можна переходити до ідентифікації гомологічної належності чужинних включень [6]. Для цього планується застосування хромосомно-специфічних біохімічних генів-маркерів та SSR-маркерів, локалізованих, за літературним і даними у хромосомах геному

Д м'якої пшениці. На сьогодні перевірено можливість застосування мікросателітних локусів, специфічних до хромосом 5-ої гомологічної групи пшениці для пошуку поліморфізму серед рослин F_4 у порівнянні з Авророю та Авротикою та показано, що кілька таких локусів цілком придатні для скринування матеріалу, з яким працюємо (рис. 3).

Рослини з кількістю хромосом більше 42 залишали для подальшого самозапилення як цінне джерело множинних чужинних заміщень. Під лініями з множинними чужинними заміщеннями ми маємо на увазі такі лінії, які мають більше однієї чужинної хромосоми, яка замістила хромосоми субгеному D. Власне саме для цього Є.Г. Жировим і було запропоновано та розроблено метод змішування хромосом в одному з трьох субгеномів гексаплоїдного гібриду від схрещування двох гексаплоїдів, які відрізнялися один від одного лише одним з трьох субгеномів. Необхідність створення інтрогресивних ліній з множинними інтрогресіями можна пояснити наступними міркуваннями. Далеко не всі ознаки, за якими ми прагнемо покращити м'яку пшеницю, використовуючи для цього чужинні

гени, контролюються одним геном, який можна перенести у одному фрагменті чужинної хромосоми, тобто у транслокації. До таких генів відносяться перш за все гени вертикальної стійкості до стресових чинників біотичної природи. У нашому випадку, при роботі з Авротикою, дуже бажаним є створення гексаплоїдних ліній, стійких до борошнистої роси та листової іржі. Можна йти звичайним шляхом, тобто створити окремі лінії, одна з яких буде стійкою до борошнистої роси, а інша – до листової іржі, а потім схрещувати їх з сучасними сортами м'якої пшениці, прагнучи об'єднати дві транслокації в од-

ному генотипі. А можна спробувати відібрати лінію з двома чужинними хромосомами або транслокаціями, одна з яких несе ген стійкості до борошнистої роси, а інша – до листової іржі. Тобто, у даному випадку є вибір між двома шляхами роботи з лініями, і який з них дасть кращі результати, покаже лише практика. Все ж, першим кроком у такій роботі є створення гексаплоїдних ліній з чужинними інтрогресіями, які будуть схрещуватися з м'якою пшеницею без обмежень та давати фертильні гібриди, серед нащадків яких ми будемо шукати рослини з бажаними властивостями.

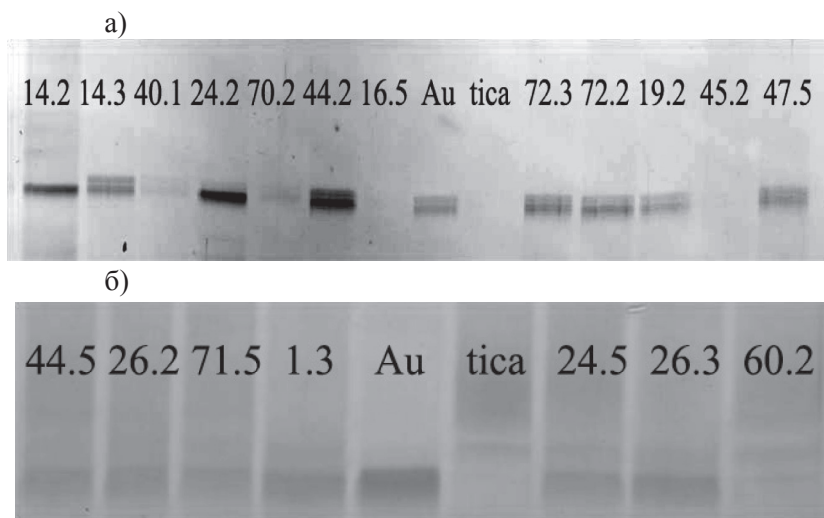


Рис. 3. Поліморфізм за алелями мікросателітних маркерів між генотипами Аврора (Au), Авротика (tica) та серед гексаплоїдних ліній: а) локус *Xcfd189-5D*, лінії 40.1, 70.2, 16.5, 45.2 подібні до Авротики; б) локус *Xbarc205-5D*, лінія 60.2 подібна до Авротики

Проте є інші важливі агрономічні ознаки, покращити за якими м'яку пшеницю також було б бажано. Це ознаки стійкості до стресових чинників абіотичної природи. Про такі ознаки вже добро відомо, що їхній генетичний контроль практично ніколи не буває моногенним, а здійснюється в результаті експресії принаймні кількох генів, які утворюють так звані генні мережі. Щоб перенести у геном хоча б кілька ключових генів, що утворюють такі мережі, навіть теоретично потрібно починати роботу з таким геномом, який має кілька чужинних заміщень. Авротика на відміну від усіх інших геномно-заміщених амфідиплоїдів, створе-

них свого часу Жировим та Терновською [3], характеризується видатною зимо-морозостійкістю. Чи пояснюється ця її властивість генами, що їх несе власне субгеном Т, чи має місце взаємодія між генами егілопсу та генами, що їх містить тетраплоїдний компонент ААВВ генотипу Аврора, який входить до складу генома Авротики, на це питання відповіді поки ще немає. І шукати його потрібно через створення інтрогресивних ліній, які за зимо-морозостійкістю будуть наближатися до Авротики, суттєво перевищуючи за цим показником сорти м'якої пшениці.

Висновки

Показано ефективність застосування методу «змішування» хромосом третього субгеному для створення гексаплоїдних ліній *T. aestivum* / *Ae. mutica* з хромосомами егілопса, які замінили хромосоми пшениці. Факт наявності чужинних інтрогресій у складі геному інтрогресивних ліній засвідчується перш за все наяв-

ністю чужинних градацій ознак морфології рослин та стійкістю до борошнистої роси. Дот-блот гібридизація геномної ДНК ліній та геномної ДНК *Ae. mutica* підтверджує наявність чужинного хроматину у геномі ліній. Самофертильність гібридів між Авротикою та Авророю починаючи з F₁ полегшує процес створення та сприяє збе-

реженню чужинних хромосом у гібридних геномах завдяки відсутності беккросування з рекурентним генотипом Аврора, яке є

обов'язковим елементом методу при самостерильності гібридів.

Література

1. Panayotov I., Tsujimoto H., Fertility restoration and NOR suppression caused by *Aegilops mutica* chromosomes in alloplasmic hybrids and lines // *Euphytica*. – 1997. Vol. 94, №2. – P. 145–149.
2. Eser V. Characterisation of powdery mildew resistant lines derived from crosses between *Triticum aestivum* and *Aegilops speltoides* and *Ae. mutica* // *Euphytica*. – 1998. – Vol. 100. – P. 269–272.
3. Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // *Вестник с.-х. науки*. – 1984. – №10. – С. 58–66.
4. Jones J.K., Majisu B.N. The homoeology of *Aegilops mutica* chromosomes. // *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. – 1968. – Vol. 10, №3. – P. 620–626.
5. Ohta S. Phylogenetic relationship of *Aegilops mutica* Boiss. with the diploid species of congeneric *Aegilops-Triticum* complex, based on the new method of genome analysis using its B-chromosomes // *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.* – 1991. – №137. – P. 1–116.
6. 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.

T.S. IEFIMENKO, M. Z. ANTONYUK, V.S. MARTYNYENKO

National University of “Kyiv-Mohyla Academy”

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: centaureinae@gmail.com

DEVELOPMENT OF ALIEN-SUBSTITUTION AND ALIEN-ADDITION *TRITICUM AESTIVUM* / *AEGILOPS MUTICA* LINES

Aims. Development of *T. aestivum* / *Ae. mutica* introgressive lines and their assessment for powdery mildew resistance and morphological characters. **Methods.** Artificial hybridization, determination of chromosome numbers at mitosis metaphase, PCR, dot-blot hybridization of genome DNA. **Results.** AABBDT hybrid was sufficiently self-fertile; therefore, progeny derived from its self-pollination were used for the development of introgressive lines, according to chromosome mixing method. Avoidance of backcrossing to recurrent parent provided maximal retention of *Aegilops* chromosomes in progeny used for introgressive lines development. **Conclusions.** Derived introgressive lines are appropriate for the following identification of quantity and amount of alien introgressions and determination of their homoeological identity.

Key words: wheat introgressive lines, *Ae. mutica*, powdery mildew, frost resistance.

КОВАЛЬЧУК М.В.¹, ГУЛЬКО Т.П.^{1,2}

¹ *Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины*

Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150, e-mail: kovmv@ukr.net

² *ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины»*

Украина, 04114, Киев, ул. Вишгородская, 67

МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ICR, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОЙ К СПОНТАННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ

Онкозаболевания занимают одно из первых мест в структуре заболеваний во всем мире. Несмотря на успехи в изучении механизмов канцерогенеза и усилия по разработке методов ранней диагностики и лечения, онкопатологии остаются одними из важнейших проблем современной медицины. Разработка новейших технологий лечения требует предварительных тщательных экспериментальных исследований, не-

заменимую роль в которых выполняют лабораторные животные. Поэтому создание адекватных моделей карцерогенеза на животных является актуальным.

Тот факт, что клетки приобретают генетические и эпигенетические нарушения, способствующие опухолевой прогрессии, является доказанным [1]. Известно, что изменение ряда факторов окружающей среды приводит к дестаби-

лизации генома и генетическая нестабильность может иметь разные проявления. С одной стороны – это запрограммированные перестройки генома. С другой стороны – это спонтанные, дестабилизирующие геном, перестройки, которые выявляются при онкогенезе и других патологических состояниях [2]. Например, при сравнении нормальных клеток и клеток спорадического рака прямой кишки показано, что последние содержат до 10 тысяч изменений на клетку, указывая на масштабность изменений генома онкоклетки и причастность механизмов дестабилизации генома [3].

Геномная нестабильность может быть разделена на хромосомную и микросателлитную нестабильность (МН), которая является следствием нарушения репарации ошибок спаривания азотистых оснований во время репликации, в результате которой в дочернюю цепь ДНК встраиваются некомплементарные нуклеотиды матричной цепи нуклеотиды. Микросателлиты особенно предрасположены к репликативному смещению ДНК, вызванному неправильным взаимодействием между комплементарными цепями [4]. Несмотря на тенденцию к ошибкам, имеющим место во всех делящихся клетках, микросателлиты остаются стабильными по длине благодаря эффективности репарации ДНК. При повреждении пострепликативной репарационной системы микросателлиты аккумулируют ошибки и становятся длинее или короче на один или несколько повторов. Появление таких изменений в индивидуальных ДНК определяется как МН, которая предполагает дефекты в клеточных системах, поддерживающих стабильность генетической информации. Эти генетические изменения экспериментально детектируются при анализе ПЦР-продуктов, полученных к изучаемым микросателлитам.

Геномная нестабильность, как реакция клеток на изменение микроокружения, может

Материалы и методы

Исследования проводили на препаратах ДНК из лейкоцитов периферической крови отдельных особей онкогенной популяции мышей сублинии ICR, а также линий BALB/c, C57BL/6 вивария Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Изменения в микросателлитном локусе детектировались посредством ПЦР. Забор периферической крови производили из хвостовой вены. Тотальную ДНК из лейкоцитов периферической крови отдельных мышей выделяли путем высаливания с 6М NaCl после инкубации с про-

быть выявлена на самых ранних стадиях карцерогенеза, еще до приобретения клетками онкогенного фенотипа [5]. Удобным и высокоинформативным генетическим инструментом в выявлении таких измененных участков ДНК является монолокусный анализ микросателлитов, в котором анализируются ядерные маркеры, которые наследуются кодоминантно: каждый из двух аллелей локуса может быть идентифицирован и проанализирован. Это означает, что для каждого генного локуса возможно определить, является ли данная особь гетерозиготой или гомозиготой, в чем и заключается неоспоримое преимущество этих маркеров над RAPD, IS-PCR, AFLP и ISSRPCR. В монолокусном анализе праймеры подбираются на участки, фланкирующие микросателлит, следовательно, амплифицируется и анализируется сам микросателлит. Длина микросателлитов варьирует в популяции, но наследуется как стабильная аллель.

В число самых частых нарушений в эпителиальных опухолях входят как гомозиготные, так и гетерозиготные делеции, для обнаружения которых используют монолокусный анализ микросателлитов. На протяжении многих лет в ряде наших исследований использовались мыши сублинии ICR, склонные к злокачественным новообразованиям, в основном, аденокарциномам. Исходя из предположения о том, что МН может быть рассмотрена как полезный маркер генетической изменчивости, выявляющий дестабилизацию генома в заданных локусах, целью настоящего исследования было изучение МН в высокополиморфном микросателлите, включающем тандемные повторы из двух тетра-нуклеотидных единиц, TGGA и GGCA, локализованных на 3' конце второго интрона гена *Eb*, экспрессирующего антигены второго класса H2 локуса генома мыши (главный комплекс гистосовместимости) при длительных экспериментах в онкогенной популяции.

назой в течение ночи. Выявление полиморфизма микросателлита в локусе гена *Eb* проводили с использованием праймеров f(5'-CGACTGTAGAACCTTAGCCTG-3') и r(5'TGGAGCTGTCCTCCTTGAG-3') [6].

Реакционная смесь для ПЦР содержала 10x буфер, 1,8 мМ хлорид магния, 0,20мМ нуклеотидтрифосфаты, 0,25мкМ праймеры и Taq-полимеразу «Fermentas» (Литва). Реакцию проводили по следующей программе: денатурация при 95°C – 30с, отжиг при 60°C – 30с и элонгация при 72°C – 30с. Продукты ПЦР разделяли в

10% ПААГ с последующей визуализацией в ультрафиолетовом освещении с использованием бромистого этидия. Потеря гетерозиготности (аллельная делеция) регистрировалась как полное или частичное (не менее 50%) отсутствие одного из аллелей в треке, соответствующем ДНК из лейкоцитов периферической крови особей из онкогенной популяции, по сравнению с треком ДНК, где сохраняются оба аллеля. Мик-

Результаты и обсуждение

На протяжении нескольких лет в ряде наших исследований, требующих генетической стандартности, обеспечивающих воспроизводимость результатов, нами использовались половозрелые мыши (2-2,5 мес.) сублинии ICR, которая является потомством аутбредной популяции, полученной в Институте онкологических исследований (США), и поддерживающейся путем скрещивания между sibсами. Эта линия выведена для изучения механизмов развития злокачественных новообразований. Особи поддержи-

росателлитная нестабильность определялась как смещение в электрофоретической подвижности одного или нескольких аллелей. В случае гомозиготных аллелей выявляется лишь одна полоса, соответствующая двум аллелям одного размера. Такие пробы признаются неинформативными, поскольку делецию одного из аллелей обнаружить невозможно.

ваемой популяции характеризуются высокой частотой обнаружения спонтанных новообразований, достигающей почти 80 % от эффективного числа животных в возрасте старше 1 года. У животных по результатам гистологического анализа диагностируются, в основном, аденокарциномы. У значительной части животных возникают множественные опухоли (рак молочной железы, новообразования лимфоидной системы), которые располагаются на разных частях тела (рис. 1 а, б).

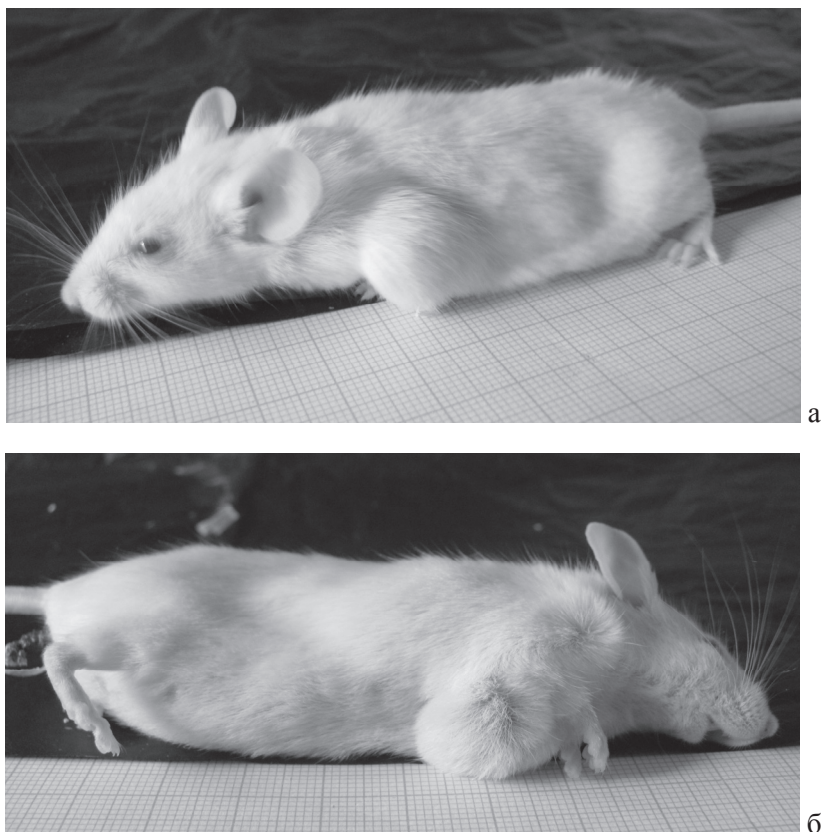


Рис. 1. Самки высокораковой сублинии ICR с опухолями

В литературе описана цитогенетическая нестабильность в клетках костного мозга животных сублинии ICR, которая проявлялась еще до реализации неопластических потенциалов (анеплоидия, хромосомные aberrации). Отмечено

также увеличение пролиферативной активности клеток костного мозга при опухоленосительстве [7]. Нами также наблюдалось двукратное увеличение лейкоцитов периферической крови у животных онкогенной популяции, что могло

свидетельствовать об изменениях в иммунной системе. По литературным данным известна высокая стабильность аллелей микросателлита гена *Eb* у ряда линий. Тем не менее, индивидуальный анализ животных ICR показал генетические изменения в локусе. Микросателлитный локус был протестирован на 50-60 особях популяции. В качестве контроля в анализ были включены мыши лабораторных линий C57BL/6 и BALB/c, у которых на протяжении всего исследования изменения в микросателлите не обнаруживались. Стабильность микросателлита второго интрона гена *Eb* в контрольных линиях указывала

также на отсутствие артефактов при проведении ПЦР за счет эффекта "проскальзывания" в процессе амплификации. Также не было выявлено присутствия неамплифицирующихся «нулевых» аллелей, появляющихся при мутациях в участках, фланкирующих микросателлит.

Типичные варианты генетического изменения микросателлита представлены на электрофореграммах продуктов амплификации ДНК отдельных особей сублинии ICR, полученных с помощью праймеров к вариабельным последовательностям микросателлита гена *Eb* (рис. 2 а, б, в, г).

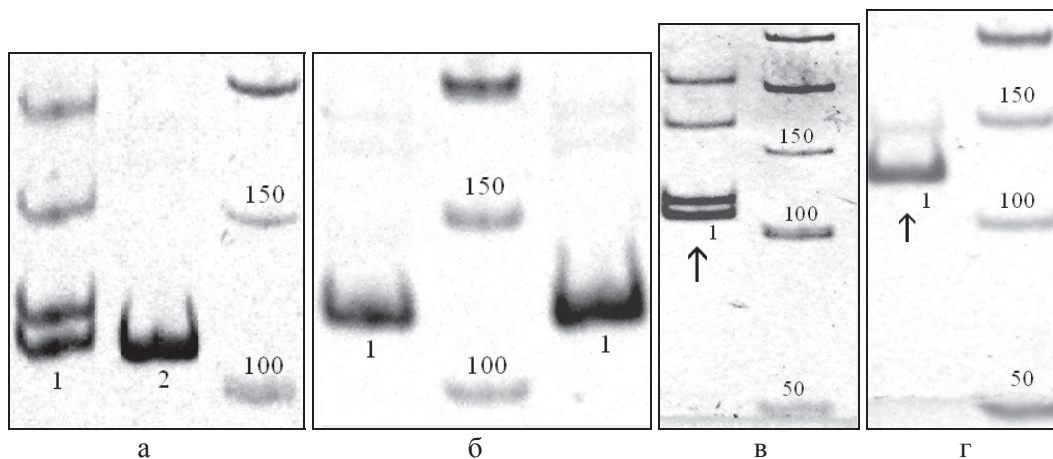


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК отдельных особей сублинии ICR, полученных с помощью праймеров к вариабельным последовательностям микросателлита гена *Eb* : 1 – линия ICR; 2 – линия C57BL/6; 3 – маркер 50 bp DNA Labe (Fermentas). Стрелками обозначены случаи микросателлитных изменений

Выводы

Выявленные изменения длины микросателлита, а также делеция аллеля у мышей ICR при разделении продуктов ПЦР в 10% ПААГ могут свидетельствовать как о ранних изменениях в геноме, предшествующих развитию кар-

церогенеза, так и об генетических изменениях в популяции, предрасположенной к канцерогенезу и поддерживаемой путем скрещивания между сибсами.

Литература

1. Shah S.N., Hile S.E., Eckert K.A. Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 431-435.
2. Charames G.S., Bapat B. Genomic instability and cancer // *Curr. Mol. Med.* – 2003. – Vol. 3. – P. – 589-596.
3. Stoler D., Chen N., Basik M., Kahlenberg M., Rodriguez-Bigas M., Petrelli N., Anderson G. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 15121 – 15126.
4. Ellegren H. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference // *Trends. Genet.* – 2000. – Vol. 16. – P. 551-558.
5. Gorgoulis V.G., Vassiliou L.V.F., Karakaidos P. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions // *Nature.* – 2005. – Vol. 434. – P. 907-913.
6. Saha B.K., Shields J.J., Miller R.D., Hansen T.H., Shreffler D.C. A highly polymorphic microsatellite in the class II *Eb* gene allows tracing of major histocompatibility complex evolution in mouse // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1993. – Vol. 90. – P. 312-316.
7. Ковалева О.А., Вагина И.Н., Морозова Л.М., Глазко Т.Т., Глазко В.И. Генетическая нестабильность и предрасположенность к развитию опухолей у лабораторных линий мышей // *Доп. Нац. акад. наук України.* – 2007. – №2. – С. 158 – 162.

KOVALCHUK M.V.¹, GYLKO T.P.^{1,2}

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail: kovmv@ukr.net

² State Institute "Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine"
Ukraine, 04114, Kiev, Vyshgorodska, 67

MICROSATELLITE INSTABILITY IN ICR MOUSE STRAIN, PREDISPOSED MALIGNANT SWELLINGS

Aims. Microsatellite instability (MSI) is a form of genomic instability frequently detected in many types of tumors. However, the involvement of MSI in cancer development in the population ICR mouse strain has not been investigated. The aim of this work was to determine the reveal of loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI) and to evaluate the possibility of using LOH and MSI as molecular markers for the detection of genomic alterations. **Methods.** Genomic DNA obtained from peripheral blood lymphocytes from each animals was subjected to PCR using specific primers. The PCR products were separated by 10% non-denaturing PAGE and analyzed for the presence of LOH and MSI. **Results.** The presence of these microsatellite alterations was related both to the carcercous phenotype and to the mouse strain. **Conclusion.** This study has demonstrated that microsatellite alterations occur in a part of ICR population but our data need further validation with a larger number of microsatellite loci and enhanced method for MSI identification.

Key words: microsatellite instability, loss of heterozygosity, tumorigenesis.

КОЗЕРЕЦЬКА Д.І., СЕРГА С.В., ДЕМИДОВА А.С., ШКЛЯР С.Є., КОЗЕРЕЦЬКА І.А.

ННЦ «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна,
01601, м. Київ, вул. Володимирська 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

НОВО ТРАНСПОЗОН В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) є поширеними в природних популяціях *Drosophila melanogaster* [1]. Сьогодні існує думка, що автономні генетичні елементи слід вважати драйверами еволюції геномів [2]. Виходячи з цього вкрай важливим є дослідження динаміки поширення МГЕ в природних популяціях плодових мух як у просторі, так і у часі. Відомо, що частина МГЕ, такі як *P* та *hobo* транспозони, є активними в даний період дослідження в природних популяціях дрозофіл [3, 4], тому вони становлять особливий інтерес, як МГЕ, які почали інвазію геномів представників природних популяцій [5, 6] в період початку дослідження популяційних процесів в природних популяціях *D. melanogaster* [7] і, таким чином, можуть обумовлювати, частково, чи повністю, процеси, які в них спостерігаються.

hobo транспозон був вперше клонований та охарактеризований McGinnis et al. [8]. Подальший аналіз даного елемента виявив варіанти у послідовностях нуклеотидів кодуючої частини гена транспозази, що веде до варіантів у білковій послідовності [9]. Аналіз даного елемента на геномному рівні у *D. melanogaster* показав, що

hobo елемент може зустрічатися у трьох формах: повнорозмірні автономні елементи (відповідають канонічному HFL1), делетовані (дефектні) копії та залишки реліктових *hobo* елементів (так звані *hobo*-related sequences), інвазія яких відбулася раніше [10]. Всі вказані форми відрізняються довжиною та нуклеотидною послідовністю – дефектні копії мають менші розміри за рахунок делецій у кодуючій частині, а залишки реліктових *hobo* демонструють наявність численних делецій та низького рівня ідентичності послідовності нуклеотидів до канонічного елемента. Наявність трьох форм елемента свідчить про декілька хвиль інвазії транспозону у геноми *D. melanogaster*, одна з яких відбулася нещодавно та можливо продовжується у даний час [10]. Проте особливості та напрям цього процесу у природі залишаються дослідженими недостатньо.

Для двох природних популяцій дрозофіл України (Gurzuf, 1961; Uman, 1970; Uman, 1983) було продемонстровано наявність *hobo* елемента [5]. Більш пізні дані щодо поширення та активності даного мобільного елемента на території України відсутні, що не дозволяє зробити ви-

сновки ні про часову, ні про просторову динаміку даного мобільного елемента у природних популяціях дрозофіл нашої країни. В цій роботі ми дослідили наявність фрагмента кодуєчої частини *hobo* транспозону у імаго природних популяцій

Матеріали і методи

Вибірki з природних популяцій *D. melanogaster* України були зібрані у 11 локалітетах з метою характеристики широтного зрізу країни, а саме у містах Києві, Умані, Одесі, Лубнах, Пирятині, Дрогобичі, Ялті (Магарач), Варві та у Чорнобильській зоні (три точки – місто Чорнобиль, селище Поліське та біля водойми-охолоджувача ЧАЕС).

Виділення ДНК проводили з 20-25 дорослих особин кожної вибірки з використанням набору ДНК-сорб («АмпліСенс», Росія) відповідно до протоколу виробника. Наявність *hobo* елемента визначали методом ПЛР. Праймери було спеціально підбрано для дослідження таким чином, щоб ампліфікувати варіабельний S-регіон, який включає мікросателітний повтор TPE (TPE1-5'ACC CGC AGC ACA TCT TCA GG, TPE2-5'TTC AGC TGC TGC GCT ACT GG). Особливістю цього регіону є те, що він відсутній у близьких до *hobo* елементах Th1, Th2 та Oh. Очікуваний фрагмент мав довжину 412 п.н. ПЛР проводили за схемою: 3 хвилини при темпера-

турі 94°C, 30 циклів, що складаються з 30 с при 94°C, 45 с при 56°C, 20 с при 72°C, та 7 хвилин при 72°C. Реакція проводилась у суміші об'ємом 20 мкл (3 мкл геномної ДНК, 2 мкл 10 x ПЛР буфера (100 mM Tris-HCl (pH 8.8 на 25°C), 500 mM KCl), 2 мкл 25 mM MgCl₂, 2 мкл 2 mM dNTP («Fermentas»), 2 мкл 20 mM праймерів, 1 мкл Taq-полімерази ((5 од/мкл, «Fermentas»), 8 мкл дистильованої води). Отримані фрагменти з вибірок Одеси, Чорнобиля та біля водойми-охолоджувача ЧАЕС були відсеквеновані. Секвенс було виконано в Університеті Південної Кароліни, США. Для секвенування використовувався автоматичний секвенатор Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

Для ідентифікації отриманих експериментально послідовностей був використаний інструмент BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Порівняння отриманих послідовностей проводились за допомогою програм ClustalW та Vector NTI 11.0 (Invitrogen, США).

універсальною для всіх відомих копій даного транспозона.

Результати та обговорення

Проведено діагностику наявності *hobo* елемента за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними до ділянки довжиною 412 п.н., яка є

універсальною для всіх відомих копій даного транспозона.

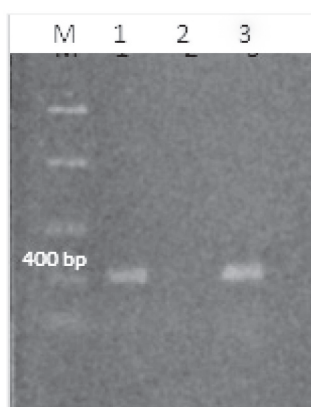


Рис. 1. Детекція *hobo* елемента у представників природних популяцій України. М – маркер молекулярної ваги, 1 – смт. Мотовилівка (всі досліджені популяції характеризувались наявністю фрагмента, як у представників популяції смт. Мотовилівка), 2 – негативний контроль ПЛР, 3 – позитивний контроль (лінія *Canton S*)

Отриманий результат свідчить, що фрагменти очікуваної довжини присутні у представників всіх досліджуваних популяціях *D. melanogaster* України (рис. 1). Для підтвердження ідентичності отриманих ампліконів саме *hobo* елемента, було проведено їх секвенування. Отримані послідовності вирівнювали проти канонічної анотованої послідовності повнорозмірного *hobo* елемента *D. melanogaster* з Генбанку (GeneBank accession: M69216). Послідовності всіх досліджуваних популяцій виявились ідентичними між собою, а також ідентичними відповідній ділянці канонічної анотованої послідовності. Отриманий результат дозволяє стверджувати, що у популяціях України присутня не реліктова форма транспозону, що свідчить про недавнє походження *hobo* елемента у представників досліджуваних популяцій, який представлений або повнорозмірними елементами, або

делетованими копіями (проте у таких елементів повинна бути делетована 5' частина, оскільки S-регіон знаходиться ближче до 3' кінця). Відсик-веновані нами послідовності фрагментів з популяцій міст Одеса, Чорнобиль та поблизу водойми-охолоджувача ЧАЕС, внесено до Генбанку за наступними ідентифікаційними номерами HQ829355, HQ829356, HQ829357.

Для порівня отриманих нами послідовностей з послідовностями *hobo* елемента у інших популяціях *D. melanogaster* світу, було застосовано пошук у базі GeneBank Національного центру біотехнологічної інформації США (National Center for Biotechnology Information, NCBI) за алгоритмом BLAST. Результати пошуку виявили лише дві послідовності з ідентичністю більше 95%, а саме повнорозмірні *hobo* елементи *HFL1* та *hobo108*. Результати вирівнювання представлені на рис. 2.

```

HQ829355      AGGTGTTTTGCATTTACAAATTCAGTCCCAATTTATACACATTAAGCTTAGAATCTA 60
HFL1         AGGTGTTTTGCATTTACAAATTCAGTCCCAATTTATACACATTAAGCTTAGAATCTA 60
hobo108      AGGTGTTTTGCATTTACAAATTCAGTCCCAATTTATACACATTAAGCTTAGAATCTA 60
*****

HQ829355      CAGAAACTCCAAGAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAG----- 99
HFL1         CAGAAACTCCAAGAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAG----- 99
hobo108      CAGAAACTCCAAGAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAA 120
*****

HQ829355      -----AAAGTCTAGAAAGTCCAA 117
HFL1         -----AAAGTCTAGAAAGTCCAA 117
hobo108      CTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAACTCCAGAAAGTCTAGAAAGTCCAA 180
*****

HQ829355      ACTTATTTCCAAAAAACAACAATATCTTCTGAAAACGAATTCTTCTTCCCAAAGT 177
HFL1         ACTTATTTCCAAAAAACAACAATATCTTCTGAAAACGAATTCTTCTTCCCAAAGT 177
hobo108      ACTTATTTCCAAAAAACAACAATATCTTCTGAAAACGAATTCTTCTTCCCAAAGC 240
*****

HQ829355      TAGTAACTGAGTCTAATTCCAACCTCAATGAATCTCCATTAGATGAAATGGAACGATATA 237
HFL1         TAGTAACTGAGTCTAATTCCAACCTCAATGAATCTCCATTAGATGAAATGGAACGATATA 237
hobo108      CAGTAACTGAGTCTAATTCCAACCTCAATGAATCTCCATTAGATGAAATGGAACGATATA 300
*****

HQ829355      TTAGACAAAGAGTTCCATTGTCTCAAAATTTTGAAGTAATGAGTGTTGGAAAAATAACG 297
HFL1         TTAGACAAAGAGTTCCATTGTCTCAAAATTTTGAAGTAATGAGTGTTGGAAAAATAACG 297
hobo108      TTAGACAAAGAGTTCCATTGTCTCAAAATTTTGAAGTAATGAGTGTTGGAAAAATAACG 360
*****

HQ829355      CAAACTTATACCSTCAGTTGTCAAAGTT 325
HFL1         CAAACTTATACCSTCAGTTGTCAAAGTT 325
hobo108      CAAACTTATACCSTCAGTTGTCAAAGTT 388
*****

```

Рис. 2. Вирівнювання послідовностей *hobo* елемента з популяцій *D. melanogaster* України (HQ829355) з відомими послідовностями з Генбанку *HFL1* – канонічна послідовність *hobo* елемента (M69216) та *hobo108* (X04705.1) – послідовність з лінії Daek (Daekwanryeong)

Хотілося б відзначити, що ми не виявили жодного фрагменту послідовності з інших популяцій світу, тому на сьогоднішній день неможливо зробити висновки щодо географічного поліморфізму або градієнту за нуклеотидною послідовністю даного елемента, окрім поліморфізму кількості TPE повторів [5].

Як демонструє рис. 2, наявні в Генбанку послідовності не ідентичні, крім того, вони походять з різних регіонів світу (*HFL1* з Північної Америки, *hobo108* з Кореї). Вказані відрізняються числом мікросателітних TPE повторів, за якими було показано поліморфізм у природних популяціях *D. melanogaster* світу [5], а також заміною двох нуклеотидів TT→CC у позиціях 177-178. Заміна вказаних нуклеотидів призводить до заміни амінокислот у послідовності білка транспозази P → L у позиції 576 (UniProtKB

accession: P12258). Оцінити вплив даної заміни на функцію транспозази *hobo* важко через відсутність інформації з приводу вторинної та третинної структури даного білка. Відсеквеновані нами фрагменти ідентичні саме фрагменту канонічної послідовності послідовності *HFL1*, який походить з лінії дикого типу *Oregon R*, зібраної в Північній Америці[8].

Таким чином проведене дослідження свідчить, що фрагменти *hobo* елемента наявні сьогодні у всіх вивчених популяціях *D. melanogaster* України. Результати вирівнювання показують ідентичність послідовностей *hobo* елемента з популяцій України з канонічною послідовністю, що вказує на інвазивне походження даного елемента у геномах представників досліджуваних популяцій.

Автори висловлюють щирю подяку проф Т. Мюссе (Університет Південної Кароліни, Південна Кароліна, США) за допомогу у секвенуванні, та Г. Міліневському, І. Чижевському, Р. Якимчуку, а також співробітникам Інституту винограду та вина "Магарач" та Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова за допомогу у зборі матеріалу.

Література

1. González J., Macpherson J.M., Petrov D.A., A recent adaptive transposable element insertion near highly conserved developmental loci in *Drosophila melanogaster* // Mol. Biol. Evol. – 2009. – DOI:10.1093/molbev/msp107
2. Kazazian H.H.Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution // Science. – 2004. – Vol. 303. – P. 1626-1632.
3. Vieira C., Bi'émont C. Transposable element dynamics in two sibling species: *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* // Genetica. – 2004. – Vol. 120. – P. 115-123.
4. Depra M., da Silva Valente V.L., Margis R., Loreto E. The *hobo* transposon and *hobo*-related elements are expressed as developmental genes in *Drosophila* // Gene. – 2009. – Vol. 448. – P. 57-63.
5. Bonnivard E., Bazin C., Denis B., Higuët D. A scenario for the *hobo* transposable elements invasion, deduced from the structure of natural population of *Drosophila melanogaster* using tandem TPE repeats // Genet. Res. Camb. – 2000. – Vol. 75. – P. 13-23.
6. Itoh M., Takeuchi N., Yamaguchi M., Yamamoto M., Boussy I.A. Prevalence of full-size *P* and *KP* elements in North American populations of *Drosophila melanogaster* // Genetica. – 2007. – Vol. 131. – P. 21-28.
7. Berg R.L. A genetical analysis of wild populations of *Drosophila melanogaster* // D I S. – 1941. – Vol. 15.
8. McGinnis W., Shermoen A.W., Beckendorf S.K. A transposable element inserted just 5' to a *Drosophila* glue protein gene alters gene expression and chromatin structure // Cell. – 1983. – Vol. 34. – P. 75-84.
9. Calvi B.R., Hong T.J., Findley S.D., Gelbart W.M. Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator*, and *Tam3* // Cell. – 1991. – Vol. 66. – P. 465-471.
10. Boussy I.A., Itoh M. Wandering of *hobo*: a transposon in *Drosophila melanogaster* and its close relatives // Genetica. – 2004. – Vol. 120. – P. 125-136.

KOZERETSKA D.I., SERGA S.V., DEMYDOVA A.S., SHKLIAR S.E., KOZERETSKA I.A.

*ESC "Institute of Biology", National Taras Shevchenko University of Kyiv
Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str, 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com*

HOB0 TRANSPOSON IN THE NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN UKRAINE

Aims. The goal of our study was to investigate population dynamics of the *hobo* transposon in the wild population of *Drosophila melanogaster* in Ukraine. **Methods.** Samples from the wild populations were collected across 11 different locations. Presence of the *hobo* element was determined using PCR with following sequencing. ClustalW and VectorNTI 11.0 software was used for sequence comparison. **Results.** We have

found fragments of *hobo* transposon in all studied populations of *D. melanogaster*. Alignment test provides the evidence of identity of the studied element with the canonical sequence, that suggests the invasive pattern of this transposon in sampled populations' genomes.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *hobo* transposon, natural populations.

**КОЗЕРЕЦЬКА І.А., СЕРГА С.В., ПРОЦЕНКО О.В., ЖУК О.В., АЛЕКСАНДРОВ А.В.,
ДЕМИДОВ С.В.**

*ННЦ "Інститут біології", Київський національний університет імені Тараса Шевченка Україна,
01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com*

ЯВИЩЕ «МУТАЦІЙНОГО СПАЛАХУ» У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* УКРАЇНИ

Дослідження темпів спонтанного мутаційного процесу є важливим для розуміння еволюційних подій у популяціях різних видів. 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 [1]. У результаті цих досліджень були описані характерні для природних популяцій "моди на мутації" [2, 3, 4].

Дослідження природних популяцій *D. melanogaster* України протягом 2005-2010

років продемонстрували, що всі популяції, які були залучені до аналізу, не характеризуються подіями типу «мутаційного спалаху» [5, 6], хоча кожній з них притаманні певні спадкові зміни.

Різке зростання частоти мутацій у досліджуваних природних популяціях встановлено у 2011 та 2012 роках. Спадкова зміна, частота якої перевищувала спонтанні рівні [7, 8] стосується порушення розвитку другої повздожньої жилки крила. Ген, який відповідає за розвиток вказаного мутантного фенотипу, локалізується у 4-й хромосомі.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували особини із природних популяцій *D. melanogaster* різних регіонів України (міст Києва, Одеси, Умані, Варви, Ялти (Магарач), Дрогобича, Пирятин, Харкова, селищ Поліське і Мотовилівка та Чорнобильської зони відчуження) та Швейцарії (м. Лозанна). Збір мух у більшості вказаних локалітетів проводили в серпні, вересні 2011 та 2012 років, у м. Київ та Одеса у 2012 році збір імаго вели протягом сезону (червень – жовтень). У зоні відчуження Чорнобильської АЕС були зібрані представники трьох популяцій із територій з різним рівнем радіаційного забру-

дження (0,4 мР/год (м. Чорнобиль), 2,5-5 мР/год (водойма – охолоджувач ЧАЕС), 2,5-5 мР/год (Поліське).

Увесь природний матеріал було проаналізовано під бінокулярним стереоскопом МБС-10 на наявність видимих фенотипових змін. Виявлених особин із фенотиповими відхиленнями вилучали та досліджували на здатність передавати встановлені фенотипові зміни нащадкам.

Мух утримували на стандартному середовищі при кімнатній температурі [9].

Статистичну обробку результатів проводили за стандартними методиками [10].

Результати та обговорення

У ході досліджень було проаналізовано 14015 імаго із 13-ти популяцій *D. melanogaster* із різних регіонів України та одного локалітету у Швейцарії. Серед проаналізованих особин ідентифіковано імаго з порушенням другої повздожньої жилки крила. Частота таких особин коливалась в різних популяціях в межах 0,1-2,3% (табл. 1). Кожна з досліджених популяцій характеризувалась наявністю ідентифікованої ознаки

хоча б в одному з років досліджень. Так, в 6-ти природних популяціях вказана спадкова зміна ідентифікована в обох роках досліджень. Чотири популяції характеризувались наявністю мутантних за даною ознакою особин тільки в одному році досліджень. Популяції м. Харкова, Лубен та Лозани були залучені у моніторинг лише у 2012 році, і дві українські популяції продемонстрували наявність мутантних особин.

Таблиця 1. Частота особин з ознакою «порушення другої повздожньої жилки крила в природних популяціях *D. melanogaster* України

Популяція	2011			2012		
	*N	**n	%	*N	**n	%
Лубни	-	-	-	185	2	1,1
Одеса	158	1	0,6	898	8	0,9
Харків	-	-	-	271	3	1,1
Варва	1791	2	0,1	734	2	0,3
Київ	358	5	1,4	567	6	1,1
Поліське	164	2	1,2	42	-	0
Водойма-охладжувая ЧАЕС	524	1	0,2	44	1	2,3
Чорнобиль	454	1	0,2	639	-	0
Умань	1408	19	1,3	1894	3	0,2
Мотовилівка	436	-	0	1534	8	0,5
Дрогобич	51	-	0	474	2	0,4
Ялта (Магарач)	348	1	0,3	419	3	0,7
Лозанна	-	-	-	186	-	0

Примітки: *N – загальна кількість проаналізованих особин; **n – кількість особин з спадковими змінами другої повздожньої жилки крила.

Вважається, що частота спонтанних мутацій у *D. melanogaster*, за різними оцінками, це події порядку 10^{-4} - 10^{-9} [7, 8]. Таким чином можна стверджувати, що у 2011 та 2012 роках у природних популяціях *D. melanogaster* України спостерігається явище значного підвищення частоти мутацій глобального характеру, яке отримало назву «мутаційного спалаху». Вперше таке

явище описується для спадкової ознаки «порушення розвитку другої повздожньої жилки крила». Гібридологічний аналіз мутантів 2011 року збору продемонстрував, що всі вони є алельними та належать до гену, який розташовується у 4-й хромосомі. Встановлення природи ідентифікованих мутацій потребує подальших досліджень.

Висновки

У результаті проведених у 2011 та 2012 роках досліджень ідентифіковано явище «мутаційного спалаху» у природних популяціях

D. melanogaster України, яке має глобальний характер.

Автори висловлюють щире подяку Г. Міліневському, І. Чижевському, Р. Якимчуку, а також співробітникам Інституту винограду та вина «Магарач» та Одеського національного університету ім. І.І. Мечникова за допомогу у зборі матеріалу.

Література

1. 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. – 48 с.
2. 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.
3. Гершензон С.М. Аналитический обзор исследований по популяционной генетике, проведенных в Национальной академии наук Украины. – Киев. – 1996. – 72 с.
4. 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.
5. Козерецька И.А., Проценко А.В., Афанасьева Е.С., Рушковский С.Р., Чуба А.І., 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
6. 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. – К., 2010. – Т. 8. – С. 212-215.

7. Baer C.F., Miyamoto M.M., Denver D.R. Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences // *Nature*. – 2007. – Vol. 8. – P. 619-631.
8. Шоханов С.О., Щербата Г.Р., Черник Я.И. Геномная изменчивость лабораторных линий и природных популяций *Drosophila melanogaster* при действии рентгеновского излучения // *Генетика*. – 1997. – Т. 33, №1. – С. 25-30.
9. Roberts D.B. *Drosophila a practical approach* – Oxford., 1986. – 350 p.
10. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии. – Горловка, 2008. – 247 с.

**KOZERETSKA I.A., SERGA S.V., KRJACHOK L.N., PROCENKO O.V., ZHUK O.W.,
ALEXANDROV A.V., DEMYDOV S.V.**

ESC "Institute of Biology", National Taras Shevchenko University of Kyiv

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str, 64, e-mail: iryna.kozeretska@gmail.com

THE PHENOMENON OF "MUTATIONAL BURST" IN THE NATURAL POPULATIONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* IN UKRAINE

Aims. Our goal was to investigate the rate of mutational variation in the wild populations of *Drosophila melanogaster* in Ukraine. **Methods.** We studied representatives from the wild populations across different regions of Ukraine and Switzerland in August-September of the years 2011 and 2012. All flies were analyzed using the binocular microscope for the appearance of visible phenotypic alteration. If found, the fly was isolated and bred for diagnosing if the particular trait was able to be inherited to descendants. **Results.** The infraction of 2nd longitudinal vein was found at 0,1-2,3% frequency among analyzed imagoes, that suggests an interpretation of this event as the "mutational burst" that might have global pattern.

Key words: *Drosophila melanogaster*, mutational burst, natural populations.

**КРИЩУК И.А.², ЧЕРЕПАНОВА Е.В.¹, ГАЙДУЧЕНКО Е.С.^{2, 3}, ЗАДЫРА С.В.³,
ЛЕВЕНКОВА Е.С.¹, БАХАРЕВ В.А.², БОРИСОВ Ю.М.¹**

¹*Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова Российской академии наук
Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, 33, e-mail: boris@sevin.ru*

²*Мозырский государственный педагогический университет имени И.П. Шамякина Беларусь, 247760,
г. Мозырь, ул. Студенческая, 28*

³*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Учебно-научный центр «Институт
биологии»*

Украина, 03187, Киев, ул. Владимирская, 64

ХРОМОСОМНАЯ РАСА КИЕВ *SOREX ARANEUS* В БАССЕЙНЕ ПРАВОБЕРЕЖЬЯ ДНЕПРА (БЕЛАРУСЬ): ПОЛИМОРФИЗМ И КОНТАКТЫ С ДРУГИМИ РАСАМИ

Обыкновенная бурозубка, *Sorex araneus* L., характеризуется значительным хромосомным полиморфизмом, который обусловлен Робертсоновскими центрическими соединениями (Rb соединениями) 10 пар акроцентрических хромосом (плеч), *g - i, k, m - r* в разных сочетаниях. Географические популяции обыкновенной бурозубки, характеризующиеся определённым набором метацентриков и акроцентриков, называемых диагностическими, образуют хромосомные расы [7, 11, 12]. У многих хромосомных рас, обитающих в западной и центральной Европе, обнаружен полиморфизм по диагностическим Rb соединениям [13, 15]. Существует множество объяснений этого внутривидового полиморфизма, одной из которой

является «след гибридизации в прошлом» [12].

Хромосомная раса Киев была ранее известна, как полиморфная по двум из трёх диагностических Rb соединений [9]. Раса Киев широко распространена на западной Украине, от Карпат на западе до Дуная на юге. Восточная граница расы Киев на территории Украины, вероятно, проходит по руслу Днепра. На восточной территории Украины, преимущественно, по левобережью Днепра, обитают бурозубки хромосомной расы Нерусса [4, 9].

Типовое местонахождение расы Киев – окр. г. Киев [8] представляли собой, по видимому, крайний северный пункт, в котором она была зарегистрирована. Однако, новые данные о кариотипах бурозубок из окр. Чернобыля

(рутинная окраска хромосом), $2n=24-26$ [1] позволили предположить, что раса Киев, вероятно, проникает и на территорию Беларуси. В северо-западном направлении от известного ареала расы Киев распространена раса Białowieża [6, 13]. Таким образом, известные данные указывают на возможный контакт этой расы на севере ее ареала с расами Нерусса и Białowieża.

Материалы и методы

Исследованы кариотипы обыкновенных бурозубок (45 особей), отловленных в июле-сентябре 2011-2012 гг. в 11 пунктах, в основном, из юго-восточной части Беларуси.

Хромосомные препараты приготовлены по

Результаты и обсуждение

Кариотипирование бурозубок, отловленных в 5 пунктах междуречья Припять и Березина (г. Мозырь, с. Озаричи и с территории Светлогорского р-на) показало, что они относятся к хромосомной расе Киев с диагностическими соединениями *gm*, *hi* и *ko* [8]. Только у одной бурозубки (г. Мозырь) в кариотипе присутствовали все три диагностических метацентрика расы Киев (в гетерозиготном состоянии), а у остальных особей были зарегистрированы метацентрики *hi* и *ko*, тогда как плечи *g* и *t* были представлены акроцентриками. В северных пунктах (г. Светлогорск, д. Судовица, д. Узнаж) преобладали кариотипы с единственным метацентриком *hi*, а у трёх бурозубок (д. Судовица) все диагностические плечи были представлены акроцентриками. Бурозубки с единственным диагностическим метацентриком расы Киев, *hi*, ранее были отловлены в 70 км и 140 км севернее г. Светлогорска, в г. Бобруйске (Mishta et al., 2000) и г. Березино [2].

Бурозубки с диагностическими хромосомами расы Киев были отмечены в 50 км западнее реки Березины, на правом б. р. Птичь, в окр. п. Октябрьский и в 100 км от реки Березины в окр. п. Хвоенск, т.е. 15 км восточнее п. Туров). В этих пунктах также были отловлены бурозубки расы Białowieża (*gr*, *hn*, *ik*, *mp*). Одна из особей (п. Хвоенск) была гибридом двух рас - в кариотипе были диагностические хромосомы рас Киев и Białowieża (*gm*, *hn*, *ik*). Две бурозубки характеризовались полностью акроцентрическим кариотипом и, вероятно, такой кариотип мог сохраниться со времен обитания в этих местах автохтонной акроцентрической расы. Представители расы Białowieża были также отловлены нами в 200 км и 400 км западнее от р. Птичь, в окр. гг. Ганцевичи и Гродно, они были гетеро-

Чтобы определить северную границу ареала хромосомной расы Киев, описать возможные зоны контакта расы Киев с другими расами и характер полиморфизма этих рас, мы исследовали кариотипы бурозубок в междуречье Припяти и Днепра (Беларусь). Результаты представлены в данном сообщении.

стандартной методике из клеток костного мозга и селезенки. Идентификацию хромосом проводили по рисунку G-окраски (с использованием трипсина) в соответствии с международной номенклатурой хромосом этого вида [11].

зиготами по соединениям *gr* и *mp*.

Среди бурозубок, отловленных в д. Вялье (Брагинский р-н Гомельской обл.), были обнаружены кариотипы и хромосомной расы Киев (*hi*, *ko*), и расы Нерусса (*go*, *hi*, *kr*, *mn*, *pq*). Одна особь в д. Вялье оказалась гибридом с диагностическими метацентриками *hi*, *ko* и *mn*. У двух особей было отмечено только одно соединение, *hi*, характерное для обеих выявленных в этом месте рас.

Четыре бурозубки из Добруша (Гомельская обл., правый б. р. Ипуть; были отнесены к расе Нерусса. Диагностические плечи *g* и *o* у них были представлены, преимущественно, акроцентриками; отмечен также полиморфизм по соединениям *hi*, *kr* и *mn*, а диагностического метацентрика *pq* не было обнаружено.

Исходя из полученных данных, северо-западный участок ареала расы Киев располагается по левобережью р. Припять вблизи впадения р. Птичь, а северный участок ареала расы Киев между реками Птичь и Березина (включая пункты г. Мозырь, д. Озаричи, г. Светлогорск и г. Бобруйск). Восточный участок ареала расы Киев на территории Беларуси, по-видимому, проходит по руслу реки Днепр. Таким образом, раса Киев широко распространена на юге Беларуси и занимает территорию в 150 км с юга на север и шириной около 80 км с запада на восток. На северо-западе своего ареала хромосомная раса Киев граничит с расой Беловежа, и в 2 изученных нами пунктах по правобережью р. Птичь эти расы контактируют и вступают в гибридизацию.

Граница между расами Киев и Нерусса на территории Украины проходит вдоль бассейна Днепра [9]. По нашим новым данным, расы Киев и Нерусса контактируют и вступают в гибри-

дизацию на правобережье Днепра в окр. Брагино (д. Вялье). По-видимому, зона контакта между хромосомными расами Киев и Нерусса и в северной части их ареала проходит по руслу реки Днепр, по крайней мере, до г. Могилева. С севера в этот район, как известно, проникает раса Западная Двина (с диагностическими метацентриками *gm*, *hk* и *ip*) [3].

Две бурозубки с одним диагностическим метацентриком *hi* были ранее обнаружены в окр. западнее в г. Бобруйска и выделены в отдельную расу Бобруйск [9]. Согласно нашим новым данным, бурозубки с одним диагностическим метацентриком *hi* не формируют отдельной популяции, а встречаются в полиморфных популяциях п. Октябрьский, п. Туров и д. Вялье. Следовательно, эти кариотипы представляют собой вариант полиморфной расы Киев, а в смешанной популяции рас Киев и Нерусса из Брагинского района их происхождение не может быть идентифицировано однозначно.

Как известно, севернее г. Березино обитает полиморфная раса Борисов с диагностическими хромосомами *gm*, *hk*, *no* и *qr*. Эта полиморфная раса отличается от родственной расы Западная Двина (*gm*, *hk*, *ip*, *no*, *qr*) фиксированным акроцентрическим вариантом плеч *i* и *p*, а также полиморфизмом остальных диагностических соединений [3, 10]. В популяциях расы Борисов показано снижение частот диагностических метацентриков расы Западная Двина на протяжении 100 км с юго-западном направлении (от п. Смоляны до г. Березино). Подобная клинальная изменчивость указывает на гибридное происхождение полиморфных популяций расы Борисов. Мы предположили, что в позднем Плейстоцене (до Валдайского оледенения, 10-15 тыс. л.н.) на территории Беларуси обитала раса с акроцентрическими диагностическими хромосомами. При отступлении ледника популяции расы Западная Двина из рефугиумов расположенных на южной границе Валдайского оледенения мигрировали в южном направлении и вступили в контакт с «acroцентрическими» популяциями, и в результате сформировалась гибридная раса Борисов [3]. Также мы предположили, что полиморфизм популяций других хромосомных рас Лепель, Киев и Białowieża в бассейне Днепра также является следствием распространения диагностических метацентриков этих рас в «acroцентрических» популяциях во времена после плейстоценового периода [10].

Новые данные о распространении и полиморфизме диагностических хромосом рас Киев, Нерусса и Białowieża свидетельствуют в пользу

этой гипотезы. При сопоставлении выборок расы Киев из Украины [9] и южной и юго-восточной Беларуси прослеживается снижение частоты всех диагностических метацентриков в северном направлении. Бурозубки расы Киев на территории западной Украины были полиморфными только по соединениям *gm* и *ko* (преобладали метацентрические варианты), а метацентриком *hi* был мономорфным [9].

Для большинства популяций хромосомной расы Нерусса, распространенной на юге России и на территории восточной Украины, характерен полностью метацентрический кариотип [4, 5]. В северной популяции Украины (Боярка) и западной популяции РФ (Новозыбков - правый б. Ипути, 60 км восточнее Добруша) обнаружен полиморфизм по соединениям *go*, *kr* и *pq* [4, 9], а на западном участке ареала этой расы в окр. п. Добруш и д. Вялье, по нашим данным, частота метацентриков *go* и *pq* крайне низка.

Европейская раса Białowieża распространена в восточной Польше, где метацентрики мономорфны, а полиморфизм затрагивает только соединения *gr* и *mp* [6, 14]. Представители расы Białowieża, обнаруженные нами в окр. гг. Ганцевичи и Гродно, гетерозиготны по соединениям *gr* и *mp*. Особи из окр. пп. Хвоенск и Октябрьского полиморфны по соединениям *hn* и *ik*, а хромосомы *g*, *r*, *m*, *p* у них представлены акроцентриками.

Таким образом, в междуречье Днепра и Припяти прослеживается распространение диагностических метацентриков хромосомных рас Киев (с юга), Нерусса (с востока), Białowieża (с запада) и севернее этих мест в районе гг. Орша и Могилев – расы Западная Двина (с севера). При этом частота всех диагностических метацентриков расы Западная Двина снижается по направлению с севера от г. Смоленска, п. Дуброво, п. Смоляны до г. Березино. Аналогичные процессы наблюдаются для расы Киев на территории Украины до реки Припять и далее, вероятно, до гг. Бобруйска, Березина. Для расы Białowieża от п. Ганцевичи на восток до п. Октябрьский на реки Птичь. Для расы Нерусса от мест восточнее Новозыбкова на запад до Днепра в районе Речицы. Эти данные позволили нам определить, возможное, современное распространение обыкновенных бурозубок с акроцентрической формой кариотипа на территории юго-восточной части Беларуси. На северном участке это район южнее г. Березино до г. Светлогорска (200 км) и на южном участке это район на широте от п. Речица до п. Туров (100 км).

Выводы

1. Высказаны предположения о возможных путях миграции четырех хромосомных рас *Sorex araneus* с других территорий на территорию Беларуси: первый путь миграции это распространение на юг расы Западная Двина из северной части ее ареала на Валдайской возвышенности, второй путь – это продвижение расы Нерусса с территории РФ на запад, третий путь – миграция расы Киев с территории Украины на север и четвертый путь – распространение расы Białowieża с территории Польши на восток.

2. Показано, что хромосомный полиморфизм обыкновенной бурозубки в междуречье

Днепра и Припяти может быть обусловлен распространением диагностических метацентриков рас Западная Двина, Нерусса, Киев и расы Białowieża в автохтонных популяциях *Sorex araneus* с акроцентрическим кариотипом, обитающих на данной территории в конце Плейстоцена и в начале Голоцена.

3. Определены примерные границы современного распространения особей *Sorex araneus* с акроцентрическим кариотипом. Такие особи в прошлом, по-видимому, представляли самостоятельную автохтонную популяцию на территории Беларуси.

Литература

1. Baker R.J., Hamilton M.J., Van Der Bussche R.A., et al. Small mammals from the most radioactive sites near the Chernobyl nuclear power plant // J. Mammalogy. – 1996. – Vol. 77. – P. 155-170.
2. Борисов Ю.М., Ковалева А.А., Спрингер А.М. и др. Гибридное происхождение хромосомного полиморфизма популяций обыкновенной бурозубки *Sorex araneus* (Mammalia) в бассейне Днепра // Докл РАН. – 2009. – Т. 429, №4. – С. 561-564.
3. Borisov Yu.M., Cherepanova E.V., Orlov V.N. A wide hybrid zone of chromosome races of the common shrew, *Sorex araneus* Linnaeus, 1758 (Mammalia), between the Dnieper and Berezina Rivers (Belarus) // Compar. Cytogenet. – 2010. – Vol. 3, №2. – P. 195-201.
4. Bulatova N.Sh., Searle J.B., Bystrakova N., Nadjafova R., Shchipanov N., Orlov V. The diversity of chromosome races in *Sorex araneus* from European Russia // Acta Theriol. – 2000. – Vol. 45, Suppl. 1. – P. 33-46.
5. Bystrakova N., Bulatova N., Kovalskaya Y., et al. Geographical limits of chromosome races of common shrew *Sorex araneus* L. in the Middle Volga (east European Russia) // Mammalia. – 2003. – Vol. 67, №2. – P. 187-193.
6. Fredga K., Nawrin J. Karyotype variability in *Sorex araneus* L. (Insectivora, Mammalia) // Chromosomes today. – 1977. – Vol. 6. – P. 153-161.
7. Hausser J., Fedyk S., Fredga K., Searl J.B., Volobouev V., Wójcik J.M., Zima J. Definition and nomenclature of the chromosome races of *Sorex araneus* // Folia Zool. – 1994. – Vol. 43, Suppl. 1. – P. 1-9.
8. Mishta A.V. A karyological study of the common shrew, *Sorex araneus* (Insectivora, Soricidae), in Ukraine: First results // Folia Zool. – 1994. – Vol. 43, Suppl. 1. – P. 37-42.
9. Mishta A.V., Searle J.B., Wójcik J.M. Karyotypic variation of the common shrew *Sorex araneus* in Belarus, Estonia, Latvia, Lithuania and Ukraine // Acta Theriol. – 2000. – Vol. 45, Suppl. 1. – P. 47-58.
10. Орлов В.Н., Борисов Ю.М. Филогенетические связи обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus* L., Insectivora) Белоруссии по кариологическим данным // Зоол. журн. – 2009. – Т. 88, №12. – С. 1506-1514.
11. Searle J.B., Fedyk S., Fredga K., Hausser J., Volobouev V.T. Nomenclature for the chromosomes of the common shrew (*Sorex araneus*) // Mém. Soc. Vaud. Sci. Nat. – 1991. – Vol. 19. – P. 13-22.
12. Wójcik J.M., Ratkiewicz M., Searle J.B. Evolution of the common shrew *Sorex araneus*: chromosomal and molecular aspects / Gliwicz J. (ed.) Theriology at the Turn of a New Century // Acta Theriol. – 2002. – Vol. 47, Suppl. 1. – P. 139-167.
13. Wójcik J.M. Chromosome races of the common shrew *Sorex araneus* in Poland: a model of karyotype evolution // Acta Theriol. – 1993. – Vol. 38. – P. 315-338.
14. Wójcik J.M., Wójcik A.M., Zalewska H. Chromosome and allozyme variation of the common shrew, *Sorex araneus*, in different habitats / Fredga K., Searl J.B. (ed.) Evolution in the *Sorex araneus* Group. Cytogenetic and Molecular aspects / Proc of the ISAACC's 5th Intern Meeting. Hereditas. Offprint. – 1996. – Vol. 125. – P. 183-189.
15. Zima J., Slivková L., Tomášková L. New data on karyotypic variation in the common shrew, *Sorex araneus*, from the Czech Republic: an extension of the range of the Laska race // Mammalia. – 2003. – Vol. 68, №2. – P. 209-215.

**KRYSHCHUK I.A.², CHEREPANOVA E.V.¹, GAIDUCHENKO E.S.², ZADYRA S.V.³
LEVENKOVA E.S.¹, BAKHAREV V.A.², BORISOV YU.M.¹**

¹*Institute of Ecology and Evolution. AN Severtsov, Russian Academy of Sciences
Russia, 119071, Moscow, Leninsky Prospect, 33, e-mail: boris@sevin.ru*

²*Mozyr State Pedagogical University. I.P.Shamyakina
Belarus, 247760, Mozyr st. Student, 28*

³*Kiev National University. Taras Shevchenko, Centre "Institute of Biology"
Ukraine, 03187, Kiev, Vladimirska str, 64*

KARYOTYPIC RACE KIEV IN THE RIGHT DNEIPER BASIN (BELARUS): POLYMORPHISM AND CONTACT WITH OTHER RACES OF *SOEX ARANEUS*

Aims. To describe the of chromosomal polymorphism of karyotypic race Kiev and its contact zones with other races karyological analysis of common shrews in the right Dnieper basin (Belarus) was carried out.

Methods. Chromosomes of common shrews collected in 11 points were identified by the G-pattern. **Results.** The northeastern part of the Kiev race area is located between rivers Pripyat and Berezina. Along the river Ptich race Kiev borders and contacts with race Bialowieza and in Bragino vic. – with race Neroosa. The frequency of diagnostic metacentrics in the studied populations of races Kiev, Bialowieza, and Neroosa was lower than in populations of the same races in the main parts of their ranges. **Conclusions.** Probably, the observed polymorphism in populations in the right Dnieper basin is resulted by a spread of the diagnostic chromosomes of the Kiev, Bialowieza, and Neroosa races in populations with acrocentric karyotype which lived in this territory in the Pleistocene.

Key words: karyotypic races, *Sorex araneus*, Rb fusions, polymorphism.

ЛЕВИТЕС Е.В., КИРИКОВИЧ С.С.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
Россия, 630090, г. Новосибирск, пр-кт Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

МЕНДЕЛЕВСКОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ В ПОЛОВЫХ ПОТОМСТВАХ

Проявление открытых Г. Менделем законов наследования обеспечивается двумя комбинаторными процессами, первый из которых заключается в уменьшении числа наследственных факторов при образовании половых клеток (гамет), а второй – в объединении наследственных факторов при случайной встрече мужских и женских гамет [1]. Уменьшение числа наследственных факторов, происходящее благодаря уменьшению числа хромосом в ходе мейоза, осуществляется случайным равновероятным образом, который можно обозначить как мейотический комбинаторный процесс. Второй комбинаторный процесс, обеспечиваемый случайной встречей гамет, можно обозначить как презиготический.

Мейотический комбинаторный процесс имеет место и при агамоспермном (апомиктическом, субполовом) способе семенной репродукции растений, осуществляемом без объединения геномов гамет. Развивающееся из яйцеклеток агамоспермное потомство полиморфно, если материнское растение было гетерозиготно по генам, контролирующим маркерные признаки [2, 3].

Однако обнаружение полиморфизма в агамоспермных потомствах, образующихся из соматических клеток путем митотической агамоспермии [4], позволило сделать вывод о су-

ществовании еще одного комбинаторного процесса, не связанного с изменением числа хромосом в клетке. Была предложена гипотеза, заключающаяся в том, что этот комбинаторный процесс обеспечивается политением хромосом в клетках материнского растения и случайной, равновероятной потерей (диминуцией) избытка хроматина клеткой, вступившей в эмбриогенез [5].

Известно, что политения возможна не только в соматических клетках, но и в различных клетках зародышевого мешка [6–8]. Более того, было показано, что соотношение фенотипических классов в агамоспермных потомствах может определяться уровнем политении, возникающей в зрелой яйцеклетке при отсутствии опыления и перед её вступлением в эмбриогенез [9]. Вступление таких яйцеклеток в эмбриогенез сопряжено с диминуцией (потерей) избытка хроматина, которая происходит случайным равновероятным образом, т.е. комбинаторным путем. Этот комбинаторный процесс, обеспечиваемый как наличием множества копий хроматид (или отдельных участков хроматид), так и перекрестом, между хромосомами, был обозначен нами как *постмейотический апозиготический* [9]. Соотношение фенотипов в агамоспермном потомстве представляет в данном случае результат суммирования двух комбинатор-

ных процессов: мейотического, дающего определенные соотношения генотипов яйцеклеток, и постмейотического, в результате которого класс яйцеклеток гетероаллельного (гетерозиготного) генотипа сегрегирует на три, из которых два представляют собой противоположные гомоаллельные классы, а один – гетероаллельный класс. Именно вследствие постмейотической сегрегации происходит значительное снижение доли гетероаллельного фенотипического класса алкогольдегидрогеназы. Соотношение феноти-

Материалы и методы

В исследование были взяты семена и вегетирующие растения гибрида **RT**×**SB**, полученные от опыления растения № 19 красной столовой свеклы (**RT**) и пылью зеленого растения инбредной линии сахарной свеклы KWS-9с (**SB**). Растение столовой свеклы имело генотип *Gpi2-F/Gpi2-F* (сокращенно *FF*) и *Me1-F/Me1-F* (сокращенно *FF*) и, соответственно, быстромигрирующие изоферменты глюкозофосфатизомеразы (GPI2, Е.С. 5.3.1.9.) и малик-фермента (ME1, Е.С. 1.1.1.40.). Растение сахарной свеклы имело генотип *Gpi2-S/Gpi2-S* (сокращенно *SS*) и *Me1-S/Me1-S* (сокращенно *SS*) и, соответственно, медленномигрирующие изоферменты GPI2 и ME1.

Процесс гибридизации этих двух растений происходил в 2008 году путем свободного перекрестного опыления на изолированном участке, удаленном от каких-либо других цветущих растений свек-

Результаты и обсуждение

У всех исследованных 37 гибридных семян **RT**×**SB**, завязавшихся на растении столовой свеклы, был выявлен гетерозиготный спектр GPI2. Но гетерозиготный спектр малик-фермента был выявлен только у 36 семян, поскольку у одного семени спектр малик-фермента был представлен только материнским изоферментом, имеющим быструю электрофоретическую подвижность (фенотип *FF*). Этот факт был объяснен тем, что яйцеклетка привнесла в зиготу аллель *Me1-F* с высоким уровнем полноты. Было предположено, что полноты аллеля *Me1-F* привела к диминуции, происходящей комбинаторным путём по законам гипергеометрического распределения вероятностей. В результате этого комбинаторного процесса привнесенный отцовский аллель *Me1-S* был замещен материнским аллелем *Me1-F*. Однако этот вывод требовал дополнительной проверки, поскольку фенотип, схожий с материнским, возможен не только при замещении отцовского аллеля, но и при его

пов в таком потомстве было следующим 67FF : 92FS : 68SS; оно достоверно ($\chi^2 = 25.596$; $P < 0.001$) отличалось от теоретического соотношения 3 : 8 : 3, характерного для агамоспермных потомств.

Обнаружение данного явления позволило предположить существование аналогичного комбинаторного процесса и при образовании полового потомства. Для решения этого вопроса было проведено данное исследование.

лы на расстояние не менее двух километров. Часть гибридного потомства анализировали на стадии семян, другую часть семян высевали в гидропонной теплице в феврале 2012 года, где проростки выращивались в течение трех месяцев. Фенотипы гибридных растений **RT**×**SB** определяли путем анализа изоферментов GPI2 и ME1 в листьях и черешках. В период выращивания гибридного потомства одно из растений зацвело. Это позволило определить не только его фенотип, но и генотип с помощью генетического анализа, исследуя семенное потомство, полученное от скрещивания его с тестерными растениями летом 2012 года.

Электрофоретический анализ фенотипов гибридных семян и вегетирующих растений **RT**×**SB**, а также полученного при анализирующих скрещиваниях семенного потомства проводили по описанным ранее методам [10]

инактивации. В случае инактивации одного из аллелей семя, напоминающее по своему фенотипу гомозиготу, на самом деле является гетерозиготой, несущей нулевой аллель. Потеря активности аллеля ферментного локуса может происходить многими путями, поэтому инактивация не может быть веским доказательством комбинаторного процесса. Лишь гомозиготность семени (растения) по гену, контролирующему один маркерный фермент, при его гетерозиготности по второму маркеру, свидетельствующему о произошедшей гибридизации, может указывать на существование комбинаторного процесса. Выяснению этого вопроса и выбору между двумя возможными механизмами изменчивости была посвящена вторая часть работы, проведенная на вегетирующих растениях.

Из оставшейся партии семян гибрида **RT**×**SB** было выращено 40 растений, из которых у 38 на стадии двух месяцев был выявлен гибридный фенотип по малик-ферменту, а у 2 рас-

тений (№ 18 и № 28) фенотип по ME1 был сходен с гомозиготным материнским. Появление этих двух растений представляет собой нарушение закона единообразия гибридов первого поколения. Фенотипы по GPI2 в листьях двух-трехмесячных растений определялись нечетко.

После трех месяцев роста в гидропонной теплице растения были пересажены в открытый грунт для доращивания и последующей яровизации. Из двух растений, имевших материнский фенотип по ME1, одно зацвело без предварительной яровизации, что позволило проводить анализ его генотипа по потомству. Выявленный у данного растения фенотип по ME1 мог быть обусловлен либо генотипом *FF*, либо генотипом *F0*. Различить эти два возможных состояния можно, например, скрещиванием данного растения с тестерным растением генотипа *SS*. Если предположить, что исследуемое нами растение имеет генотип *FF*, то при скрещивании ♀*SS* × ♂*FF* должно образоваться единообразное потомство гетерозиготного фенотипа *FS*. Если же растение имеет генотип *F0*, то при тестерном скрещивании ♀*SS* × ♂*F0* образуется потомство, состоящее из двух гено- и фенотипических классов: обычных гетерозигот *FS* и гетерозигот *S0*. Фенотип у гетерозигот *S0* сходен с фенотипом *SS*.

Для проведения генетического анализа использовали тестерное растение (№ 12) генотипа *Me1-S/Me1-S*, *Gpi2-F/Gpi2-S*, которое было взято в качестве материнского. В полученном от

анализирующего скрещивания потомстве все исследованные 45 семян имели по малик-ферменту фенотип гетерозигот *Me1-F/Me1-S*. Это указывало на то, что анализируемое растение № 18 имело гомозиготный генотип *Me1-F/Me1-F*. При исследовании этого же потомства по ферменту GPI2 в нем было выявлено три фенотипических класса в соотношении: 8FF : 25FS : 9SS (табл. 1), что указывало на гетерозиготность растения № 18 по гену *Gpi2*.

В эксперименте использовали еще одно тестерное растение (№ 11) генотипа *Me1-F/Me1-S*, *Gpi2-F/Gpi2-S*, также взятого в качестве материнского. При опылении данного растения пыльцой анализируемого растения № 18 в потомстве образовалось два фенотипических класса по ферменту ME1: 30FF : 20FS и три фенотипических класса по ферменту GPI2 17FF : 24FS : 13SS (табл. 1).

Суммируя результаты скрещиваний можно заключить, что анализируемое растение № 18 имело генотип *Me1-F/Me1-F*, *Gpi2-F/Gpi2-S*. Гетерозиготность по гену *Gpi2* указывает на то, что растение № 18 получено в результате гибридизации растения красной столовой свеклы с растением сахарной свеклы. Однако гомозиготность этого же растения по гену *Me1* указывает на специфический механизм изменчивости, а также на то, что появление гомозиготного фенотипа FF среди гетерозигот первого гибридного поколения не связано с замолканием (инактивацией) аллеля *Me1-S*.

Таблица 1. Анализ генотипа растения № 18 по потомству, полученному от скрещивания с тестерными растениями

♀ \ ♂	Фенотипы потомства растения № 18					
	ME1			GPI2		
	FF	FS	SS	FF	FS	SS
Тестер № 11 генотипа <i>Me1-FS; Gpi2-FS</i>	30	20	0	17	24	13
Тестер № 12 генотипа <i>Me1-SS; Gpi2-FS</i>	0	45	0	8	25	9

Полученные результаты указывают на то, что нарушение единообразия гибридов первого поколения обусловлено комбинаторным процессом, связанным с равновероятной диминуцией (потерей) избытка хроматина из вступившей в эмбриогенез клетки. Поскольку этот процесс выявлен в зиготе, его можно обозначить как *зиготический комбинаторный процесс*.

Полученные нами данные хорошо согласуются с известными результатами генетических исследований, проводимых на животных.

Так, например, экспериментально были получены мыши, унаследовавшие обе копии материнской хромосомы 11 и ни одной копии отцовской, или же наоборот [11]. Одно из наследственных заболеваний у человека характеризуется тем, что у ребенка присутствуют две одинаковые хромосомы 15, но обе унаследованные от отца [12]. Такие ситуации могут возникать в том случае, когда происходит избыточная наработка хроматина хромосомы, сопровождаемая разделением её на две независимые хромосомы и по-

следующим случайным высвобождением из клетки избытка хроматина, происходящим таким образом, что две похожие хромосомы оста-

ются в клетке, а третья, несхожая с ними, теряется.

Выводы

Наряду с комбинаторными процессами, обусловленными расхождением хромосом в мейозе и случайным объединением гамет, существуют комбинаторные процессы, происходящие как при половом, так и при субполовом (агамоспермном) размножении и не связанные с

изменением числа хромосом во всупающей в эмбриогенез клетке. Наследование при наличии зиготического и апозиготического комбинаторных процессов можно обозначить как неменделевское.

Литература

1. Mendel G. Versuche uber Pflanzen-Hybriden // Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brunn (Abhandlungen). – 1866. – Bd. 4. – S. 3–47.
2. Gustafsson A. Apomixis in higher plants. I-III // Lunds. Univ. Arsskr. N.F. Adv. – 1946-1947. – Vol. 42–43. – P. 1–370.
3. Малецкий С.И., Сухарева Н.Б., Батурич С.О. Наследование пола у апомиктических семян земляники крупноплодной (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Генетика. – 1994. – Т. 30, № 2. – С. 237–243.
4. Левитес Е.В., Шкутник Т., Овечкина О.Н., Малецкий С.И. Псевдосегрегация в агамоспермных потомствах пыльцестерильных растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Докл. РАН. – 1998. – Т. 362, №3. – С. 430–432.
5. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamosperous sugarbeet progenies as a demonstration of multi-dimensional encoding of inherited information in plants, 2007. – Режим доступа <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>
6. Tschermak-Woess E. Uber Kernstrukturen in den endopolyploiden Antipoden von *Clivia miniata* // Chromosoma. – 1957. – Bd. 8. – S. 637–649.
7. Nagl W. Polytene chromosomes of plants // Int. Rev. Cytol. – 1981. – Vol. 73. – P. 21–53.
8. Carvalheira G. Plant polytene chromosomes // Genet. Mol. Biol. – 2000. – Vol. 23, №4. – P. 1043–1050.
9. Levites E.V., Kirikovich S.S. Post-meiotic apozygotic combinatory process in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2012. – Vol. 3, №1. – P. 75–79.
10. Meizel S., Markert C.L. Malate dehydrogenase isozymes of the marine snail *Ilyanassa obsoleta* // Arch. Biochem. Biophys. – 1967. – Vol. 122. – P. 753–765.
11. Cattanach B.M., Kirk M. Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice // Nature. – 1985. – Vol. 315. – P. 496–498.
12. Knoll J.H., Nicholls R.D., Magenis R.E. et al. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion // Am. J. Med. Genet. – 1989. – Vol. 32, №2. – P. 285–290.

LEVITES E.V., KIRIKOVICH S.S.

Federal State-Maintained Institution of Science Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Russia, 630090, Novosibirsk, Lavrentieva Ave., 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

NONMENDELIAN INHERITANCE IN SEXUAL PROGENIES

Aims. It was shown by us early that ratio of phenotypic classes in agamosperous progenies may be determined by combinatorial process not connected with changes of chromosome set in embryogenesis entering cells. Finding the phenomenon allowed us to raise a question about the possibility regarding the existence of an analogous combinatorial process also in the sexual progeny formation. **Methods.** Analysis of hybrid progeny obtained by hybridization of two homozygous plants differing in two marker enzyme genes was carried out. **Results.** One out of 77 analyzed hybrid plants has homozygous phenotype and one has homozygous genotype on the gene *Me1* controlling malic enzyme, under their heterozygosity on the second marker gene *Gpi2* controlling glucosephosphate isomerase-2. These two plants heterozygosity on *Gpi2* is suggestive of their passed hybridization, but their homozygosity on *Me1* points out the existence of the combinatorial process. **Conclusions.** Obtained results can be explained by polyteny of chromosome regions carrying marker genes and by excessive chromatin copies random equi-probable diminution from the embryogenesis-entering zygote.

Key words: *Beta vulgaris* L., hybridization, polyteny, zygotic combinatorial process, nonmendelian inheritance.

К ВОПРОСУ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Во второй половине 20-го века широко распространились представления о горизонтальном перемещении генетического материала между организмами, в том числе, стоящими на разных ступенях эволюционной лестницы. Было показано, что в естественных условиях происходит перенос генов между прокариотами и эукариотами, симбионтами и в системе хозяин-паразит (1–3). На сегодняшний день в литературе утвердилось мнение, что горизонтальный перенос генов в природе является главным источником инноваций, механизмом быстрого приобретения и возникновения новых генов, способных радикально изменить свойства клеток, расширить их адаптационный потенциал.

В наших предыдущих публикациях описаны результаты экспериментов, продемонстрировавших передачу генетических признаков при культивировании генетически маркированных клеточных популяций. В опытах проводилось совместное экспонирование клеток СНО-К1 линии, несущей маркеры *pro-*, *neo+*, *gfp+*, *Tk_{hy}*, *Hig+* (4,5) в течение 1 часа с клетками эмбриональной печени мыши, имеющей маркеры *pro+*, *neo-*, *gfp-*, *Tk_{hy}*, *Hig-*. В процессе взаимодействия клеток этих культур происходила передача генетических маркеров от клеток печени клеткам СНО, которые приобретали способность расти на селективных средах (6). Длительное совместное культивирование клеток СНО, маркированных геном *gfp*, и комочков ткани печени эмбрионов мыши (*gfp-*) по-

зволило наглядно продемонстрировать передачу генетической информации между контактирующими клетками, что доказывалось появлением зеленой флуоресценции в клетках эмбриональной печени мыши. Это явление авторы объясняют проникновением гена *gfp* из клеток СНО в клетки ткани печени и его дальнейшей экспрессией, которая приводит к биосинтезу зеленого флуоресцирующего белка (GFP). Хотя были проведены контрольные исследования для доказательства того, что свечение обусловлено зеленым белком, синтезированным в клетках печени мыши, нельзя полностью исключить возможность того, что свечение могло быть вызвано, например, проросшими в кусочки печени клетками СНО. В связи с этим, нами была предложена следующая оригинальная система для выявления передачи генетической информации между клетками млекопитающих и ее наглядной демонстрации. Используемые в этой системе модельные объекты для передачи генетической информации удобны тем, что одни из них (эмбриональные фибробласты мышей в качестве клеток-реципиентов) способны к дальнейшему, после взаимодействия, росту в последующих пассажах, а вторые – (клетки периферической крови мышей, доноры генетического маркера), не дают роста при пересевах и не будут загрязнять материал клеток-реципиентов и искажать результаты достоверности переноса генетических маркеров из клеток-доноров в клетки-мишени.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использованы эмбриональные фибробласты мышей линий BALB и ICR (2–3-й пассажи), а также клетки периферической крови мышей линии FVB-Cg-Tg (GFPU)5Nagy/J, синтезирующих “зеленый” белок (GFP). Клетки периферической крови выделяли центрифугированием в капиллярах цельной крови, содержащей антикоагулянт. Полученный слой лейкоцитов, содержащий нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, а также примесь эритроцитов, отбирали, промывали в среде RPMI и ресуспендировали в среде ДМЭМ. Подсчитывали количество клеток крови и добавляли их к клеткам культуры тканей в примерном соотношении 10:1 соответственно.

Культивирование фибробластов с клет-

ками крови осуществляли в среде ДМЭМ с 10% ЭТС в течение 24 часов при 37° С и 5% CO₂, после чего клетки крови снимали с поверхности фибробластов (отмыванием), а сами фибробласты продолжали выращивать на свежей среде ДМЭМ с 10% ЭТС в течение 3–5 суток при 37° С и 5% CO₂. Затем фибробласты пересевали на аналогичную свежую среду и продолжали культивировать еще 5–7 дней в тех же условиях. После этого фибробласты фиксировали в парах формалина и проводили микроскопическое тестирование культур на наличие свечения “зеленого” белка GFP. Просмотр культур осуществляли как в люминесцентном микроскопе МЛ-2 (ЛОМО, Россия) с использованием фильтров для GFP (интерференционный фильтр с длиной

волны возбуждения 470 нм и отсекающая 525 нм), так и на конфокальном микроскопе (конфокальную сканирующую микроскопию осуществляли на системе CarlZeiss Laser Scanning System LSM 510 (CarlZeiss, Германия) (AXIOSKOP-2ZEISS).

Для лучшей визуализации клеток при просмотре препаратов цитоплазматические белки подкрашивались тиазинным красным (Thiazine red R, Sigma), который относится к группе основных анилиновых красителей. Краситель наносился на препарат непосредственно перед его просмотром на конфокальном микроскопе. Желтая окраска цитоплазмы наблюдалась при возбуждении длиной волны 514 нм и использовании отсекающего узкополосного фильтра BP 530–600 нм. Рабочая концентрация красителя соответствовала 0,001%. Зеленый белок (GFP)

Результаты и обсуждение

В контрольных вариантах опытов, где фибробласты не контактировали с клетками крови, несущими ген *gfp*, зеленое свечение отсутствовало полностью, либо оно было едва заметным и не превышало уровень автолюминесценции. Для выявления морфологии клеток фибробластов осуществляли подкраску фибробластов тиразином, при этом цитоплазма окраши-

наблюдали при возбуждении длиной волны 488 нм и использовании узкополосного фильтра BP505–530 нм.

Для предупреждения выгорания люминесценции препарата в течение сеанса конфокальной микроскопии использовали раствор фенилендиамина (Phenylendiamine) в качестве антипригарного препарата (anti-bleach agents) (7). Благодаря этому агенту люминесценция препарата практически не выгорала и он мог подвергаться анализу в течение длительного времени, что было важно в случаях получения многих срезов для дальнейшей реконструкции объемной картины клеток. Фенилендиамин использовался в концентрации 1 мг в 80 мкл РВС, pH 7,8, с добавлением 20 мкл глицерина и наносился на препарат непосредственно перед просмотром.

вается в хорошо визуализируемый желтый цвет, а для выявления «зеленого» белка (GFP) использовали соответствующие длины волн и получали возможность регистрировать его наличие или отсутствие (Рис. 1, 1а – вариант с фибробластами линии BALB и 2, 2а – линии ICR; конфокальная микроскопия).

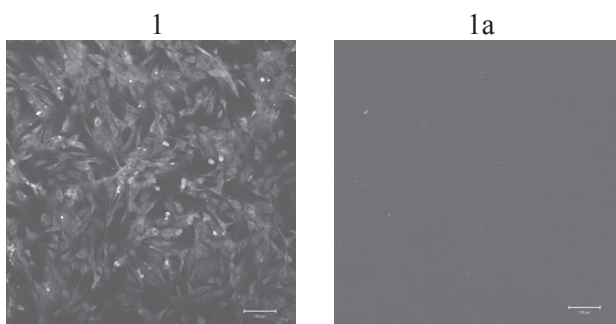


Рис. 1. Контроль. Фибробласты мыши линии BALB, подкраска тиразином; 1а – отсутствие свечения GFP

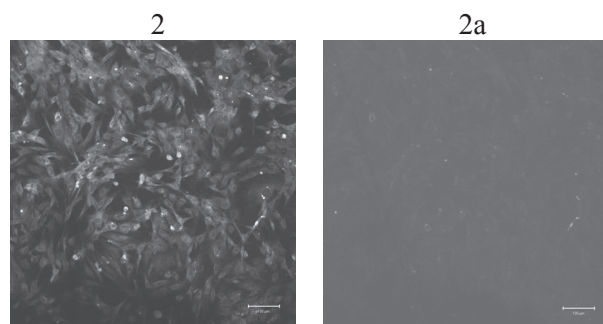


Рис. 2. Контроль. Фибробласты мыши линии, ICR, подкраска тиразином; 2а – отсутствие свечения GFP

После кокультивирования фибробластов мышей линий BALB и ICR с клетками крови, способными синтезировать GFP, у большинства фибробластов проявлялось зеленое свечение цитоплазмы, которое варьировало по интенсивности свечения отдельных клеток (Рис. 3, 3а – вариант с фибробластами линии BALB и 4, 4а – линии ICR; конфокальная микроскопия). Необходимо отметить высокий процент клеток фибробластов, которые приобрели способность к синтезу GFP после контакта с клетками крови -

донорами гена этого белка.

Для проверки того, что свечение фибробластов не обусловлено контаминатами клеток крови «зеленой» мыши, параллельно с высевом фибробластов, осуществляли высев клеток крови в тех же условиях. Роста клеток крови не наблюдали, количество клеток крови не увеличивалось.

Таким образом, полученные результаты наших экспериментов достоверно демонстрируют возможность переноса генетического ма-

териала между клетками периферической крови и клетками фибробластов мышей с высокой эффективностью, идентификации этого процесса и позволяют предложить описанную систему мо-

дельных объектов для изучения переноса генетической информации между клетками млекопитающих.

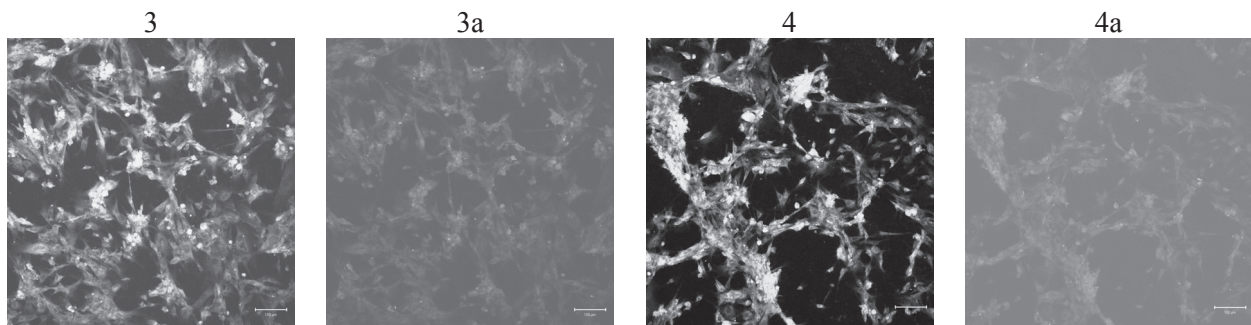


Рис. 3. Опыт. Фибробласты мыши линии BALB, подкраска тиразином; 3а – свечение GFP

Рис. 4. Опыт. Фибробласты мыши линии ICR, подкраска тиразином; 4а – свечение GFP

Выводы

1. Предложена оригинальная система модельных объектов для изучения переноса генетической информации между клетками млекопитающих.
2. Продемонстрирована возможность пе-

реноса генетического материала между клетками периферической крови мышей, несущих ген *gfp*, и клетками фибробластов мышей линий BALB и ICR, а также показана возможность идентификации этого процесса.

Литература

1. Шестаков С.В. Роль горизонтального переноса генов в эволюции // Семинар «Происхождение и эволюция живых систем» – Горный Алтай, 2003.
2. Шестаков С.В. О ранних этапах биологической эволюции с позиций геномики // Палеонтологический журнал. – 2003. – №6 – С. 50–57.
3. Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // Экологическая генетика. – 2007. – Т. 5 – С. 12–24.
4. Кордюм В.А., Топорова Е.К., Окунев О.В., Похолоенко Я.А., Сухорада Е.М., Рубан Т.А., Андриенко В.И., Иродов Д.М. Новая множественно маркированная линия клеток – производная от CHO-K1 // Биополимеры і клітина. – 2003. – Т. 19, №3. – С. 252–258.
5. Похолоенко Я.А., Сухорада О.М., Рубан Т.О., Топорова О.К., Окунев О.В., Андриенко В.И., Кордюм В.А. Створення трансгенних субліній ссавців з множинними маркерами селекції // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ: Аграрна наука, 2003. – С. 399–404.
6. Кордюм В.А., Шпилева С.П., Рубан Т.А., Сухорада Е.М. Концепція обміну генетическим матеріалом між клітками млекопитающих // Биополимеры і клітина. – 2005. – Т. 21, №4 – С. 335–345.
7. Johnson, G.D., Davidson, R.S., McNamee, K.C., et al Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomena and its remedy // J.Immun. Meth. – 1982. –Vol. 55. – P. 231–242.

LIKHACHOVA L.I., SHPYLOVA S.P., RUBAN T.A., GULKO T.P., KORDIUM V.A.

*Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail:kordium@imbg.org.ua*

ON THE ISSUE OF IDENTIFICATION AND INVESTIGATION FOR TRANSFER OF GENETIC INFORMATION BETWEEN MAMMALIAN CELLS

Aims. Developing a model system for the study of transfer of genetic information between the cells of mammals is required to obtain reliable and reproducible results. **Methods.** An embryonic fibroblasts of mouse and white blood cells (WBC) of FVB–Cg–Tg (GFPU)5Nagy/J mouse strain that have expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) were used as objects of our investigation.. After cocultivation for 24 hours of fibroblasts with blood cells WBC were removed from the surface of

fibroblasts and fibroblasts were passaged and incubate for 5–7 days more. After these fibroblasts were fixed and analyzed by standard fluorescence microscopy for GFP signals. **Results.** Microscopy results showed that fibroblasts are present with varying degrees of light intensity in the experimental probes. There were a low signal in order to autofluorescence in the control. **Conclusion.** These results demonstrate the feasibility of reliable transfer of genetic material between cells of WBC and fibroblasts of mice strains with high efficiency and allow us to offer this system as a model to studying the transfer of genetic information between the cells in mammals.

Key words: mice fibroblasts, the WBC of mice, the transfer of genetic information, GFP.

ЛІСОВСЬКА Т.П., КУЗЬМІШИНА І.І., КОЦУН Л.О., ВОЙТЮК В.П.

*Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки
Україна, 43025, м. Луцьк, пр. Воли, 13, e-mail: tlisovska@ukr.net*

МЕЙОТИЧНА МУТАЦІЯ ТОМАТУ, ЩО КОНТРОЛЮЄ ВИХІД ІЗ МЕЙОЗУ

У життєвому циклі організмів, які розмножуються статевим шляхом, відбувається редукція числа хромосом під час складного поділу – мейозу. Мейоз характеризується значною універсальністю у всіх досліджених на сьогодні організмах як за цитологічними стадіями, так і за третинною будовою і функцією білкових продуктів, які беруть участь в цьому процесі [1]. Вважають, що мейоз виник в процесі еволюції на основі механізмів генетичної рекомбінації і мітозу. Розрізняють не менше чотирьох основних відмінностей мейозу від мітозу. Перша відмінність полягає у синапсі і рекомбінації гомологічних хромосом під час профазі I мейозу. Внаслідок кросинговеру одночасно з когезією сестринських хроматид утворюються хіазми, які дозволяють орієнтуватися бівалентам у екваторіальній площині клітини до протилежних полюсів веретена поділу в мейозі I (першому поділі). По друге, сестринські хроматиди прикріплюються до одного полюса веретена поділу, тобто виявляють уніполярність центромер. Таким чином сестринські хроматиди розходяться до полюсів лише під час анафази другого мейотичного поділу. Монополярне прикріплення кінетохорів сестринських хроматид в мейозі фундаментально відрізняється від мітозу, де спостерігається біполярне прикріплення кінетохорів до протилежних полюсів веретена поділу. Третя значна відмінність виявляється у збереженні когезії між сестринськими хроматидами в ділянці, що оточує центромери, до анафази другого поділу мейозу. Нарешті, для мейозу характерна відсутність S – фази між двома поділами мейозу. В нормі мітотичні поділи не починаються без подвоєння кількості ДНК і реплікації хромосом, а в мейозі це правило порушується – відбувається супресія S – фази після першого мейотичного

поділу, що не заважає клітинам переходити до другого поділу [1, 12]. Ця остання принципова відмінність мейозу від мітозу забезпечує редукцію числа хромосом в дочірніх клітинах.

До генетичного контролю мейозу залучена велика кількість генів, про що свідчить існування багатьох неалельних мутацій, які впливають на нормальний перебіг мейозу, так званих мейотичних мутацій. У кукурудзи і арабідопсису – видів із найбільш значними колекціями мейотичних мутантів серед рослин – встановлено щонайменше 35 неалельних генів, які контролюють окремі ланки мейозу – від вступу в мейоз до закінчення цього процесу [9, 10].

Мейотичні мутації умовно класифікують за подіями, на які вони впливають під час мейозу. Розрізняють мутації, які викликають відсутність мейозу, відсутність першого поділу мейозу, синаптичні мутації, мутації, які впливають на мейотичну рекомбінацію, на другий поділ мейозу і т.д. [див. огляди: 6, 9, 10].

У роботі ми звертаємо увагу на групу мутацій так званого додаткового або третього поділу мейозу. Для мутантів цього типу характерним є наявність одного або кількох додаткових поділів мейозу після завершення нормального перебігу мейозу. Перед таким поділом не відбувається синтез ДНК і реплікація хромосом. Таким чином додатковий поділ є повторенням другого поділу мейозу, а нормальні алелі цих генів відповідають за вихід клітин із мейозу. Мутацій даного типу на сьогодні відомо небагато, їхня класифікація суперечлива (деякі автори відносять їх до мутацій порушення мітозів у мікрогаметогенезі), тому дослідження нових мутацій у різних видів надасть відповідь щодо причин спостерігаємих порушень.

До групи мутацій, які контролюють заве-

ршення мейозу належить досліджуваний нами

Матеріали і методи.

Мутант *amd* був виділений за стерильністю в M_2 томату сорту Факел, отриманого із насіння, опроміненого γ -променями в дозі 500 Гр [3]. Через повну чоловічу стерильність мутація підтримується у вигляді популяції ВС від схрещування гомозиготних за мутацією *amd* рослин в якості материнської форми із фертильними гетерозиготами в якості батьківської форми.

Бутони довжиною 2...3 мм фіксували в

Результати та обговорення

Гомозиготні за мутацією *amd* рослини характеризуються цитологічно нормальним перебігом мейозу в мікроспорогенезі до анафази II. Мейоз не завершується характерним для телофази II цитокінезом з утворенням чотирьох мікроспор, а дочірні ядра знову діляться. Перед цим поділом не відбувається деспіралізації хромосом, реплікації ДНК і подвоєння хроматид, то-

мутант томату (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

суміші етанол : крижана оцтова кислота у співвідношенні 3:1, зберігали у 70% етанолі, фарбували ацетокарміном згідно загальноприйнятої методики. Для цитологічних досліджень готували давлені препарати пиляків на різних стадіях мейозу. Фертильність пилюк визначали ацетокарміновим методом. Статистичну обробку даних генетичного аналізу здійснювали за методом χ^2 .

му хромосоми гаплоїдного набору нерегулярно розходяться до полюсів, після чого відбувається цитокінез. На стадії тетрад у мейоцитах спостерігаються від п'яти до вісьми мікроспор неправильної форми (рисунок). Подальший мікрогаметогенез зупиняється або порушується. Мутація отримала назву – *amd* (additional meiotic division).

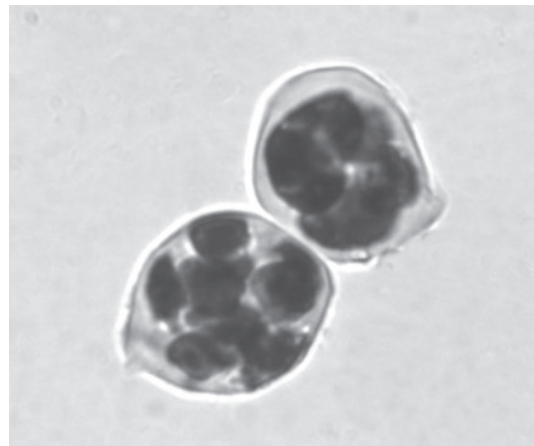


Рис. Мікроспороцити на стадії тетрад у гетерозиготних (зліва) та гомозиготних (справа) за мутацією *amd* рослин томату

Внаслідок порушення мейозу у мутантних рослин спостерігається 100 %-ва стерильність пилюк, самозапильні плоди не утворюються. Пилюк дуже дрібний, варіює за формою і розміром (середня площа пилюкових зерен у *amd/amd* $222,47 \pm 25,20$ мкм² порівняно з $469,48 \pm 4,83$ мкм² у гетерозигот *Amd/amd*). Очевидно, порушення мейозу відбувається лише в мікроспорогенезі, тому що за штучного запилення квіток гомозиготних за мутацією рослин фертильним пилюком гетерозиготних рослин спостерігається зав'язування плодів із життєздатним насінням ($70,60 \pm 6,70$ насінин на плід у гетерозигот *Amd/amd* і $47,60 \pm 5,00$ – у рослин, гомозиготних за мутацією *amd*).

Генетичний аналіз встановив, що мутація

amd має рецесивний вияв і контролюється одним геном ($\chi^2_{3:1} = 0,15$). За допомогою функціонального тесту на алелізм було встановлено, що мутація *amd* не алельна виявленим раніше мейотичним мутаціям томату *dsm1* і *sti*.

До цитологічно подібних належать алельні мутації *po* [7], *ms-4* [2] і *ms-6* [5] кукурудзи, мутація *po* лисохвоста [15], "поділ у тетрадах" жита [4], *ms5-1*, *tdm1*, *pollenless3-2* у *Arabidopsis thaliana* [11, 20, 21] та у деяких інших видів [8, 14 - 16, 19] (таблиця). Додатковий поділ може бути один або декілька. Мутації мають вияв лише у мікроспорогенезі або у мікро- і мікроспорогенезі [10, 17]. У випадках, коли проводили генетичний аналіз, був встановлений рецесивний моногенний характер успадкування, крім

мутації "поділ у тетрадах" жита, яка контролюється двома генами [4] і мутації *tdm1* арабідопсису, яка виявляє неповне домінування залежно від генетичного фону і тривалості світлового дня [20]. Хоча переважна більшість виявлених мутацій цього типу належить до рослин, також подібний фенотиповий вияв притаманний мутації *mus 8* у гриба *Neurospora* [19] та мутація *roughex* у *Drosophila melanogaster* [14]. Той факт, що у найбільших за обсягом колекціях ме-

йотичних мутантів рослин – кукурудзи і арабідопсису, спонтанні та індуковані різними чинниками мутації додаткового поділу мейозу, виділені із різних популяцій, виявились алелями одного гена (*po*, *ms-4* і *ms-6* кукурудзи [17]; *ms5-1*, *tdm1*, *tdm1-1*, *pollenless3-2* арабідопсису [10]) свідчить про те, що за контроль виходу мейоцитів (спороцитів) із мейозу імовірно відповідає один ген.

Таблиця. Мейотичні мутації додаткового поділу мейозу

Символ гену	Вид, походження	Характер успадкування	К-ість додаткових поділів	Літературне джерело
<i>po</i>	<i>Zea mais</i> , sp	1 rs	1-4	Beadle G. W., 1929
<i>ms-4</i> ал <i>po</i>	Zea mais , HMC	1 rs	1-4	Голубовская И.Н., Урбах В.Г., 1981
<i>ms-6</i> ал <i>po</i>	Zea mais	1 rs	1-4	Albertson, M. C., Philips, R. L., 1981
<i>td₁</i> і <i>td₂</i>	<i>Secale cereale</i> L, sp	2 rs	один	Соснихина С. М., 1980.
<i>po</i>	<i>Alopecurus myosuroides</i> , sp	н.д.	один	Johnsson H., 1944
<i>mus 8</i>	Neurospora	н.д.	багато	Raju N. B., 1986
	<i>Chlorophitum elatum</i> , sp	н.д.	1-3	Koul A. K., 1970
	Rumohra aristata , sp	н.д.	один	Bhavandan K. W., 1971
<i>ms5-1</i> ал <i>tdm1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , EMC	1 rs	один	Chaudhury A.M. et al., 1994
<i>ms5-2</i> ал <i>tdm1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>t-DNA</i>	1 неповне домінування	один	Glover et al., 1998
<i>tdm1</i> , ал <i>tdm1-1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>t-DNA</i>	1 неповне домінування	один	Ross K. J. et al., 1997
<i>pollenless3-2</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>t-DNA</i>	1 rs	один	Sanders et al., 1999
<i>roughex</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	1 rs	один	Gonczy P. et al., 1994
<i>amd</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> , γ - rays	1 rs	один	Лисовская Т.П., 1994

Примітки. ал – алельний, sp – спонтанна мутація, *t-DNA* – індукований *t-DNA* агробактерії, HMC – індукований нітрозометилсечовиною, EMC – індукований етил метан сульфонатом, н.д. – не досліджували.

У наведених роботах автори розглядають вияв мутантного гену або як повторення другого поділу мейозу, який в нормі відбувається без попередньої реплікації ДНК [6, 14, 20], або як передчасний перехід мікроспор до мітотичних поділів у мікроспорогенезі [4, 7, 17]. Детальний аналіз мутації *amd* томату, виду, який характеризується симультанним типом цитокінезу у мейозі мікроспороцитів, свідчить на користь першої гіпотези, тому що мутантний ген *amd*

викликає додаткове друге ділення мейозу, яке відбувається у томату до цитокінезу і відокремлення мікроспор, тобто до переходу до мікрогаметогенезу.

У арабідопсису було встановлено, що ген *MS5* кодує специфічний білок, який містить 434 амінокислоти, з обмеженою подібністю до білку синаптонемного комплексу щурів *SCP1* і регуляторної одиниці циклін залежної кінази *Xenopus* [13]. *ms5-1* аллель зменшує цей білок до

129 амінокислот (близький за розмірами до *pollenless 3-2*) и *ms5-2* аллель зменшує до 322 амінокислот [13, 21]. Відомо, що у регуляції клітинного циклу значна роль належить циклін-залежним кіназам (CDK), які можуть діяти як в мітозі, так і в мейозі або бути мейоз специфічними. Так, для ксенопуса, було показано що рівень цикліну В, зв'язаного з CDK, різко знижується наприкінці мітозу і лише наполовину у кінці мейозу I, запобігаючи вступу в S-фазу [18]. Білковий продукт гена *Roughex (Rux)* у *Drosophila* дрозофіли діє як інгібітор CDK, га-

льмує вступ в S - фазу, запобігаючи накопичення білка – цикліну Суs А протягом G₁-фази. Його дефіцит у мутанта *roughex* призводить до додаткового порушеного третього поділу мейозу без синтезу ДНК, а надлишкова експресія не дозволяє клітинам переходити до другого поділу мейозу [14]. Дослідження мейотичних мутантів із додатковим поділом мейозу дозволить встановити молекулярні механізми контролю переходу від першого до другого поділу мейозу без S - фази.

Висновки

Мейотична мутація томату *amd* характеризується нормальним перебігом першого і другого поділів мейозу та додатковим поділом ме-

йозу в мікроспорогенезі. Вона виявляє повну чоловічу стерильність але майже нормальну жіночу фертильність.

Література

1. Богданов Ю.Ф. Изменчивость и эволюция мейоза // Генетика. – 2003. – Т. 39, №4. – С. 453-473.
2. Голубовская И.Н., Урбах В.Г. Исследования ателизма мейотических мутаций с фенотипически подобными нарушениями мейоза // Генетика. – 1981. – Т. 17. – С. 1975-1982.
3. Лисовская Т.П. Мейотические мутанты томата, индуцированные гамма-излучением // Молекулярно-генетические маркеры растений: Матер. Всесоюз конф. –К., 1994. – С. 95-96.
4. Соснихина С.М., Смирнов В.Г., Забирова Э.Р. Генетический контроль поведения хромосом в мейозе у инбредных линий диплоидной ржи (*Secale cereale L.*). Сообщение IV. Деления в тетрадах // Генетика. – 1980. – Т. 16, №4. – С. 677-683.
5. Albertson, M. C. and Philips, R. L. Developmental cytology of 13 genetic male sterile loci in maize // Can. J. Genet. Cytol. – 1981. – Vol. 23. – P. 195-208.
6. 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.
7. Beadle G. W. A gene for supernumerary mitoses during spore development in *Zea mays* // Science. – 1929. – Vol. 50. – P. 406-407.
8. Bhavandan K. W. Supernumerary cell division during meiosis in *Rumohra aristata* (Fovst) // Cytologia. – 1971. – Vol. 36, №4. – P. 575-578.
9. Cand W.Z., Golubovskaya I., Wang C.J.R., Harher L. Meiotic genes and meiosis in maize / Bennetzen J.L., Hake S. (eds.) Maize handbook // Genetics and Genomics. – Springer Science, Busness Media LLC, 2009. – Vol. II. – P. 353-375.
10. Caryl A.P., Jones G.H., Franklin F.C.H. Dissecting plant meiosis using *Arabidopsis thaliana* mutants // Journal of Experimental Botany. – 2003. – Vol. 54, is. 380. – P. 25-38.
11. Chaudhury A.M., Lavithis M., Taylor P.E. et al. Genetic control of male fertility in *Arabidopsis thaliana*: structural analysis of premeiotic developmental mutants // Sexual Plant Reproduction. – 1994. – Vol. 7. – P. 17-28.
12. Cnudde F., Gerats T. Meiosis: Inducing Variation by Reduction // Plant Biol. – 2005. – Vol. 7. – P. 321-341.
13. Glover J., Grelon M., Craig S. et al. Cloning and characterization of MS5 from *Arabidopsis*: a gene critical in male meiosis // The Plant Journal. – 1998. – Vol. 15. – P. 345-356.
14. Gonczy P., Thomas B.J., DiNardo S. *roughex* is a dosedependent regulator of the second meiotic division during *Drosophila* spermatogenesis // Cell. – 1994. – Vol. 77. – P. 1015-1025.
15. Johnsson H. Meiotic aberrations and sterility in *Alopecurus myosuroides* Huds. // Hereditas. – 1944. – Vol. 30. – P. 469-566.
16. Koul A. K. Supernumerary cell division following meiosis in the spider plant // Genetica. – 1970. – Vol. 41, №3. – P. 305-310.
17. Liu Q., Golubovskaya I., Cande W. Z. Abnormal cytoskeletal and chromosome distribution in *po*, *ms4* and *ms6*; mutant alleles of polymitotic that disrupt the cell cycle progression from meiosis to mitosis in maize // Journal of Cell Science. – 1993. – Vol. 106. – P. 1169-1178.
18. Pérez-Hidalgo L., Moreno S., Martín-Castellanos C. Modified Cell Cycle Regulation in Meiosis // Genome Dyn. Stab. – R. Egel, D.-H. Lankenau (eds) Recombination and Meiosis: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007. – Vol. 2 – P. 307-353.

19. Raju N. B. Postmeiotic mitosis without chromosome replication in a mutagen sensitive *Neurospora* mutant // Exp. Mycol. – 1986. – Vol. 10. – P. 243-251.
20. Ross K. J., Fransz P., Armstrong S. J. et al. Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines // Chromosome Research. – 1997. – Vol.5. – P. 551-559
21. Sanders P.M., Bui A.Q., Weterings K. et al. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants // Sexual Plant Reproduction. – 1999. – Vol. 11. – P. 297-322.

LISOVSKA T.P., KUZMISHYNA I.I., KOTSUN L.O., VOITIUK V.P.

*Lesia Ukrainka Estern European National University
Ukraine, 43025, Lutsk, Voli prosp. 13, e-mail: tliovska@ukr.net*

MEIOTIC MUTAT TOMATY CONTROLLING EXIT FROM MEIOSIS

Aims. This paper presents the results of cytological and genetic analysis of new meiotic mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Methods.** Studies on meiosis in microsporogenesis were made in iron-acetocarmine smears of anther fixed in acetic alcohol (3:1). **Results.** Cytological analysis revealed the normal course of meiosis until anaphase II, after which there is an additional second division of meiosis without S - phase. Meiotic mutation tomato *amd* (additional meiotic division) is monogenic recessive nature of inheritance. Mutant plants exhibit a complete male sterility but normal female fertility. **Conclusions.** Meiotic mutant of tomato *amd* controls the completion of meiosis.

Key words: *Lycopersicon esculentum*, meiosis, meiotic mutants, additional meiotic division.

ЛЫСЕНКО Н.Г., ЛЯН ХАОЮАНЬ, КЛИМЕНКО В.В.,

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

ОВОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СПОНТАННЫЙ ПАРТЕНОГЕНЕЗ У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА *BOMBYX MORI* L.

Вариабельность проявления морфологических и физиологических признаков, детерминированных в яйце в результате завершения процессов оогенеза (овогенетическая изменчивость), была показана на зрелых ооцитах тутового шелкопряда, полностью сформировавшихся в яичнике, трансплантированном в полость тела самца на стадии личинки [1]. В качестве донора яичников в этих опытах были использованы клоны, что позволяет продолжать исследования обнаруженного явления на том же самом материале в любое время. Задача сводится к изучению потенциала развития зрелого яйца в зависимости от его положения в овариоле. Партеноклоны являются удобной моделью для решения подобной задачи, поскольку в имаго зрелые ооциты заполняют восемь достаточно длинных овариол, которые легко можно разрезать на части, и, объединив ооциты соответствующих частей от бабочек одного клона, оценить тем или иным способом потенциал развития яиц в каждом отрезке овариолы. Так, овогенетическая изменчивость была подтверждена оценкой амейотического партеногенеза яиц из разных участков овариолы в клонах, отличных от астауровского

клона P29 и во всех изученных клонах без исключения – при оценке с помощью мейотического партеногенеза [2].

В настоящей работе мы используем для оценки потенциала развития неоплодотворенного яйца так называемый спонтанный партеногенез, который известен у тутового шелкопряда уже несколько сот лет и имеет интересную историю [3]. Причина этого очень проста: развивающееся яйцо меняет свою окраску после формирования серозы с желтой на темно-серую в течение нескольких дней после оплодотворения; когда то же самое происходило с яйцами, отложенными девственными самками, это вызывало и до сих пор вызывает живой интерес к развитию, начавшемуся явно без участия самца. Простой эксперимент показывает, что такое развитие не является совершенно самопроизвольным: аккуратно извлеченные из брюшка бабочки неоплодотворенные яйца остаются не пигментированными, а отложенные девственными самками того же клона пигментируются в разной степени с определенной, характерной для клона частотой, что свидетельствует о наличии факторов в половых путях самки, которые активируют зре-

лые ооциты в процессе откладки [4]. Оценка потенциала развития неоплодотворенных яиц клона в настоящей работе произведена двумя путями: в одном варианте учитывали на протяжении 12 суток пигментацию яиц, отложенных за день виргинными, синхронизированными по вылету бабочками, полагая при этом, что более поздние

порции яиц соответствуют более удаленным от яйцеклада участкам овариол, а в другом варианте – оценивали спонтанный партеногенез яиц, извлеченных из разных участков овариол имаго того же клона. Выводы основаны на сравнении полученных результатов.

Материал и методы

Выкормку материала для настоящей работы проводили в 2011-2012 годах на экспериментальной базе Харьковский национальный университет (ХНУ) имени В.Н. Каразина в соответствии с принятыми зоотехническими требованиями. В работе использовали партеноклон Р29, выбор которого обусловлен его большей способностью к спонтанному партеногенезу, чем других клонов лабораторной коллекции. Способность яйца к спонтанному партеногенезу оценивали двумя способами: по суточным сборам яиц, вынесенных неосемененными самками, и по порциям яиц, извлеченных по известной методике [3] из целых или поделенных на части

овариол; невынесенные яйца извлекали из бабочек сразу после их гибели и учитывали в оценке общего количества яиц в самках. В качестве интегрального показателя способности зрелых ооцитов n-го, считая от яйцеклада, участка овариолы (его «длина» соответствует доле сбора n-го дня в общем количестве вынесенных самками за 12 суток яиц), развиваться спонтанно после откладки использовали процент полностью пигментированных яиц в сборе n-го дня. Корреляция степени пигментации серозы со степенью развития зародыша подтверждена тем же методом, что и ранее [5].

Результаты и обсуждение

Данные по спонтанному партеногенезу яиц, отложенных в течение 12 суток виргинными самками клона Р29, представлены на рис. 1. Снижение доли пигментированных яиц в суточных кладках происходит на протяжении всего выбранного отрезка времени; на графике оно соотносено с распределением по

суткам всех вынесенных бабочками яиц; пик откладки приходится на 5-7 сутки. К этому времени доля пигментированных яиц падает с 24 до 15%. Соответственно объему суточных сборов яиц (табл. 1) ошибка доли оказывается больше в начале и в конце изученного периода.

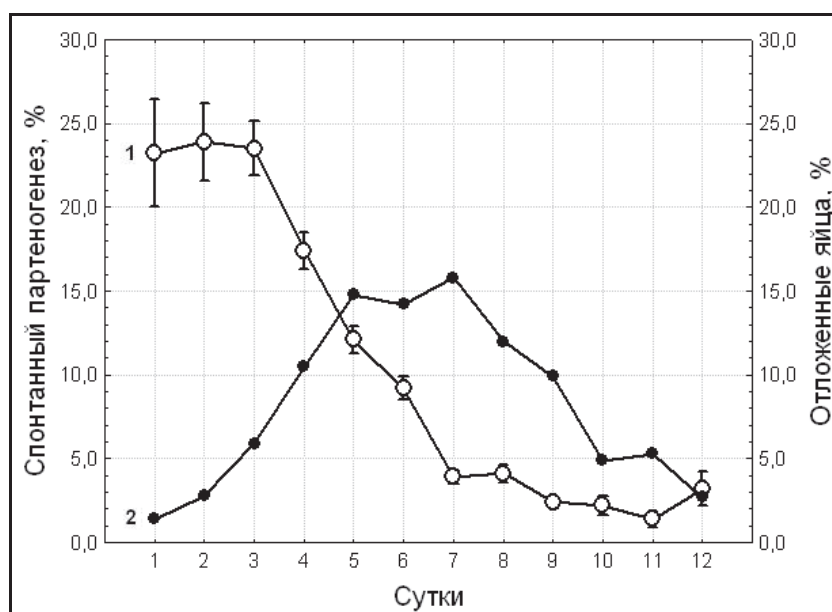


Рис. 1. Спонтанный партеногенез (1) в порциях суточной грены (2), отложенной виргинными самками клона Р29 за 12 суток

Из приведенных данных следует, что потенциал развития максимален у ооцитов, занимающих первые три от яйцеклада участка овариолы (первые трое суток откладки яиц) общей длиной около 10%, что составляет около 20-25 яиц, или примерно по 3 яйца в каждой из 8 овариол (табл. 1). На следующем участке в 40% всех зрелых яиц, идущем в направлении к нача-

лу овариол, то есть апексу, потенциал развития с каждым днем быстро и достоверно уменьшается и после 7 дня уже для всех ооцитов не превышает 5%. К этому времени в бабочке остаются не вынесенными еще 50% яиц (рис.1). Изученные таким способом последовательные участки овариол в расчете на одну бабочку представлены в табл. 1.

Таблица 1. Распределение отложенных одной и всеми бабочками яиц по суткам

Откладка яиц	Сутки (номер участка овариолы по порядку от яйцеклада)												Всего яиц
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
55 самок	169	345	711	1275	1792	1715	1909	1447	1193	588	640	324	12108
%	1,4	2,8	5,9	10,5	14,8	14,2	15,8	12	9,9	4,9	5,3	2,7	100,0
1 самка	3	6	13	23	33	31	35	26	22	11	12	6	221

В яйцах с полностью пигментированной серозой, которые использовали в оценке потенциала развития, наличие сформированных эм-

брионов было подтверждено цитологически (рис.2).

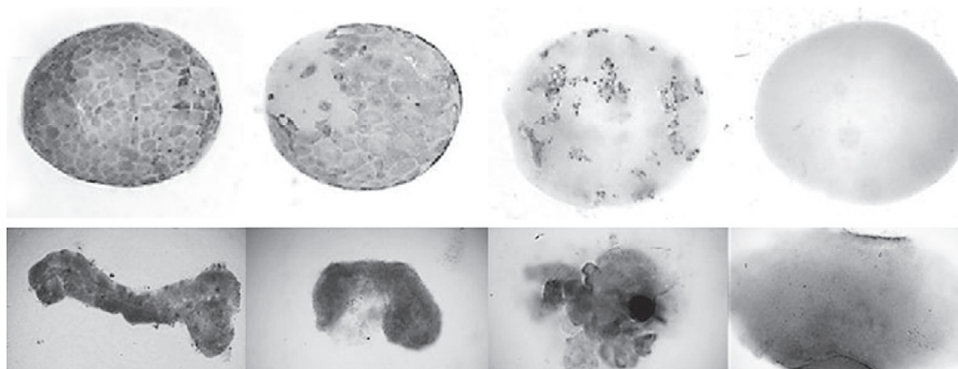


Рис. 2. Сформированный зародыш выявляется только в яйцах с завершённой пигментированной серозной оболочкой (крайнее слева яйцо)

Отдельно исследовали потенциал развития яиц в трех равных участках овариолы, варьируя продолжительность (0, 60, 120 с) принятой в методе Астаурова [3] процедуры механического удаления остатков овариол с яиц путем обкатывания их на густой марле под струей водопроводной воды. Если яйца извлекали из целых овариол, то наблюдали достоверное увеличение процента полностью пигментированных яиц при увеличении длительности обкатки, причем чувствительность яиц к этой процедуре возрастала с увеличением возраста бабочки (рис. 3).

В соответствии с целью работы выясняли затем, зависит ли степень механической активации яиц от их положения в овариоле и от воз-

раста имаго. Полученные данные (рис. 4, табл. 2) показывают, что разные участки по-разному реагируют на использованное механическое воздействие. Так, в день вылета изучаемая процедура не оказывает влияния на ооциты ни в одном из трех изученных участков овариол даже при увеличении ее продолжительности. С возрастным, общим повышением чувствительности зрелых ооцитов, яйца из крайних отрезков овариолы реагируют на увеличение длительности механической обработки на марле значительно сильнее ооцитов середины части овариолы, что еще раз подтверждает отсутствие эквивалентности зрелых ооцитов овариолы [2].

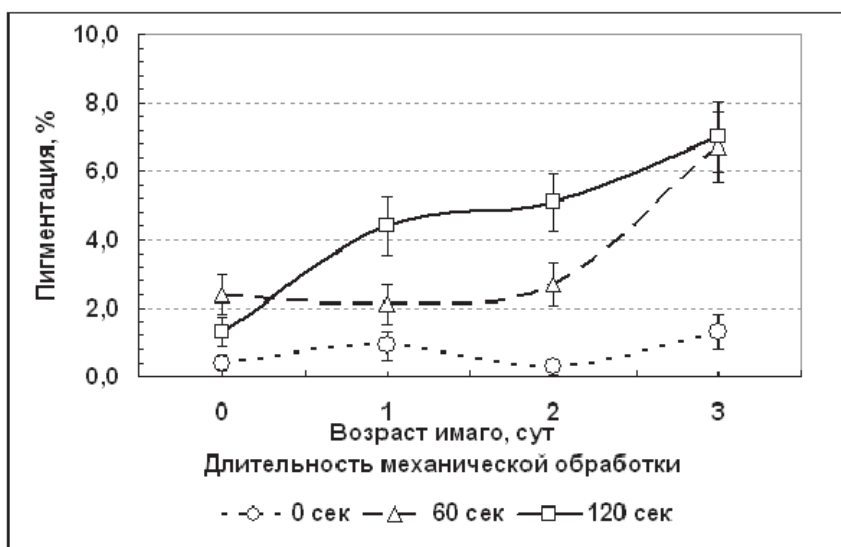


Рис. 3. Зависимость способности неоплодотворенных яиц тутового шелкопряда к спонтанному партеногенезу от возраста и интенсивности механического воздействия

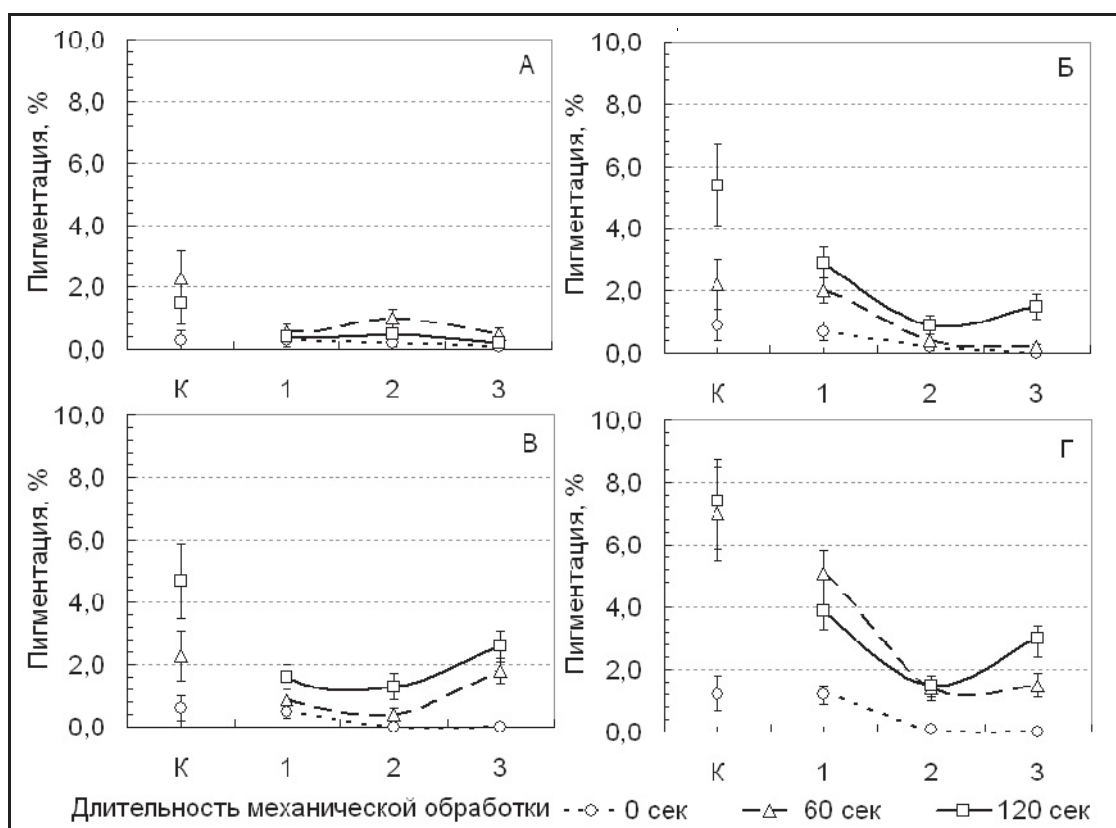


Рис. 4. Способность яиц из трех разных отрезков овариолы к пигментации в зависимости от длительности механического воздействия. Возраст бабочки после вылета из кокона: А – 0 день вылета, Б – 1, В – 2, Г – 3 дня

Таблица 2. Объемы выборок в материале опыта, представленных на рис. 3 и 4

Возраст самки, сут.	Контроль (целая овариола)	Отрезки овариолы			Всего яиц
		1	2	3	
0 (10 ♀)	1082	934	1001	953	3970
1 (10 ♀)	1103	1025	1105	906	4139
2 (10 ♀)	1007	943	958	896	3804
3 (10 ♀)	943	959	1016	974	3892
Всего яиц	4135	3861	4080	3729	15805

Выводы

Оценив уровень спонтанного партеногенеза по проценту полностью пигментированных яиц в последовательных суточных кладках бабочек партеноклона P29, установили:

1). потенциал развития откладываемых самками неоплодотворенных яиц зависит от их положения в овариоле;

2) потенциал развития зрелых ооцитов максимален в дистальной, близкой к яйцекладу, части овариолы и минимален в ее проксимальной по отношению к апексу части, уменьшаясь в промежуточной части с 25 до 5%;

3) потенциал развития яйцо приобретает в процессе откладки за счет неизвестного внутреннего фактора, возможно, механического раздражения при прохождении яйца через яйцеклад, поскольку аккуратно извлеченные ооциты

имеют нулевой потенциал; спонтанный партеногенез в этом случае следует считать искусственным, но без участия человека.

4) механическое раздражение извлеченных зрелых яиц имаго путем обкатывания их на марле под струей воды увеличивает (с возрастом бабочки – заметнее) процент пигментированных яиц при увеличении длительности процедуры, на которую ооциты средней части овариолы реагируют значительно слабее ооцитов с обоих краев овариолы. В данном случае партеногенез – искусственный по определению.

5) отсутствие эквипотенциальности зрелых ооцитов в овариолах тутового шелкопряда может быть причиной внутриклональной изменчивости и стать основой для уточнения ряда понятий генетики и эпигенетики.

Литература

1. Zabelina V., Klymenko V. Ovary transplantaion in the silkworm *Bombyx mori* L.: parthenocloning by eggs produced in male recipient // *Sericologia*. – 2008. – Issue 48, №2. – P. 123-128.
2. Лысенко Н.Г., Клименко В.В. Отсутствие эквипотенциальности зрелых яиц в овариоле имаго тутового шелкопряда // *Вестник УОГиС*. – 2013. – Т. 11, №1. (в печати)
3. Астауров Б.Л. Искусственный партеногенез у тутового шелкопряда. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1940. – 240 с.
4. Klymenko V. V. Parthenogenesis and cloning in the silkworm *Bombyx mori* L.: problems and prospects // *J. Insect Biotechnol. Sericology*. – 2001. – Vol. 70. – P. 155–165.
5. Лян Х., Клименко В.В. Спонтанный партеногенез в оценке потенциала развития неоплодотворенного яйца тутового шелкопряда // *Вестник УОГиС*. – 2013. – Т. 11, №1. (в печати)

LYSENKO N.G, LIANG HAOYUAN, KLYMENKO V.V.

V.N. Karazin Kharkiv National University

Ukraine, 61077, Kharkiv, Svobody Sq. 4. e-mail: stemway@gmail.com

OOGNETIC VARIABILITY AND SPONTANEOUS PARTHENOGENESIS IN THE SILKWORM *BOMBYX MORI* L.

Aims. The change of the mature oocyte developmental ability along the ovariole has been studied to find oogenetic basis for intraclonal variation. **Methods.** Parthenoclone P29 reproduced by ameiotic parthenogenesis (Astaurov, 1940) was used. The percentage of complete serosa formation among spontaneously developing eggs laid day by day during 12 days by virgin P29 females or among eggs mechanically extirpated from the ovarioles was taken as an estimate of developmental potential for the oocytes. **Results.** The developmental oocyte potential was shown to depend on the oocyte position in the ovariole, its maximum being among the first formed oocytes and located nearest to the ovipositor and its minimum being among the youngest mature oocytes. The mechanical irritation stimulates eggs to develop and its effect also depends on the oocyte position in the ovariole, the minimum being in the middle region of the latter. **Conclusion.** The shown absence of equipotentiality of the mature oocytes in the ovariole can be considered as the cause of intraclonal variability in the silkworm and can be used for analysis of some basic concepts of genetics and epigenetics.

Key words: parthenogenesis, clones, intraclonal variation, oogenesis, silkworm.

МАТВЕЕВСКИЙ С.Н.¹, БАКЛУШИНСКАЯ И.Ю.², ЛЯПУНОВА Е.А.², КОЛОМИЕЦ О.Л.¹

¹ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, д.3, e-mail: sergey8585@mail.ru

²ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова, д.26

МЕЙОТИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ХРОМАТИНА В СПЕРМАТОЦИТАХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ СЛЕПУШОНОК РОДА *ELLOBIUS*

Необходимым условием успешного прохождения мейоза у самцов млекопитающих является синапсис, рекомбинация гомологов в профазе I мейоза и равноценная сегрегация гомологов на стадии метафазы. Сперматоциты, в которых эти процессы нарушены, подвергаются селекции [14]. Основными контрольно-пропускными пунктами мейоза считают пахитенный, который осуществляет блок мейоза в ядрах с нарушением синапсиса хромосом и веретенный, который ответственен за точную сегрегацию гомологов. Как известно, синапсис и рекомбинация – два взаимосвязанных процесса и нарушение синапсиса приводит к нарушению рекомбинации. Участки хромосом, не вступившие в синапсис (асинаптированные участки хроматина) подвергаются транскрипционному сайленсингу (MSUC – *meiotic silencing of unsynapsed chromatin*) [15]. У самцов большинства видов млекопитающих половые (XY) хромосомы гетероморфны, синаптируют лишь в псевдоаутосомных областях. Обязательным условием нормального прохождения мейоза у самцов млекопитающих является формирование полового тельца, которое образовано половыми хромосомами, подверженными транскрипционному сайленсингу (MSCI – *meiotic sex chromosome inactivation*) [7, 10].

Молекулярными маркерами процессов

Материалы и методы

Межвидовые гибриды F₁ от скрещивания *E. talpinus* (2n=NF=54) с *E. tancrei* (2n=32; NF=56) получены и кариотипированы в лаб. цитогенетики ИБР РАН.

В лаборатории цитогенетики ИОГен РАН получены распластанные препараты синаптонемных комплексов (СК), проведен их иммуноцитохимический анализ. 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 поли-

MSUC и MSCI служит большая группа белков, в частности, BRCA1, участвующий в репарации разрывов ДНК; ATR и другие. Одним из основных маркеров транскрипционного сайленсинга хроматина является гистон γ H2AX, который выявляется на асинаптированных участках хромосом, начиная со стадии лептотены, и остается на них вплоть до поздней диплотены, если синапсис хромосом не завершен [13, 15].

Настоящее исследование посвящено анализу особенностей синапсиса и мейотической инактивации хромосом на стадии профазы I мейоза в ядрах сперматоцитов стерильных межвидовых гибридов, полученных от скрещивания *Ellobius talpinus* (2n=NF=54) с *Ellobius tancrei* (2n=32; NF=56). Эти гибриды гетерозиготны по одиннадцати робертсоновским (Rb) транслокациям.

Род *Ellobius* – уникальная группа роющих грызунов, включающая 5 видов. Три вида слепушонок – обыкновенная *E. talpinus* (2n=NF=54), восточная *E. tancrei* (2n=54-30, NF=56) и алайская *E. alaicus* (2n=52-50, NF=56) – виды-двойники, в кариотипах и самок, и самцов этих видов выявлена пара половых (XX) хромосом, идентичных по расположению G-полос. К тому же для видов *E. tancrei* и *E. alaicus* описана широкая изменчивость по числу Rb-транслокаций [1, 2, 12].

клональными антицентромерными антителами АСА. Участки транскрипционного сайленсинга хроматина выявляли с помощью антител к гистону γ H2AX. Проведение процедур получения распластных препаратов СК и иммуноцитохимического окрашивания препаратов детально описано нами ранее [9]. Также проведен светомикроскопический анализ суспензий клеток семенников и гистологическое исследование срезов ткани семенников гибридов, фиксированных по Буэну и окрашенных гематоксилин-эозином.

Результаты и обсуждение

Анализ суспензии клеток и гистологиче-

ское исследование семенников исследованных

гибридов не выявил в них ни сперматид, ни сперматозоидов, что коррелирует с данными об их стерильности.

Кариотипы самцов межвидовых гибридов ($2n=43$, XX) включали 41 аутосому (12 метацентриков, 29 акроцентриков) и акроцентрический половой (XX) бивалент. Длинные плечи 22 акроцентриков гомологичны по G-бэндам плечам 11 Rb-метацентриков.

В ядрах, распластанных на стадии лепто-тены (до начала синапсиса хромосом), весь хроматин связывается с антителами к белку γ H2AX. По мере продвижения синапсиса хромосом на

стадии зиготены–пахитены интенсивность окрашивания хроматина антителами к гистону γ H2AX постепенно снижается. Первыми синаптируют короткие биваленты. Следует отметить, что в структуре одного из СК-бивалентов, образованном акроцентриком 7-ой пары *E. talpinus* и гомологичным ему по G-бэндам субметацентриком *E. tancrei*, центромеры расположены на разных уровнях. Это явление мы объяснили ранее тем, что в процессе дивергенции этих видов произошло формирование нецентромеры у *E. tancrei* [4, 6].

Рис. 1. Схема. Мейотический сайленсинг хроматина в сперматоцитах межвидовых гибридов слепушо-



нок. Стрелкой отмечен «медленный» СК-тривалент, головка стрелки указывает на «быстрый» СК-тривалент, звездочка – СК-бивалент. *а*. На стадии зиготены половой (XX) бивалент имеет типичное строение, но еще не выселен на периферию мейотического ядра. Уже в середине зиготены часть СК-тривалентов сформированы («быстрые» СК-триваленты). В некоторых тривалентах синапсис запаздывает вплоть до поздней пахитены («медленные» СК-триваленты). Как правило, γ H2AX неравномерно распределен по ядру и локализован в зонах асинапсиса мейотических хромосом. Лишь «быстрые» СК-триваленты и синаптированные участки некоторых аутосом не окружены γ H2AX; *б*. На стадии пахитены половой (XX) бивалент смещается к периферии ядра. Облако γ H2AX сохраняется в асинаптических зонах полового бивалента и «медленных» СК-тривалентов; *в*. На стадии диплотены половой бивалент окончательно выселяется на периферию ядра и формирует клубок, который полностью окружен γ H2AX. В десинаптирующих «медленных» СК-тривалентах гистон γ H2AX окутывает только лишь короткие участки, ранее подверженных мейотической инактивации

Синапсис СК-тривалентов, формирующихся между длинными плечами двух акроцентриков и плечами метацентрика начинается с дистальных участков хромосом и продвигается к их центромерным участкам. При этом формируются не только свободные СК-триваленты, но и цепочки СК-тривалентов, связанные посредством фрагментов СК между короткими плечами негомологичных акроцентриков, входящих в состав разных тривалентов. В большинстве ядер не удается провести СК-кариотипирование, так как в структуре осевых элементов растянутых

хромосом формируются бреши (рис. 1а) и оси некоторых хромосом вступают в интерлокинг.

По мере продвижения пахитены количество СК-тривалентов в цепочках уменьшается – они распадаются на отдельные СК-триваленты. Даже свободные СК-триваленты долго остаются открытыми, иногда вплоть до поздней пахитены-диплотены. В зоне асинапсиса некоторых (но не всех) «медленных» тривалентов визуализируется облако гистона γ H2AX (рис. 1б, в).

Половые (XX) хромосомы в ядрах гибридов, как и у самцов родительских форм синап-

тировали с обоих теломерных концов – там формировались короткие СК, а в центральной части половых бивалентов сохранялась обширная зона асинопсиса. Т.о. XX-хромосомы не синаптировали полностью, что косвенно свидетельствует о различиях между ними [9, 11].

В 62% пахитенных сперматоцитов половое тельце не было сформировано [5]. При окрашивании поликлональными антицентромерными антителами (АСА) выявлялось их неспецифичное связывание с ядрышко-подобным тельцем (ЯПТ), расположенном на одном из осевых элементов полового бивалента. ЯПТ отчетливо идентифицируются и электронно-микроскопически в препаратах распластанных СК, контрастированных водным раствором азотнокислого серебра. В некоторых сперматоцитах с половым бивалентом ассоциировали асиноптированные участки аутосом, что является косвенным признаком включения механизма пахитенного ареста. По мере продвижения пахитены количество Rb-тривалентов в цепочках уменьшается.

Вокруг полового (XX) бивалента γ H2AX выявляется в виде компактного облака (в ряде случаев – только в зоне асинопсиса) и ассоциированных с ним асиноптированных участков аутосом. Однако на стадии диплотены в большинстве ядер формируется нормальное половое тельце, плотно одетое облаком γ H2AX. Т.о. арест мейоза на стадии пахитены если и происходит, то не во всех ядрах гибрида.

Согласно полученным нами результатам, формирование цепочек СК-тривалентов у гетерозигот по множественным Rb-транслокациям, формирование цепочек СК-мультивалентов сопровождается сохранением протяженных зон

Выводы

По-видимому, у исследованных нами стерильных гибридов второй этап селекции сперматоцитов происходит на стадии метафазы I. Таким образом, цитогенетические механизмы обеспечивают дивергенцию двух видов слепу-

Работа выполнена при поддержке РФФИ №12-04-31425-мол_a и Программы №.30 фундаментальных исследований Президиума РАН "Живая природа" (подпрограмма "Динамика и сохранение генофондов").

Литература

1. Ляпунова Е.А., Ивницкий С.Б., Кораблев В.П., Янина И.Ю. Полный Робертсоновский веер хромосомных форм слепушонок надвида *Ellobius talpinus* // ДАН СССР. – 1984. – Т. 274, №5. – С. 1209–1213.
2. 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.

асинапсиса в прицентромерных участках как акроцентриков, так и метацентриков. Вместе с тем известно, что асиноптированные участки хроматина должны подвергаться транскрипционной инактивации, что собственно и приводит к блоку (аресту) мейоза, так как может служить сигналом КПП мейоза о потере части генома [8].

Признаки транскрипционной инактивации хроматина в зонах асинопсиса хромосом с участием белков γ H2AX, ATR, SUMO1 и XMR были ранее выявлены у мышей, гетерозиготным по 8 Rb-транслокациям, что также не приводило к нарушению формирования полового тельца в большинстве ядер таких сперматоцитов. Вместе с тем, апоптоз части сперматоцитов наблюдался у таких гибридов на стадии метафазы, что объясняется активностью веретенного КПП. Именно низкая эффективность работы пахитенного контрольно-пропускного пункта по отношению к Rb-транслокациям, по мнению авторов, определяет возможность циркуляции Rb-метацентриков в природных популяциях и их роль в эволюции кариотипов [13].

Нельзя исключить и того, что причиной лояльности пахитенного КПП по отношению к участкам хроматина, подверженного сайленсингу на стадии пахитены, кроется в низкой генетической значимости прицентромерных районов хроматина в СК-тривалентах и цепочках СК. Кроме того, у самцов слепушонок, как гибридов, так и их родительских форм (*E. talpinus* и *E. tancrei*) половые (XX) хромосомы формируют закрытый половой бивалент, что в свою очередь может снижать способность его ассоциации с асиноптированными аутосомами.

шенок и делают маловероятным формирование гибридной зоны в районах контакта ареалов этих видов-двойников.

3. Баклушинская И.Ю., Ляпунова Е.А. Номенклатура хромосом восточной слепушонки *Ellobius tancrei* // Цитология, 1990. – Т. 32, №4. – С. 378–383.
4. Матвеевский С.Н. Неоцентромеры в структуре неробертсоновской субметацентрической пары хромосом *Ellobius tancrei* // Материалы XVIII междунар. конф. студ., асп. мол. уч. «Ломоносов – 2011». Секция «Генетика» / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, М.В. Чистякова. – М. – 2011. – С. 94.
5. Матвеевский С.Н., Баклушинская И.Ю., Ляпунова Е.А., Коломиец О.Л. Нарушение мейоза у гибридов F₁ от скрещивания видов-двойников слепушонок (*Ellobius*, Rodentia) // Материалы междунар. конф. "Целостность вида у млекопитающих изолирующие барьеры и гибридизация". – Петергоф. – 2010. – С. 58.
6. Bakloushinskaya I.Yu., Matveevsky S.N., Romanenko S.A., Serdukova N.A., Kolomiets O.L., Spangenberg V.E., Lyapunova E.A., Graphodatsky A.S. A comparative analysis of the mole vole sibling species *Ellobius tancrei* and *E. talpinus* (Cricetidae, Rodentia) through chromosome painting and examination of synaptonemal complex structures in hybrids // Cytogenet Genome Res. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–9.
7. Burgoyne P.S., Mahadevaiah S.K., Turner J.M. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis // Nature Rev Genet. – 2009. – Vol. 10. – P. 207–216.
8. Oliver-Bonet M., Ko E., Martina R.H. Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair // Cytogenet. Genome Res. – 2005. – Vol. 1. – P. 343–346.
9. 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 // Compar. Cytogenet. – 2010. – Vol. 4, №1. – P. 55–66.
10. Forejt J. X-inactivation and its role in male sterility // Chromosomes Today. – 1984. – Vol. 8. – P. 17–22.
11. 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. – Vol. 847, №3. – P. 179–189.
12. Lyapunova E.A., Vorontsov N.N., Korobitsina K.V., Ivanitskaya E.Yu., Borisov Yu.M., Yakimenko L.V., Dovgal V.Y. A Robertsonian fan in *Ellobius talpinus* // Genetica. – 1980. – Vol. 52–53. – P. 239–247.
13. Manterola M., Page J., Vasco C., Berrios S., Parra M., Viera A., Rufas J., Zuccotti M., Garagna S., Fernández-Donoso R. A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations // PLoS Genet. – 2009. – №8. – P.1–14.
14. Schimenti J. Synapsis or silence // Nature Genetics. – 2005. – Vol. 37, №1. – P. 11–13.
15. Turner J.M.A., Mahadevaiah S.K., Ellis P.J.I., Mitchell M.J., Burgoyne P.S. Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids // Develop. Cell. – 2006. – Vol. 10, №4. – P. 521–529.

MATVEEVSKY S.N.¹, BAKLOUSHINSKAYA I.Yu.², LYAPUNOVA E.A.², KOLOMIETS O.L.¹

¹Vavilov Institute of General Genetics RAS, Russia, 119991, Moscow, 3 Gubkina str.

²Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Russia, 119334, Moscow, 26 Vavilova str.

MEIOTIC INACTIVATION OF CHROMATIN IN SPERMATOCYTES OF INTERSPECIFIC HYBRIDS OF MOLE-VOLES ELLOBIUS

Aims: Analysis of synapsis and meiotic inactivation of chromosomes in the prophase I nuclei of spermatocytes of sterile interspecific hybrids of mole-voles. **Methods.** We used a surface-spreading and immunocytochemical techniques to visualize the process of chromosome synapsis with antibodies to protein SCP3 and for analysis of MSUC (*meiotic silencing of unsynapsed chromatin*) with antibodies to γ H2AX.

Results. The meiotic chromosome synapsis and silencing of unsynapsed chromatin of autosomes and sex chromosomes have been examined in spermatocytes of interspecific hybrid *E. talpinus* (2n=NF=54) and *E. tancrei* (2n=32; NF=56), heterozygous for eleven Robertsonian (Rb) translocations. The pachytene spermatocytes had normal bivalents; open and close SC trivalents, chains of chromosomes with lengthy unsynapsed regions. Chromatin of unsynapsed regions associated with extensive clouds of γ H2AX. However, they are not eliminated during pachytene and most of them proceed into diplotene. The sex bivalent formed sex body in many nucleus and associated with γ H2AX. So, synapsis defects in most pachytene cells did not trigger a pachytene arrest. Analysis of suspension of testicular cell and histological study of testicular tissue hasn't revealed any spermatids or spermatozooids. **Conclusions.** The spermatocytes heterozygous for eleven Robertsonian translocations overcame pachytene and were exposed to arrest at later stages of spermatogenesis. These results serve as one more explanation of a wide circulation of Rb-translocations in populations of many animal species.

Key words: Rb translocation, *Ellobius*, synaptonemal complex, γ H2AX, interspecific hybrids, sterility.

ПІДПАЛА О.В., ЛУКАШ Л.Л.

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: pidpala@ukr.net*

тРНК ПРО- ТА ЕУКАРІОТНОГО ПОХОДЖЕННЯ ЯК СТРУКТУРНІ ОДИНИЦІ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ЕУКАРІОТ

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) – послідовності ДНК, які можуть переміщуватись у межах геному. Вони є невід'ємними складовими про- та еукаріотних геномів [1-3]. Залежно від структурної організації та механізмів транспозиції виокремлюють два основні класи мобільних елементів [4]. Ретротранспозони (елементи класу I) переміщуються за допомогою процесу зворотної транскрипції. ДНК-транспозони (елементи класу II) переміщуються у вигляді ДНК копій із використанням кількох різних механізмів. ДНК-транспозони широко присутні як у геномах еукаріот, так і прокаріот. Раніше вважали, що ретротранспозони поширені переважно серед еукаріотних організмів. Проте у геномах прокаріот і органел еукаріот виявлено групу ретроінтронів, або інтронів групи II [5]. Крім того, для геномів еукаріот описано бактеріально-подібні МГЕ. Це кілька типів ДНК-транспозонів – Helitron, Merlin/IS1016 і Polinton [6-8].

При вивченні еволюції МГЕ основними питаннями є походження, доля і співвідношення між основними родинами. На основі уявлення про модульний характер еволюції МГЕ запропоновано схему взаємовідносин між основними класами мобільних елементів [9,10]. Переважно увага зосереджена на ретротранспозонах, а саме на автономних елементах (зокрема, LINE та LTR елементах). Незважаючи на значні відмінності у структурі і механізмах функціонування між цими групами, вважають, що всі вони є гілками одного філогенетичного дерева, тобто мають загальне походження [11,12]. В той же час неавтономні елементи, такі як SINE елементи (короткі ретропозони) менш вивчені. Оскільки SINE елементи є видо- або родо-специфічні, це дало підстави висловити припущення про утворення їх *de novo* [13]. Проте, механізм цього процесу

досі невідомий.

SINE елементи походять від псевдогенів тРНК, 7SL РНК чи 5S рРНК [14]. Вони широко поширені серед еукаріот, зокрема їх виявлено у грибів, рослин, безхребетних і хребетних тварин [13-16]. Проте ці елементи відсутні в одноклітинних еукаріот і у представників роду *Drosophila* [17]. Серед SINE елементів переважають ретропозони, які походять від різних еукаріотних тРНК. Це зокрема MIR (Mammalian-wide Interspersed Repeats) елементи ссавців [18], B2 гризунів [19], TS тютюну [20]. Більшість MIR повторів походять від лізинової тРНК, але є і такі, що походять від інших тРНК (наприклад, аланінової тРНК або гліцинової тРНК) [18]. B2 елементи, що специфічні для трьох родин гризунів *Muridae*, *Cricetidae* і *Spalacida*, теж мають гомологію до лізинової тРНК [21]. У геномах гризунів присутні ще кілька родин ретропозонів, які входять до надродина B2, це зокрема DIP, MEN та ID елементи [22-24]. Виявлено, що всі ці елементи походять від аланінової тРНК [23,24].

При вивченні походження МГЕ дискусивним лишається таке питання: походять МГЕ еукаріот від прокаріотних модулів чи навпаки, прокаріотні МГЕ можуть бути результатом деградації еукаріотних МГЕ? Деякі дослідники висловлюють припущення, що цей процес дво-направлений [10]. Виникають і нові питання. Чи мають еукаріотні короткі ретропозони гомологію із тРНК бактеріального походження? І чи можуть тРНК різного походження бути складовими інших класів МГЕ? Це і визначило *мету* даної роботи, яка полягає в тому, щоб з'ясувати чи можуть тРНК бактеріального походження бути джерелом SINE елементів і чи можуть тРНК про- та еукаріотного походження входити до складу різних МГЕ.

Матеріали і методи

Проаналізували 79 бактеріальних тРНК (від *E.coli* 536) і 513 еукаріотних тРНК (від *H. sapiens*), інформацію про які одержали із бази даних GtRNAdb (Genomic tRNA Database)

(<http://gtrnadb.ucsc.edu/>) [25]. Послідовності, які гомологічні фрагментам еукаріотних МГЕ визначали за допомогою програми Censor (<http://www.girinst.org/censor>) [26].

Результати та обговорення

Аналізуючи послідовності бактеріальних тРНК виявили гомологію до 14 МГЕ еукаріот

(табл.1). Переважно це тРНК-подібні SINE елементи. У двох випадках гомологію спостерігали

із SINE елементами, які походять від 5S рРНК. Також виявили подібність із фрагментами трьох LTR-елементів і одного ДНК-транспозону. Ці-

каво, що у випадку елемента *LTR-1_PSt-LTR* послідовність валінової тРНК мала гомологію із LTR-повтором.

Таблиця 1. Гомологія тРНК *E.coli* із еукаріотними мобільними генетичними елементами

тРНК	Мобільний генетичний елемент		Організм-хазяїн
	Назва	Клас/Родина	
Ala (GGC) Ala (TGC)	<i>STRID1</i>	NonLTR/SINE2	<i>Citellus</i> (ховрах)
Arg (ACG)	<i>AFROSINE3</i>	NonLTR/SINE2	<i>Loxodonta africana</i> (африканський слон саванний)
Arg (CCG)	<i>Ves</i>	NonLTR/SINE2	<i>Vespertilio</i> (лилик/кажан)
Asn (GTT)	<i>CryptonS-22 PI</i>	DNA transposon	<i>Phytophthora</i> (фітофтора)
Gly (GCC) His (GTG) Thr (CGT)	<i>SINE_SM</i>	NonLTR/SINE2	<i>Coregonus</i> (сиг)
Ile (GAT)	<i>SINE2-2 SP</i>	NonLTR/SINE2	<i>Echinoidea</i> (морський їжак)
Lys (TTT)	<i>LmeSINE1c</i>	NonLTR/SINE3	<i>Latimeria</i> (латимерія)
Met (CAT)	<i>SINE-3_CQ</i>	NonLTR/SINE2	<i>Culex quinquefasciatus</i> (комар п'ятисмушковий)
Phe (GAA)	<i>Gypsy-14 DAn-1</i>	LTR/Gypsy	<i>Drosophila</i> (муха)
Pro (CGG)	<i>BfISINE1</i>	NonLTR/SINE3	<i>Branchiostoma</i> (ланцетник)
Ser (GGA)	<i>DIRS-1 ACas</i>	LTR/DIRS	<i>Acanthamoeba</i> (амеба)
Thr (GGT)	<i>STRID4</i>	NonLTR/SINE2	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i> (тринадцатисмушковий ховрашок)
Val (GAC)	<i>LTR-1_PSt-LTR</i>	LTR	<i>Puccinia striiformis</i> (жовта іржа злаків)
Val (TAC)	<i>CAVID</i>	NonLTR/SINE2	<i>Cavia porcellus</i> (кавія свійська)

Серед 12 МГЕ, із якими виявили схожість тРНК людини також переважали тРНК-подібні SINE елементи (табл.2). Деякі послідовності тРНК виявили гомологію із сателітними повторами: аланінова тРНК із *tRNASAT-1_ZM* кукурудзи; аргінінова та ізoleyцинова тРНК із *MOSAT-2_DR* даніо-перію (*Brachydanio rerio*); лейцинова тРНК із *SAT-1_SK* кишководишних (*Enteropneusta*). Відомо, що мобільні елементи можуть бути джерелом мікросателітних послідовностей [27], проте цього не було показано для тРНК-подібних SINE елементів.

Також спостерігали гомологію між фрагментами ендегенного ретровірусу людини *HERV49I* і лізиновою тРНК. Крім того, послідовність аргінінової тРНК мала подібність із LTR-повтором ретротранспозону *LTR41_SS*.

Варто зауважити, що порівнюючи одержані нами дані із літературними, для більшості тРНК-подібних SINE елементів, які виявили гомологію із досліджуваними у даній роботі тРНК, не знайшли інформації, від якої саме тРНК вони походять. У випадку елемента *Ves* є дані, що він походить від тирозинової тРНК [28]. У нашому ж дослідженні показано гомологію до аргініно-

вої тРНК (табл.1) і цистеїновою тРНК (табл.2). Також із елементом *SINE_SM* гомологію мають три різні тРНК (табл.2). Випадки, коли SINE елемент виявляє гомологію до різних тРНК не поодинокі [14]. Що стосується елементів *AFROSINE2* і *AFROSINE3*, то у літературі лише зазначено, що це тРНК-подібні SINE елементи [29]. Цікаво, що у випадку елемента *AFROSINE3* гомологію мали як послідовність бактеріальної аргінінової тРНК (табл.1), так і еукаріотної аспарагінової тРНК (табл.2).

Отже, виявлено, що послідовності тРНК бактеріального походження можуть бути джерелом SINE елементів. Також показано, що тРНК про- та еукаріотного походження є складовими (структурними одиницями) інших класів МГЕ, а у випадку послідовностей еукаріотних тРНК, ще і сателітних повторів.

У попередніх дослідженнях нами виявлено, що фрагменти бактеріальних IS-елементів є складовими віроїдів [30] та структурних і регуляторних ділянок еукаріотних генів, де можуть бути носіями функціональних сайтів (зокрема сайтів зв'язування транскрипційних факторів) і гарячими точками рекомбінації [31].

Аналізуючи попередні результати і дані, отримані у цій роботі, можемо висловити припущення, що МГЕ як про-, так і еукаріотного походження у межах функціональних і структу-

рних модулів мають нуклеотидні блоки, які можуть бути складовими не лише нових мобільних структур, але і формувати генетичні одиниці у єдиному генетичному просторі.

Таблиця 2. Гомологія тРНК *H. sapiens* із еукаріотними мобільними генетичними елементами

тРНК	Мобільний генетичний елемент		Організм-хазяїн
	Назва	Клас/Родина	
Ala (CGC)	<i>ALPINE1</i>	NonLTR/SINE2	<i>Vicugna pacos</i> (альпака)
Arg (CCT)	<i>LTR41 SS</i>	LTR/ERV1	<i>Sus</i> (свиня)
Asn (ATT)	<i>AFROSINE2</i>	NonLTR/SINE2	<i>Loxodonta africana</i> (африканський слон саванний)
Asn (GTT)	<i>AFROSINE3</i>	NonLTR/SINE2	<i>Loxodonta africana</i> (африканський слон саванний)
Cys (GCA)	<i>Ves4 ML</i>	NonLTR/SINE2	<i>Myotis lucifugus</i> (нічниця)
Gln (CTG)	<i>MIR</i>	NonLTR/SINE2	<i>Mammalia</i> (ссавці)
Gly (CCC) Gly (TCC)	<i>SINE2-1_Pca</i>	NonLTR/SINE2	<i>Procavia capensis</i> (даман капський)
Lys (CTT)	<i>Gypsy-14 DAn-1</i>	LTR/Gypsy	<i>Drosophila</i> (муха)
Lys (TTT)	<i>HERV49I</i>	LTR/ERV1	<i>Homo</i> (людина)
Pro (AGG) Pro (CGG) Pro (TGG)	<i>NeSL-1_TV</i>	NonLTR/NeSL	<i>Trichomonas vaginalis</i> (трихомонада)
Thr (TGT)	<i>CRYI</i>	NonLTR/SINE2	<i>Testudinoidea</i> (наземні черепахи)
Tyr (GTA)	<i>ALPINE1B</i>	NonLTR/SINE2	<i>Vicugna pacos</i> (альпака)

Висновки

Виявлено, що послідовності про- та еукаріотних тРНК можуть бути не лише джерелом SINE елементів, але і структурними одиницями

інших класів мобільних генетичних елементів, зокрема, LTR-ретротранспозонів і ДНК-транспозонів.

Література

1. Хесин Р.Б. Непостоянство генома. – М.: Наука, 1984. – 472 с.
2. Mobile DNA / Eds D.E. Berg, M.M. Howe. – Washington: Amer. Soc. Microbiol. publ., 1989. – 972 p.
3. Mobile DNA II / Eds N.L. Craig, R. Craigie, R. Gellert, A.M. Lambowitz. – Washington: Amer. Soc. Microbiol. publ., 2002. – 1204 p.
4. Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L., Capy P. et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements // Nat.Rev.Genet. – 2007. – Vol. 8, №12– P. 973–982.
5. Robart A.R., Zimmerly S. Group II intron retroelements: function and diversity // Cytogen.Genome Res. – 2005 – Vol. 110, №1–4. – P. 589–597.
6. Kapitonov V.V., Jurka J. Rolling-circle transposons in eukaryotes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, №15. – P. 8714–8719.
7. Feschotte C. Merlin, a new superfamily of DNA transposons identified in diverse animal genomes and related to bacterial IS1016 insertion sequences // Mol. Biol.Evol. – 2004. – Vol. 21, №9. – P. 1769–1780.
8. Kapitonov V.V., Jurka J. Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, №12. – P. 4540–4545.
9. Lerat E., Brunet F., Bazin C., Capy P. Is the evolution of transposable elements modular? // Genetica. – 1999. – Vol. 107, №1–3. – P. 15–25.
10. Капи П., Мэзонот К. Приобретение и потеря модулей: набор для конструирования мобильных элементов // Генетика. – 2002. – Т. 38, №6. – С. 719–726.
11. McClure M.A. Evolution of retroposons by acquisition or deletion of retrovirus-like genes // Mol. Biol. Evol. – 1991. – Vol. 8, №6. – P. 835–856.
12. Boeke J.D., Stoye J. P. Retrotransposons, endogenous retroviruses, and the evolution of Retroelements / Retroviruses. Eds. J.M.Coffin, Hughes S. H., Varmus H. E., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY: NY, 1997. – P.343–435.

13. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. Origin and evolution of SINEs in eukaryotic genomes // *Heredity*. – 2011. – Vol. 107, №6. – P. 487–495.
14. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. SINEs // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. – 2011. – Vol. 2, №6. – P. 772–786.
15. Borodulina O.R., Kramerov D.A. Wide distribution of short interspersed elements among eukaryotic genomes // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 457, №3. – P. 409–413.
16. Kramerov D.A., Vassetzky N.S. Short retroposons in eukaryotic genomes // *Int. Rev. Cytol.* – 2005. – Vol. 247. – P. 165–221.
17. Jagadeeswaran P., Forget B.G., Weissman S.M. Short interspersed repetitive DNA elements in eucaryotes: transposable DNA elements generated by reverse transcription of RNA polIII transcripts? // *Cell*. – 1981. – Vol. 26, №2. – P. 141–142.
18. Smit A.F., Riggs A.D. MIRs are classic, tRNA-derived SINEs that amplified before the mammalian radiation // *Nucleic. Acids Res.* – 1995. – Vol. 23, №1. – P. 98–102.
19. Daniels G.R., Deininger P.L. Repeat sequence families derived from mammalian tRNA genes // *Nature*. – 1985. – Vol. 317, №6040. – P. 819–822.
20. Yoshioka Y., Matsumoto S., Kojima S., Ohshima K., Okada N., Machida Y. Molecular characterization of a short interspersed repetitive element from tobacco that exhibits sequence homology to specific tRNAs // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – Vol. 90, №14. – P. 6562–6566.
21. Ferrigno O., Virolle T., Djabari Z., Ortonne J.P., White R.J., Aberdam D. Transposable B2 SINE elements can provide mobile RNA polymerase II promoters // *Nat. Genet.* – 2001. – Vol. 28, №1. – P. 77–81.
22. Brosius J. RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements // *Gene*. – 1999. – Vol. 238, №1. – P. 115–134.
23. Serdobova I.M., Kramerov D.A. Short retroposons of the B2 superfamily: evolution and application for the study of rodent phylogeny // *J. Mol. Evol.* – 1998. – Vol. 46, №2. – P. 202–214.
24. Shen M.R., Brosius J., Deininger P.L. BC1 RNA, the transcript from a master gene for ID element amplification, is able to prime its own reverse transcription // *Nucl. Acids Res.* – 1997. – Vol. 25, №8. – P. 1641–1648.
25. Chan P.P., Lowe T.M. GtRNAdb: A database of transfer RNA genes detected in genomic sequence // *Nucl. Acids Res.* – 2009. – 37(Database issue):D93–D97.
26. Kohany O., Gentles A.J., Hankus L., Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: RepbaseSubmitter and Censor // *BMC Bioinformatics*. – 2006. – Vol. 7. – P. 474.
27. Arcot S.S., Wang Z., Weber J.L., Deininger P.L., Batzer M.A. Alu repeats: a source for the genesis of primate microsatellites // *Genomics*. – 1995. – Vol. 29, №1. – P. 136–144.
28. Borodulina O.R., Kramerov D.A. Wide distribution of short interspersed elements among eukaryotic genomes // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 457, №3. – P. 409–413.
29. Nikaido M., Nishihara H., Hukumoto Y., Okada N. Ancient SINEs from African endemic mammals // *Mol. Biol. Evol.* – 2003. – Vol. 20, №4. – P. 522–527.
30. Підпала О.В., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. До питання про походження віроїдів // *Фактори експериментальної еволюції організмів*. – 2008. – Т. 4. – С. 195–201.
31. Підпала О.В., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л. Фрагменти бактеріальних IS-елементів як компоненти еукаріотних генів / *Тези доповідей XII з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М.Виноградського*. – 2009. – С. 75.

PIDPALA O.V., LUKASH L.L.

*Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine
150 Zabolotnogo str., Kyiv 03143, Ukraine, e-mail: pidpala@ukr.net*

tRNA OF PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC ORIGIN AS STRUCTURAL UNITS OF EUKARYOTIC MOBILE GENETIC ELEMENTS

Aims. To examine whether bacterial tRNAs are a source of SINE elements and whether tRNAs of prokaryotic and eukaryotic origin are components of MGE of other classes. **Methods.** Sequences that are homologous fragments of eukaryotic MGE have been determined using the program Censor. **Results.** The sequences of tRNAs of bacterial origin were shown to be a source of SINE elements. It was shown that the sequences of tRNAs of prokaryotic and eukaryotic origin are components of other classes of MGE and in the case of eukaryotic tRNA sequences they are a source of the satellite repeats as well. **Conclusions.** The sequences of prokaryotic and eukaryotic tRNAs are not only a source of SINE elements, but also of the structural units of other MGE classes, namely, LTR-retrotransposons, and DNA transposons.

Key words: tRNA, mobile genetic elements, SINE elements, structural units.

ПОТАПОВА Т.В.^{1,2}, ЗУБО Я.О.^{1*}, ТАРАСЕНКО В.И.², НЕВИНСКИЙ Г.А.⁴, БЕРНЕР Т.¹,
КОНСТАНТИНОВ Ю.М.^{1,2,3}

¹*Institute für Biologie/Genetik, Humboldt-Universität zu Berlin, Chaussestr., 117
Germany, 10115, Berlin*

²*Сибирский институт физиологии и биохимии СО РАН
Россия, 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 123*

³*Иркутский государственный университет
Россия, 664033, Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5*

⁴*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, пр-т Ак.
Россия, 630090, Новосибирск, Лаврентьева, 8*

* *Current address – Dartmouth College, 78 College st., Hanover, NH, 03755, USA*

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТРАНСКРИПЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У *ARABIDOPSIS THALIANA*

Окислительный стресс относится к числу наиболее опасных видов стресса для растительных организмов, поскольку мишенью действия повреждающих факторов в этих условиях являются основные типы информационных биополимеров (ДНК, РНК и белки). Наблюдаемые при этом нарушения экспрессии генов основных ДНК-содержащих органелл растительной клетки (ядра, хлоропластов и митохондрий) могут приводить к серьезным метаболическим и структурным повреждениям клетки, включая возможную ее гибель. К числу наиболее важных последствий при действии факторов окислительного стресса относится нарушение нормальной работы генетического аппарата клетки. Однако, до самого последнего времени детальных исследований изменений экспрессии митохондриальных генов не проводилось. Одним из

информативных подходов для решения этой задачи может быть использование экспериментальных систем *in vivo* с применением прооксидантов.

В настоящей работе с использованием метода run-on транскрипции исследовано влияние гербицида метилвилогена (параквата) на интенсивность транскрипции митохондриальных генов растений дикого типа арабидопсиса (WT) и трансгенной линии XX2 с повышенной экспрессией гена АОХ1а, кодирующего альтернативную оксидазу. Обнаружено, что обработка растений обеих линий паракватом вызывает достоверное снижение транскрипционной активности исследованных митохондриальных генов, однако, подавление транскрипции было менее выражено в митохондриях линии XX2.

Материалы и методы

Растительный материал и обработка ингибиторами. Семена арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh) линии Col-0 (растения дикого типа, экотип “Columbia”), и линии XX-2 (растения, трансформированные конструкцией, экспрессирующей ген *aox1a* в сенсовой ориентации) получены из банка семян NASC (Великобритания). Растения выращивали в климатических камерах при температуре 20-23°C, 16-ти часовом освещении (130 мкмоль квантов м⁻²с⁻¹) (Lamp Master HPI-T Plus 400W E40) («Philips»). Семена проращивали в кюветах в почве, смешанной с перлитом в соотношении 1:1. Возраст растений определяли с момента прорастания семян. Инкубацию срезанных растений на воде и растворах ингибиторов проводили при постоянном освещении интенсивностью 180 или 270 мкмоль квантов м⁻²с⁻¹ в течение 4-х часов. Конечная концентрация метилвилогена при экспозиции срезанных растений в

водном растворе составляла 0,5 mM. В контрольном варианте срезанные растения инкубировались в течение 4-х часов в воде.

Выделение митохондрий. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующей очисткой в градиенте плотности сахарозы как описано в [1] в нашей модификации. Для этого 12-дневные растения (10 г) гомогенизировали в 90 мл буфера А (0.3 М сахароза, Na₂P₂O₇ 5 mM, 2 mM EDTA, PVP 1%, BSA 1%, цистеин 5 mM, 5 mM в-меркаптоэтанол). Гомогенат пропускали через миракрос (“Calbiochem-Boehring”) и центрифугировали при 5000 g 15 мин. Отбирали супернатант и центрифугировали 20 мин при 22000 g. Полученный осадок ресуспендировали в 20 мл среды промывания (буфер Б: 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, and 4 mM в-меркаптоэтанол). Затем добавляли буфер Б до 40 мл и центрифугировали суспензию при 3000 g 5

мин. Супернатант отбирали в новые стаканы и центрифугировали при 18000 g 15 мин. Осадок ресуспендировали в 8 мл буфера Б и затем гомогенизировали с помощью поттера объемом 15 мл. Суспензию центрифугировали при 3000 g 5 мин. Затем супернатант наносили на градиент перколла 18%/25%/50% и центрифугировали при 40,000 g 30 мин. Интактные митохондрии собирали между фазами 25% и 50% перкольного градиента. Митохондрии промывали дважды в буфере Б и центрифугировали при 22000 g 10 мин. Конечный осадок митохондрий ресуспендировали в 0.5 - 1 мл буфера Б. Все процедуры проводились при 4° С. Концентрацию митохондриального белка определяли по методу Бредфорда (1976) с красителем Кумасси голубой R-250 с использованием набора «Bio-Rad Protein Assay» («Bio-Rad»). Стандартная кривая для определения концентрации белка построена с использованием БСА («Sigma»). Митохондрии использовались в run-on транскрипции сразу после выделения.

Run-on транскрипция. Изучение транскрипции митохондриальных генов проводили методом run-on транскрипции [1] в нашей модификации. Подбор праймеров для исследуемых генов осуществляли при помощи программы Vector NTI. Интактные митохондрии (в количестве, эквивалентном 100 мкг митохондриального белка) добавляли к реакционной смеси, содержащей 50 мл транскрипционного буфера (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM CTP, GTP и ATP, 0.01 mM UTP, 50 mCi [³²P]UTP («Amersham»), 20 ед. РНазин («Fermentas») и 10 mM в-меркаптоэтанол. Реакционная смесь осто-

рожно пипетировалась 6 раз для разрушения митохондрий. Раствор инкубировали 15 мин при 25°С и останавливали реакцию добавлением эквивалентного объема стоп-буфера (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 25 mM EDTA, 5% саркозил). ³²P-меченные транскрипты изолировали из митохондрий, как описано в работе [2], и гибридизовали с нанесенными на нейлоновую мембрану митохондриальными генами, в буфере, содержащем 250 mM Na₂HPO₄, 7% SDS, и 2.5 mM EDTA. Радиоактивные сигналы детектировали с помощью сканера «Molecular Imager FX» с использованием программы «Quantity One software» («Bio-Rad»). Эффекты ингибиторов, используемых в run-on транскрипции митохондриальных генов, рассматривались как достоверные, если сигналы отличались от контрольного варианта (срезанные растения, инкубируемые в воде), как минимум, в 2 раза. Все эксперименты выполнены в 3-4-х повторностях.

Нанесение митохондриальных генов на мембрану. Тотальная ДНК была изолирована из *Arabidopsis thaliana* Col-0 методом фенол-хлороформной экстракции и обработана РНазином (DNase-free) («Fermentas»). Фрагменты 31 митохондриальных генов были амплифицированы с помощью ПЦР. Генные фрагменты наносились на нейлоновую мембрану Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech). ДНК каждого генного фрагмента в количестве 1 мкг обрабатывали, как описано [2], и затем наносили на мембрану в двух повторностях с помощью аппарата Bio-Dot («Bio-Rad»). Схема нанесения фрагментов изучаемых генов на нитроцеллюлозную мембрану приведена рис. 1, А.

Результаты и обсуждение

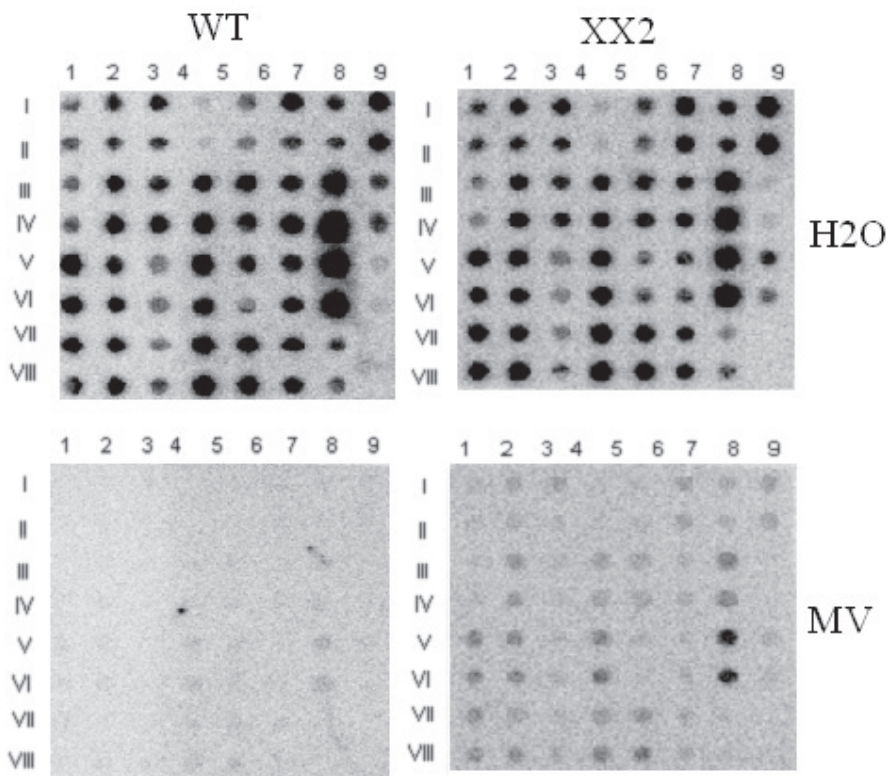
Исследованные в данной работе гены являются представителями разных функциональных групп митохондриального генома: 3 гена рибосомальных РНК, 8 генов транспортных РНК, 4 кодирующих рибосомальные белки гена, 9 кодирующих компоненты дыхательной цепи генов, 3 кодирующих субъединицы АТФ-синтазы гена, 4 гена биогенеза цитохрома с и

гены *orf*. Из представленных на рис. 1, В данных можно видеть, что обработка растений дикого типа паракватом, в целом, оказывает негативное влияние на митохондриальную транскрипцию. При этом необходимо отметить, что снижение скорости транскрипции проявлялось в различной степени для отдельных митохондриальных генов.

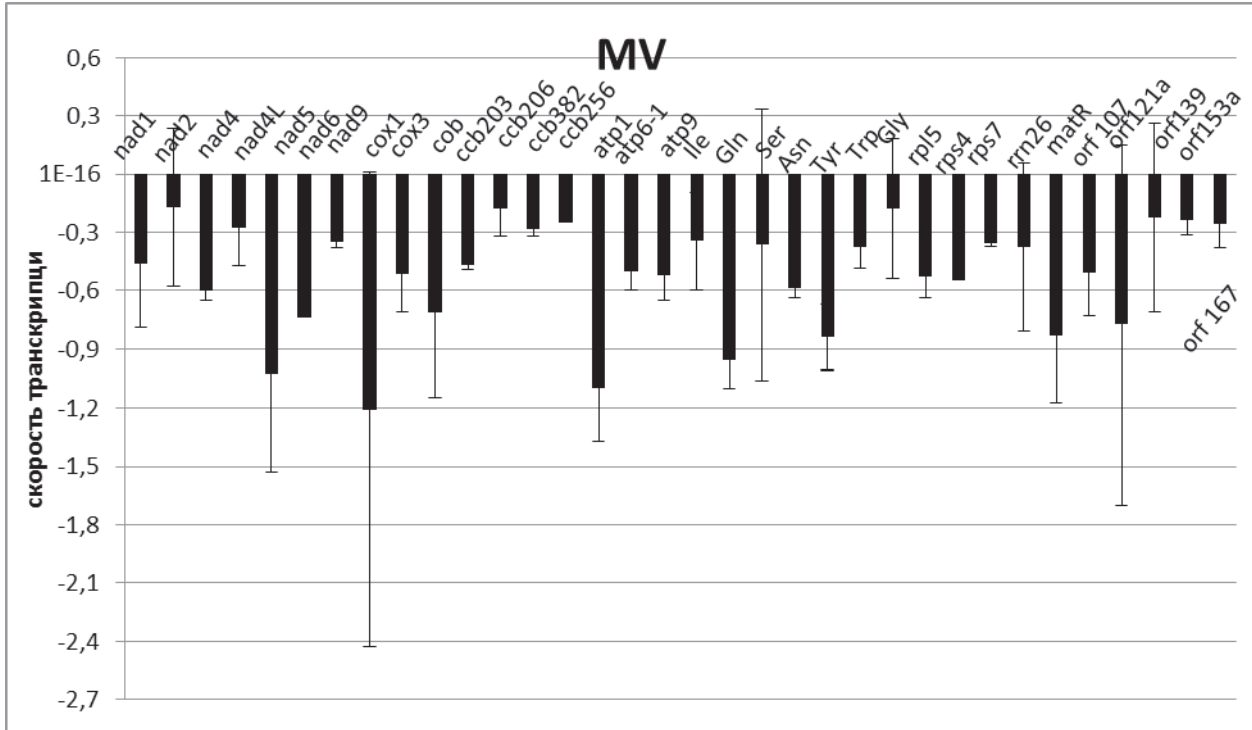
А.

	1	2	3	4	5	6	7	8
I, II	nad1	nad5	cob	ccb382	Ile	Trp	rps7	orf139
III, IV	nad2	nad9	ccb203	atp1	Gln	Gly	rnr26	orf153a
V, VI	nad4	cox1	ccb206	atp6-1	Ser	rpl5	orf 107	orf 167
VII, VIII	nad4L	cox3	ccb256	atp9	Tyr	rps4	orf121a	

Б.



В.



Г.

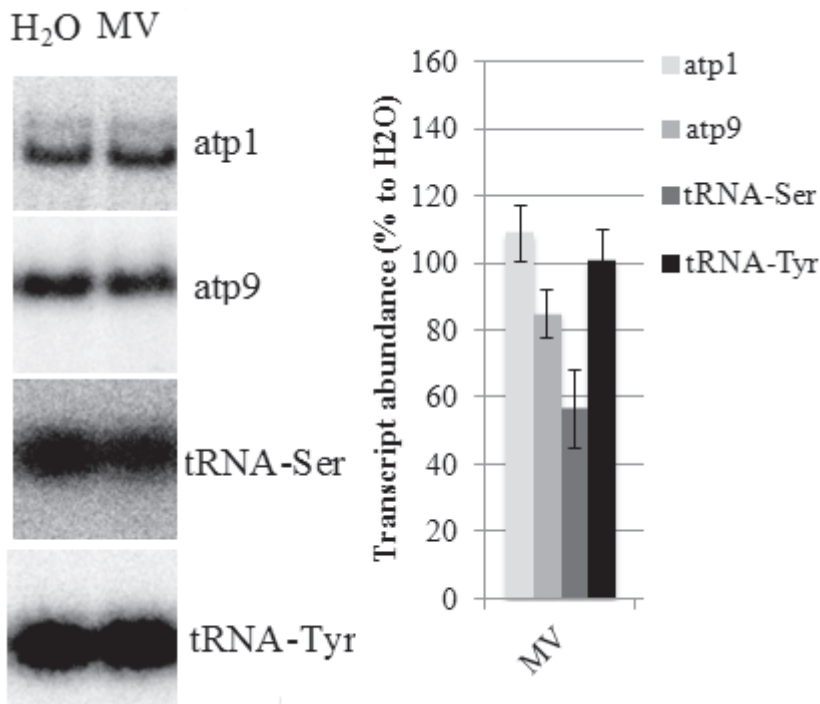


Рис. 1. Влияние параквата (MV) на скорость транскрипции митохондриальных генов в 12-дневных проростках арабидопсиса условиях *gun-on* эксперимента. Митохондрии выделяли из проростков арабидопсиса, инкубированных в растворе MV или воде в течение 4-х часов. А – схема нанесения фрагментов ДНК для 31 гена. Б – радиоавтограф результатов транскрипции митохондриальных генов. В – гистограмма значений транскрипции для всех генов. Г – гистограмма содержания транскриптов генов *atp1*, *atp9*, *mPHK-Ser*, *mPHK-Tyr*

Эффект параквата на содержание митохондриальных транскриптов был сильнее, чем его эффект на скорость транскрипции (рис. 1, Г). При этом содержание транскриптов *tPHK-Ser* уменьшалось до 56%. Уровень транскриптов гена *atp9* также достоверно снижался, тогда как содержание транскриптов генов *atp1* и *tPHK-Tyr* не отличалось от контрольного варианта

(рис. 1, Г). Сравнение результатов определения скорости транскрипции митохондриальных генов растений арабидопсиса дикого типа и линии XX2 при их обработке паракватом показало меньшую степень подавления митохондриальной транскрипции в линии XX2, что можно объяснить защитным эффектом повышенной экспрессии гена *AOX1a*.

Выводы

1. С использованием метода *gun-on* транскрипции исследовано влияние гербицида параквата на интенсивность транскрипции митохондриальных генов растений арабидопсиса дикого типа и трансгенной линии XX2 с повышенной экспрессией гена *AOX1a*, кодирующего альтернативную оксидазу.

2. Обработка растений обеих линий паракватом вызывает достоверное снижение транскрипционной активности исследованных митохондриальных генов, однако, подавление транскрипции менее выражено в митохондриях линии XX2, что можно объяснить защитным эффектом повышенной экспрессии гена *AOX1a*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного междисциплинарного проекта СО РАН № 59, гранта РФФИ 12-04-01148-а и Министерства образования и науки Российской Федерации.

Литература

1. Giege P., Hoffmann M., Binder S., Brennicke A. RNA degradation buffers asymmetries of transcription in Arabidopsis mitochondria // EMBO Rep. – 2000. – Vol. 2 – P. 164-170.

2. Zubo Y.O., Kusnetsov V.V. Application of run-on transcription method for studying the regulation of plastid genome expression // Russ. J. Plant Physiol. – 2008. – Vol. 55 – P. 114-122.

POTAPOVA T.V.^{1,2}, ZUBO Y.O.^{1*}, TARASENKO V.I.², NEVINSKY G.A.⁴, BÖRNER TH.¹, KONSTANTINOV Y.M.^{1,2,3}

¹*Institute for Biologie/Genetik, Humboldt-Universität zu Berlin, Chausseestr., 117 Germany, 10115, Berlin,*

²*The Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS Russia, 664033, Irkutsk, Lermontova st., 132, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru*

³*The Irkutsk State University, Sukhe-Batar st., 5 Russia, 664033, Irkutsk*

⁴*The Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS Russia, 630090, Novosibirsk, Acad. Lavrent'ev Pr., 8*

* *Current address – Dartmouth College, 78 College st., Hanover, NH, 03755, USA*

STUDIES OF OXIDATIVE STRESS INFLUENCE ON MITOCHONDRIAL GENES TRANSCRIPTION IN ARABIDOPSIS THALIANA

Aims. The influence of oxidative stress on mitochondrial genes transcription in wild type Arabidopsis plants and XX2 line overexpressing AOX1a gene was studied. **Methods.** Transcriptional activity of mitochondrial genes was measured by run-on assays with mitochondria isolated from Arabidopsis plants treated by methylviologen (MV). **Results.** Treatment by methylviologen of wild type plants resulted in decrease of mitochondrial genes transcript level and MTR values. It was shown also that mitochondrial genes transcription rate in XX2 line plants was less sensitive to oxidative stress caused by MV in comparison to wild type plants. **Conclusions.** The results obtained show the importance of *in organello* run-on transcription system in studies of physiological mechanisms of mitochondrial genes transcriptional regulation *in vivo*. **Key words:** mitochondrial genes transcription, oxidative stress, methylviologen.

СТЕГНИЙ В.Н.

Томский государственный университет

Россия, 634050, г. Томск, пр. Ленина 36, e-mail: stegniy@res.tsu.ru

ПРИНЦИПЫ ЭВОЛЮЦИОННОЙ И АДАПТАЦИОННОЙ ЗНАЧИМОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ВИДОВЫХ ГЕНОМОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ

В селекционной работе нередко случаи, когда некоторые виды растений и животных, используемые как исходный материал, плохо реагируют на отбор по требуемым признакам и не проявляют необходимого уровня адаптивной генетической пластичности. Причиной этого могут быть разные обстоятельства и прежде всего особенности генетической конституции видов, используемых для селекции. Изучение генетических аспектов видообразования и адаптации, проводимое мной около 40 лет позволило выявить ряд генетических параметров, различающих эволюционно лабильные виды (генераторы видообразования) и виды, эволюционно консервативные (терминальные звенья филогенетических цепей) [1]. Для обоснования сути проблемы кратко рассмотрим характер эволюции эукариот.

Эволюционное развитие жизни на Земле

осуществлялось на основе выявленных Ламарком двух главных процессов: 1) повышения уровня организации (градация); 2) возникновения разнообразия типов организации на каждом уровне. Впоследствии Б. Ренш вертикальную эволюцию (градации) назвал *анагенезом*, а горизонтальную – *кладогенезом*, который связан с адаптивной радиацией. Дж. Хаксли добавил третье направление – *стастигенез* – явление эволюционной стабилизации, то есть сохранения неизменяющихся, персистирующих ветвей. Повышение уровня организации (*вертикальная эволюция*) и возникновение адаптивного разнообразия таксонов на каждом уровне (*горизонтальная эволюция*) имеют принципиальные различия по способу своего осуществления. Для вертикальной эволюции Э. Коп в 1896 году разработал правило неспециализированности предков: новые крупные таксономиче-

ские группы возникают из малоспециализированных «родительских» таксонов. Так, млекопитающие и птицы возникли не от высокоспециализированных форм рептилий, а от примитивных малоспециализированных мелких рептилий; амфибии – от примитивных рыб (двоякодышащих); голосеменные растения – от неспециализированных папоротников; покрытосеменные – от неспециализированных голосеменных (беннетитовых). Отсутствие специализации определяет возможность возникновения принципиально новых приспособлений. Существует разделение на узкоспециализированные экологические ниши (стенобионтные виды) и на широкоспециализированные экологические ниши (эврибионтные виды). Величина ареалов и степень экологической пластичности видов являются параметрами узкоспециализированных и широкоспециализированных видов.

Интуитивно Э.Коп, и его последователи оценивают неспециализированность таксона как минимальную адаптированность к существующим условиям обитания и наличие преадаптивных потенций к принципиально новым средовым факторам, при этом разные органы и системы организма у таких форм не имели жестко коррелированных и координированных отношений. Непосредственно с правилом Копы связано правило прогрессирующей специализации Ш. Депере, которое гласит, что таксономическая группа, вступившая на путь специализации, как правило, в дальнейшем развитии будет идти по пути все более глубокой специализации. Формы, вставшие на путь специализации, уже не возвращаются в исходное (малоспециализированное) состояние, но могут порождать новые виды с еще более увеличивающейся специализацией. Последние обычно формируются адаптивный генетический полиморфизм на генном и хромосомном уровне, который является средством сохранения их высочайшей эко-климатической эврибионтности на основе популяционно-генетического (видового) гомеостаза. Эти виды уже не способны к видообразованию (эволюционно консервативные) и представляют тупиковые (терминальные) формы как на пути горизонтальной эволюции, так и тем более – вертикальной. Вышеприведенные макроэволюционные правила (неспециализированности предков и прогрессирующей специализации) логически приводят нас к правилу необратимости эволюции Л. Долло, которое гласит: «организм (таксон) не может вернуться к состоянию предков, даже если он и окажется в аналогичных условиях». Понятие специализированности имеет

двойкий смысл: это и строение органов, это и степень общей приспособленности таксона.

Используя принцип точной реконструкции филогенеза, открытый Стертевантом и Добжанским в 30-х годах, позволил мне определить последовательность видов в филетических линиях. Направления видообразования оценивали на основе реконструкции филогенеза видовых комплексов в основном по фиксированным хромосомным инверсиям [2]. В основу метода положено допущение, что любая хромосомная инверсия уникальна по локализации точек разрывов на хромосоме и монофилитична по происхождению. Таким образом, если три вида различаются заходящими фиксированными инверсиями по какой-либо хромосоме, то можно провести реконструкцию связей этих видов и точно установить промежуточное звено в этой системе. Если же виды различаются заходящими инверсиями и по другим хромосомам кариотипа и реконструкция межвидовых связей по каждой хромосоме совпадает, то значительно увеличивается вероятность того, что данная филогенетическая система естественна. Базируясь на теории монофилетического происхождения локальных инверсионных перестроек, можно заключить, что если несколько видов идентичны по структуре какой-либо хромосомы, то эта структура является филогенетически исходной по сравнению с любой другой уникальной инверсионной формой. Такое положение согласуется с принципами филогении, разработанными Heping, позволяет оценить направление эволюции не только отдельных хромосом, но и целых видовых кариотипов. Хромосомный анализ малярных комаров, проведенный нами, позволил установить филогенетические связи видов, различающихся фиксированными инверсиями. В Палеарктике выявлено две группы гомосеквентных видов (имеющих идентичную структуру дисков политенных хромосом): это *labbranchiae* – *atroparvus* и *subalpinus* - *maculipennis*. Филогенетически исходным в палеарктическом комплексе *maculipennis* является один из видов группы *labbranchiae* - *atroparvus*. По данным межвидовой гибридизации и анализа структуры политенных хромосом, именно эта группа представляет собой связующее звено между палеарктической группой *maculipennis* и неарктической. Эволюционно лабильные виды (стволовые) биологи относят к малоспециализированным, а эволюционно консервативные – к высокоспециализированным, что имеет доказательную базу и соответствует правилу Э. Копы о мало- (или) неспециализированных предках и правилу Ш. Депере

о возрастающей специализации в ходе адаптивной эволюции таксона. Первые виды порождают кластеры дочерних, среди которых образуются широко адаптированные (эврибионтные), часто хромосомно-полиморфные (или полиплоидные) виды, терминирующие филогенетические цепи [3]. Видообразование в Палеарктике осуществлялось по двум филетическим линиям, причем его направление хорошо согласуется с характером современного распространения видов, которое, очевидно, отражает историю проникновения фауны *maculipennis* с запада на восток Палеарктики. *A. messeae*, занимая терминальное положение в филогении палеарктической группы *maculipennis*, обладает наибольшим инверсионным полиморфизмом и эколого-климатической пластичностью.

Отличия геномных характеристик эволюционно лабильных и консервативных видов вскрытые в настоящей работе касаются таксономических группировок разного уровня. Для семейств преобладают показатели числа и морфологии хромосом, для триб – показатели уровня рекомбинации, для родов и близкородствен-

ных видов – дубликации генома, различия по фиксированным хромосомным перестройкам, гетерохроматиновые модификации и хромосомно-мембранные отношения. Выявленные параметры структурно-функциональной организации генома у видов-генераторов видообразования и видов – инертных (консервативных) в плане видообразования характеризуют эволюционную гетеропотенцию видовых геномов и неравнозначность видов по отношению к естественному отбору. Первые – генерируют кластеры дочерних видов, вторые – создают видовую систему генетической адаптации (полиморфизма) и обычно терминируют филетические цепи. Эволюционно лабильные виды имеют сравнительно малые ареалы и узкую экологическую нишу (стенобионты), а эволюционно консервативные виды – большие ареалы (эврибионты). В нижеприведенной таблице отражены эволюционно значимые принципы организации видовых геномов, при этом степень отличий оценивается в сравнительном плане для конкретной группы родственных таксонов.

Параметры (показатели) геномной системы	Эволюционно лабильные видовые геномы	Эволюционно консервативные видовые геномы
Число и морфология хромосом	Большое число хромосом, преобладание акроцентриков	Меньшее число хромосом (редукция посредством робертсоновских слияний, преобладание мета- и субметацентриков)
Плоидность (уровень дубликации геномов)	Низкая	Высокая
Уровень рекомбинации	Высокий	Низкий
Количество межвидовых (фиксированных) хромосомных перестроек	Малое	Большое
Хромосомный (внутривидовой) полиморфизм по инверсиям, транслокациям, В-хромосомам	Низкий	Высокий
Гетерохроматин (организация и количество)	Локальный (концентрированный в хромоцентре, микрохромосомах, половых хромосомах), большое количество	Диспергированный по длине хромосом, малое количество (редукция)
Хромосомно-мембранные связи	Локально распределенные по ядру (наличие локального хромоцентра)	Распределение связей по оболочке ядра (диффузные хромоцентры)
Аллельный (генный) полиморфизм	Высокий	Низкий
Мобильные генетические элементы	Локализованы в микрохромосомах, половых хромосомах и центромерных районах	Диспергированы по длине хромосомных плеч

Таким образом, при эволюционном развитии таксона в горизонтальном направлении (кладогенез или адаптивная радиация) признаки малоспециализированности эволюционно лабильных видовых геномов при каждом шаге видообразования постепенно замещаются в процессе прогрессирующей специализации на признаки альтернативные (эволюционно консервативные), достигающие своего максимального выражения у терминальных видов: снижение числа акроцентриков (робертсоновские слияния), полиплоидизация, «диспергирование» гетерохроматина, резкое ограничение рекомбина-

ции, образование адаптивного инверсионного полиморфизма, расширение зон прикрепления хромосом к ядерной оболочке (консервация структуры ядра).

В селекционной работе следует отдавать предпочтение видам (среди близкородственной группы), имеющим следующие параметры: меньшее число хромосом, низкий уровень рекомбинации, высокий внутривидовой хромосомный полиморфизм, диспергированные по хромосомам гетерохроматин и мобильные генетические элементы, наличие диффузных хромосомных центров.

Литература

1. Стегний В.Н. Эволюционные потенции хромосомных и полиморфных видов // Фенетика популяций. – М: Наука, 1982. – С. 112-116.
2. Стегний В.Н. Популяционная генетика и эволюция малярийных комаров. – Томск: Изд-во Томского университета, 1991. – 136 с.
3. Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. – Новосибирск: – Изд-во Новосибирского университета, 1993. – 110 с.

STEGNIY V.N.

Tomsk State University

Russia, 634050, Tomsk, Lenin str. 36, e-mail: stegniy@res.tsu.ru

THE PRINCIPLES OF EVOLUTIONARY AND ADAPTIVE SIGNIFICANCE OF THE ORGANIZATION OF SPECIES GENOMES AND THEIR USE IN SELECTION

Aims. The study of the genetic aspects of speciation and adaptation, which was conducted by me for about 40 years, revealed a number of genetic parameters that distinguish evolutionarily labile species (speciation generators) and evolutionary conservative species (terminal units phylogenetic chains). **Results.** Identified parameters of structural and functional organization of the genome in the generators speciation species and the inert (conservative) species in terms of speciation characterize evolutionary heteropotential species genomes and nonequivalence species in relation to natural selection, and probably to the artificial selection in breeding. **Conclusions.** In breeding work should be preferred species (among closely related groups), having the following parameters: a smaller number of chromosomes, low levels of recombination, high intraspecific chromosomal polymorphism, on chromosome heterochromatin dispersed and mobile genetic elements, the presence of diffuse chromocenters.

Key words: speciation, adaptation, selection, genome organization.

ТЕРНОВСЬКА Т.К., АНТОНЮК М.З. МАРТИНЕНКО В.С.

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

ГЕНИ – ПРОМОТОРИ ОСТИСТОСТІ У ГЕНОМАХ *TRITICINAE*

Остистість колоса м'якої пшениці контролюється генами *Hd* (4AS), *B1* (5AL) та *B2* (6BL), домінуючі алелі яких пригнічують розвиток остей [1]. У диплоїдних та тетраплоїдних пшениць остистість може домінувати над безостистістю [2] хоча гени-промотори остистості дотепер не

ідентифіковано. На егілопах різного геномного складу генетичний контроль ознаки не вивчено, хоча, судячи з фенотипу колосу, лише геном *T Aegilops mutica* містить ген(и)-інгібітор остистості, всі інші егілопси з геномами S, U, C, M характеризуються остистим колосом, хоча ступінь

розвитку остей та їхнє розташування на колосі варіюють. Для встановлення хромосомного розташування промотора остистості у геномах трьох видів егілопсів було досліджено інтрогресивні лінії м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) з генетичним матеріалом від *Ae. sharonensis*, *Ae. speltoides*, *Ae. umberlulata*, обсяг та локалізація якого у різних лініях розрізняється [3]. Інтрогресивні лінії було створено через схрещування геномно-заміщених амфідиплоїдів, відповідно, Аврозису (AABBS^{sh}S^{sh}), Авродесу (AABBSS), Авролати ((AABBUU) з м'якою пшеницею сорту Аврора (AABBDD), яка була джерелом тетраплоїдного компонента AABВ у складі їхніх геномів. Сорт Аврора безостий, має

Матеріали і методи

Рослинний матеріал: 1) сорт м'якої пшениці Аврора; 2) геномно-заміщені амфідиплоїди Авродес, Аврозис, Авролата, 3) 68 ліній — похідних Авродесу, 48 ліній — похідних Аврозису, 79 ліній — похідних Авролати, 4) F₁, F₂ та F₃ від схрещування декількох інтрогресивних ліній одна з однією та с сортом Аврора. Рослини були остисті (О), безості (Б), з остеподібними (ОВ) відростками.

У гібридів F₁ вивчали мейотичну конфігурацію хромосом у метафазі М1 материнських клітин пилку. Кількість облігатних унівалентів вказували для максимальної асоціації хромосом у метафазі. Для електрофорезу гліадинів використовували поліакриламідний гель (ПААГ) за модифікованої системи Бжезинського. Електро-

Результати та обговорення

Оцінка ліній за ознакою остистості та електрофоретичним спектром гліадинів, бета та альфа-амілази (табл. 1) свідчить, що для трьох груп інтрогресивних ліній розвиток остей асоційований з наявністю у електрофоретичних спектрах компонентів, притаманних спектрам геномно-заміщених амфідиплоїдів, причому гени, що контролюють ці білки, розташовані у хромосомах 6-ої гомеологічної групи. Це підтверджує більш ранній висновок про наявність у геномі D сорту Кавказ та геномі *Ae. tauschii* у складі геномно-доданих амфідиплоїдів гена *b_n*, промотора розвитку виражених остеподібних відростків [4]. Вивчення спектрів бета-амілази (хромосоми 4А та 5А пшениці) не виявило будь-якої асоціації між остистістю та компонентами спектру.

Зіставлення результатів генотипної оцінки ліній за остистістю та компонентами спектра з картиною асоціації хромосом у мейозі F₁ від схрещування ліній з сортом Аврора свідчить, що

ген *В1* та, можливо, ген-промотор остеподібних відростків *b_n* локалізований у хромосомі 6D [4]. Всі отримані нами раніше геномно-заміщені амфідиплоїди, які об'єднали один і той самий тетракомпонент АВ м'якої пшениці з диплоїдним геномом деяких споріднених пшениці представників *Triticinae*, крім Авротики з геномом AABVTT, були з остями, незважаючи на присутність в їхніх геномах гена *В1*. Отже, ген *В1* поводить як ген з неповним домінантним епістазом стосовно гена-промотора розвитку остей чужинного походження. Метою даного дослідження було встановити, які хромосоми згаданих егілопсів мають ген-промотор остистості.

Форез ізоферментів β- та α-амілази проводили за нативних умов. ДНК для ПЛР виділяли із листя чи етиольованих паростків з використанням СТАВ-буферу. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 50 мкл містила: 250 нМ кожного праймеру, 50 нг ДНК, 0,2 мМ dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 1,5 мМ MgCl₂; 2 од. Таq-полімерази (Fermentas) у буфері виробника. Умови проведення ПЛР відповідали рекомендаціям оригінаторів мікросателітних локусів. Електрофорез продуктів ампліфікації проводили у 6% денатуруючому ПААГ з 7М сечовиною, візуалізували за допомогою азотнокислого срібла. Методи статистичної обробки стандартні.

Лише частина ліній, які виявляють наявність чужинного хроматину, є чужинно-заміщеними, решта мають перебудовані за рахунок транслокацій та, можливо, делецій хромосоми. Найбільш придатними для гібридологічного аналізу виявилась група з 17 ліній Аврозису в 20 комбінаціях схрещування, три лінії Авродесу в двох комбінаціях та дві лінії Авролати.

З 17 ліній Аврозису дві були безостими як Аврора, три мали остеподібні відростки, як Аврозиса, решта були остистими. Поява у інтрогресивних лініях рецесивної ознаки може бути пояснена тільки через втрату їхніми геномами гена *В1*. Коли субгеном АВ є гомозиготним за геном *В1*, лінії, що містять пару гомологічних хромосом з геном-промотором остистості *awn^P*, демонструють такий фенотип, як у Аврозису, наявність остеподібними відростків. Якщо лінія не має генів-промоторів остистості, вона безоста, як сорт Аврора. Лінія, в якій є ген *awn^P* проте

немає доміантного інгібітора остистості *B1*, характеризується повним розвитком остей. Всі гібриди F_1 від схрещування остистих ліній одна з однією були остистими. У F_2 від деяких комбінацій було знайдено кілька рослин з остеподібними відростками замість повноцінних остей.

Вивчення метафази 1 мейоза МКП F_1 виявило наявність обов'язкових унівалентів, що є фактором, що спотворює фактичні співвідношення розщеплення у популяціях F_2 проти очікуваного і може призвести до появи нелегітимних фенотипів [5].

Таблиця 1. Асоціація між остистістю та компонентами електрофоретичних спектрів, які контролюються генами хромосом групи 6. До остистого фенотипу віднесено також колосся з остеподібними відростками

Геномно-заміщений амфідиплоїд – джерело інт-рогресій	Кількість ліній з фенотипом	Наявність компонентів спектру, що маркують хромосому 6-ї групи егілопса	Відсутність компонентів спектру, що маркують хромосому		
			6A	6B	6D
Авродес	45 безостих	1	4	0	2
	23 остистих	16	3	0	11
Аврозис	30 безостих	3	2	1	4
	18 остистих	13	1	4	9
Авролата	40 безостих	12	1	0	2
	39 остистих	26	7	0	17

Розрахунки показують [5], що загальна нестабільність мейозу гібрида з унівалентними хромосомами призводить до формування у нього різних за хромосомним складом гамет, що відбивається на розщепленні за різними генами, в тому числі і за тими, які локалізовані не у тих хромосомах, що залишаються унівалентними у мейозі. Отже остисті лінії скоріше за все мають однаковий генотип за критичними генами. Гіб-

риди F_1 від схрещування безостих та остистих ліній були з остеподібними відростками (OB), а у F_2 спостерігали розщеплення на три звичайні градації: 262(OB) + 144(O) + 83(Б). Можна припустити такі гаплотипи компонентів схрещування (табл. 2): $B1b_n \times del\ awn^P$ Тоді у F_2 очікується співвідношення класів 8 (OB) : 5(O) : 3(Б), зважаючи на такі відповідності між генотипом та фенотипом рослин:

$1\ del\ del\ awn^P\ awn^P\ (O)$	$1\ B1B1\ awn^P\ awn^P$	(OB)	$2\ del\ B1\ awn^P\ awn^P\ (O)$
$2\ del\ del\ awn^P\ b_n(O)$	$2\ B1B1\ awn^P\ b_n(Б)$		$4\ del\ B1\ awn^P\ b_n(OB)$
$1\ del\ del\ b_n\ b_n(OB)$	$1\ B1B1\ b_n\ b_n\ (Б)$		$2\ del\ B1\ b_n\ b_n(OB)$

$\chi^2=3,01 < \chi^2_{st0,05}$ для $df=2$

Дві з трьох ліній з остеподібними відростками утворюють безості F_1 з Авророю, одна – гібрид з остеподібними відростками. Отже, генетична основа ознаки у різних лініях різна: лінії $B1\ awn^P$ формують безості гібриди F_1 з Авророю, $del\ b_n$ — гібрид з остеподібними відростками.

Аналогічні результати спостерігали при вивченні остистої, безостої та напівостистої ліній з числа похідних Авродесу. Співвідношення розщеплення у F_2 від циклічного схрещування трьох ліній засвідчило, що у геномі остистої ліній відсутній (або не функціонує) ген *B1*. Коли цей ген у наявності, ген-промотор остистості чужинного походження awn^P спричинює розвиток остей, а ген b_n субгеному D пшениці – остеподібних відростків.

подібних відростків.

Гібриди F_2 та F_3 від схрещування ліній – похідних Авролати 211 (безоста) та 206 (остиста) було піддано мікросателітному аналізу для з'ясування геномної структури ліній, контрастних за ознакою остистість. За даними вивчення мейозу у F_1 від схрещування ліній з Авророю, лінія 211 не відрізняється від Аврори, а геном лінії 206 характеризується декількома змінами стосовно геному Аврори. Два облігатні уніваленти свідчать про наявність у геномі лінії або заміщеної чужинної хромосоми або великої хромосомної перебудови, такої як транслокація з участю чужинної хромосоми. В деяких пластинках кількість унівалентів збільшується до чотирьох. Телоцентрики та дицентрики відсутні. Для

перевірки припущення про перебудову хромосом, що містять задіяні у контролі остистості гени, в інтрогресивних ліній стосовно хромосом генотипу Аврора було використано мікросателітний аналіз з застосуванням мікросателітів, специфічних до хромосом 5A, 6B, 6D, в яких локалізовані гени, що беруть участь у розвитку остей. За результатами порівняння спектрів ампліфікації, які утворює геномна ДНК Аврори, Авролати та ліній з праймерами мікросателітних локусів, хромосома 6B ліній не зазнала жодних змін. Продукти ампліфікації ДНК з праймерами, специфічними до хромосоми 5A свідчать на користь припущення про делецію термінальної ділянки плеча 5AL, або його перебудову в лінії 206. В обох випадках у МІ мейозу може спостерігатися гетероморфний або відкритий бівалент або два уніваленти замість нього. Шість пар праймерів локусів хромосоми 6D виявились специфічними для цієї хромосоми і дали продукти ампліфікації з ДНК Аврори та лінії *res211*, але не з ДНК Авролати та лінії *res206*. Отже природним виявилось припущення, що лінія *res206* має заміщення 6D/6U, чим і пояснюється наявність двох облігатних унівалентів у МІ мейозу

МКП гібридів 206 x Аврора та 211 x 206. За результатами мікросателітного аналізу, геном лінії 206 має деякі відмінності від геному сорту Аврора. Хромосома 5A не дає продуктів ампліфікації з праймерами двох мікросателітних локусів, *Xwmc705-5A* та *Xbarc141-5A*, специфічними до її довгого плеча, де розташований ген-інгібітор остистості *B1*. Це може свідчити на користь припущення про делецію термінальної ділянки 5AL з геном *B1* та вказаними мікросателітними локусами, проте не виключає перебудову відповідної ділянки хромосоми з втратою функції гена *B1*. Замість хромосоми 6D сорту Аврора в геномі лінії у наявності хромосома 6U від *Ae. umbellulata*, остистого донора субгенома U штучного гексаплоїду Авролати (AABBUU), від якого веде своє походження остиста лінія 206. Отже, саме хромосома 6U має містити ген-промотор остистості *awn^P*. Ген не рецесивний, оскільки Авролата має ясно виражені остеподібні відростки, розвиток яких має контролюватися геном-промотором із субгенома U. Гаплотипи досліджених ліній: лінія 206 — *b1* (або *delB1*) (5A) *awn^P* (6U), лінія 211 — *B1* (5A) *b_n* (6D).

Таблиця 2. Гени різних геномів пшеницевих та їхній вплив на остистість колосу

Гени, що розташовані в геномах					Фенотип лінії з таким генотипом
A	D	S ^{sh}	S	U	
<i>B1</i>	<i>b_n</i>				безостий
<i>B1</i>		<i>awn^P</i>			остеподібні відростки
<i>B1</i>			<i>awn^P</i>		остеподібні відростки
<i>B1</i>				<i>awn^P</i>	остеподібні відростки
	<i>b_n</i>				остеподібні відростки
	<i>b_n</i>	<i>awn^P</i>			остистий
	<i>b_n</i>		<i>awn^P</i>		остистий
	<i>b_n</i>			<i>awn^P</i>	остистий

76 рослин F₂ було оцінено за електрофоретичними спектрами продуктів ампліфікації, отриманих з праймерами мікросателітних локусів *Xwmc705-5A*, *Xwmc105-6B*, *Xcfd45-6D*. Різниця між спектрами ліній 206 та 211 у всіх випадках полягала у відсутності компонента спектра для лінії 206, так що мікросателітний локус у розщепленні поведився як домінуючий з очікуваним співвідношенням 3 «1» : 1 «0», якому статистично відповідали фактичні співвідношення класів у всіх випадках (p>0.05). Перевірка комбінування алелів різних локусів підтвердило його незалежність, яка впливала апріорно із локалізації мікросателітних локусів. Для мікросателіта *Xcfd45-6D* серед 68 рослин F₂, оцінку яких

за остистістю було перевірено за даними розщеплення у F₃, було 58 рослин з наявним у спектрі компонентом та 18 рослин без компонента ($\chi^2 = 0,02$). Далі розглядали два варіанти сполучення ознак остистість колосу та спектр компонентів ампліфікації. Хай ген *b_n*, промотор остеподібних відростків пшениці, розташований у будь-якій хромосомі, відмінної від хромосоми 6D. Тоді алелі мікросателіту *Xcfd45-6D* та градації ознаки остистість будуть комбінувати незалежно, що і було підтверджено точним критерієм Фішера (P= 0,349). Якщо ген *b_n* локалізований у хромосомі 6D, то, беручи до уваги нашу гіпотезу про дигенний контроль ознаки, очікувалось наступне сполучення градацій ознаки остистість та

алелів мікросателітного локусу. Всі безості рослини $B1-b_n b_n$ з алелем «1», серед остистих 1/3 з алелем «0», це носії генотипу $b1b1Awn1Awn1$, а 2/3 — з алелем «1», це носії генотипу $b1b1Awn1awn1$. Серед рослин з остеподібними відростками 3/16 генотипів $B1-Awn1Awn1$ ($2B1b1Awn1Awn1 + 1B1B1Awn1Awn1$) з алелем «0», 6/16 генотипів $B1-Awn1-$ ($2B1B1Awn1awn1 + 4B1b1Awn1awn1$) та 1/16 генотипів $b1b1awn1awn1$ з алелем «1». Фактичні дані відповідають очікуванню ($P=0,7$ за точним критерієм Фішера). Отже, ген-промотор остистості локалізований у хромосомі 6D. Були визначені генотипи рослин F_2 за алелями мікросателітного локусу $Xwmc705-5A$, специфічного до хромосоми 5A. Обґрунтовуючи гіпотезу про генетичний контроль остистості, ми припускали, що лінія 206 має або термінальну делецію на довгому плечі цієї хромосоми, яка включає ген $B1$, або мутантний алель цього гена, який втратив здатність інгібувати ген-промотор остистості. У іншому разі рослини лінії не були б остистими. Спектр ампліфікації геному лінії 211 з праймерами цього мікросателітного локусу представлений одним компонентом «1», у спектрі лінії 206 компонента немає, «0». Здавалось би, що відсутність компонента ампліфікації з праймерами мікросателітних локусів, специфічних до хромосоми 5A, у спектрі остистої лінії може свідчити на користь припущення про делецію термінальної ділянки цієї хромосоми у складі геному лінії 206. Тоді серед нащадків F_2 мають з'явитися чотири фенотипні класи: остисті з «0»

Висновки

За результатом вивчення асоціації між компонентами електрофоретичних спектрів, які контролюються генами хромосом 6-ої групи, та градаціями ознаки остистість встановлено, що хромосоми цієї групи містять промотор остистості awn^P , можливо, ортологічний до слабого промотору остистості b_n , локалізованого у 6D. Гібридологічний аналіз із застосуванням інтро-

за мікросателітом, з остеподібними відростками з «0», з остеподібними відростками з «1» за мікросателітом та безості з «1». Фактично спостерігається 6 класів, які включають крім перелічених остисті рослини з «1» та безості рослин з «0», які не мали б з'являтися, якщо мікросателітний локус знаходиться у ділянці хромосоми 5A, яка делетована у остистої лінії 206. Отже, ми маємо припустити, що відсутність прояву гена $B1$ у складі лінії 206 пояснюється не відсутністю частини хромосоми з цим геном (делеція), а якоюсь перебудовою хромосоми, що призвела до мутації гена $B1$ у нефункціональний алель $b1$, а також до утворення нульового алелю за мікросателітним локусом $Xwmc705-5A$, наявність компоненту за яким було констатовано як для геному Аврори, так і Авролати. Порівняння фактичного розподілу рослин за фенотипними класами з теоретичними, які очікувались із припущення про незалежне комбінуння гена $B1$ та локуса $Xwmc705-5A$ показує надлишок остистих рослин з фенотипом «0» за мікросателітним локусом та безостих рослин з фенотипом «1» за мікросателітним локусом та нестачу остистих рослин з фенотипом «1» та безостих рослин за фенотипом «0», що дає змогу припустити зчеплення між вказаними генами у фазі $B1\langle 1 \rangle$ ($b1\langle 0 \rangle$). Проте, беручи до уваги можливо перебудовану структуру хромосоми 5A лінії 206, слід розуміти, що, визначаючи відстань між генами, насправді ми будемо визначати відстань між геном та перебудованою, відносно інтактною хромосоми 5A, ділянкою хромосом.

гресивних ліній показав неповний домінантний епістаз гена $B1$ стосовно генів awn^P . Остистий фенотип формується лише за умов відсутності (мутування) $B1$ у геномі за наявності awn^P чужинного походження. Пшеничний промотор остистості b_n забезпечує розвиток остеподібних відростків за відсутністю $B1$.

Література

1. McIntosh R.A., Hart G.E., Devos K.M., Gale M.D., Rogers W.J. Catalogue of gene symbols for wheat. In: A.E.Slinkard (Ed.) Proc. 9-th Intern Wheat Genet. Symp. Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 2-7 August, 1998. – University Extension Press, 1998. – Vol. 5. – 235 p.
2. Goncharov N.P Comparative-genetic analysis – a base for wheat taxonomy revision // Czech. J. Plant. Genet. Breed. – 41 (special issue). – P. 52–55.
3. 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.
4. Терновская Т.К. Геном D мягкой пшеницы. Наследование некоторых признаков морфологии колоса // Цитология и генетика. – 1997. – Vol. 31, №4. – С. 11–18.

5. Vdovychenko Zh.V., Antonyuk M.Z., Ternovskaya T.K. Genetic analysis of the *T. aestivum*/*Ae. sharonensis* introgressive lines of common wheat for resistance to powdery mildew // Cytology and Genetics. – 2005. – Vol. 39. – P. 21–30.

TERNOVSKA T.K., ANTONYUK M.Z., MARTYNENKO V.S.

National University of Kyiv-Mohyla Academy, MONMS Ukraine
Ukraine, 04070, Kyiv, G. Skovorody str., 2, e-mail: tern@ukma.kiev.ua

AWN PROMOTER GENES IN GENOMES OF TRITICINAE

Aims. Identification of *Triticinae* group of homoeologous chromosomes in which awn promoter is localized in *Aegilops* species. Determination of genetic control of awns development in wheat-goatgrass introgressive lines. **Methods.** Visual assessment, study of chromosome configurations at meiosis M1 in PMCs, protein electrophoresis in PAGE, PCR with primers to chromosome-specific SSR loci, statistical methods. **Results.** Association between electrophoretic spectra components controlled by 6 group chromosomes and awn development gradations has been determined. Awn promoter *awn^P* has been localized in the homoeologous chromosomes group 6 in goatgrass. Hybridological analysis has shown semi-epistatic nature of *B1* gene as to *awn^P* and *b_n* genes. Awne lines have deletion or mutation of *B1* gene. **Conclusions.** Gene-promoter *awn^P* is localized in S^{sh}, S, U chromosomes of tree *Aegilops* species, and this gene hypostatic to dominant inhibitor of awn development *B1*. Gene *b_n* in 6D chromosome is also hypostatic to *B1* gene.

Key words: Awn development, SSR-loci, *Triticinae*, goatgrass.

ХАРЧЕНКО О.О.¹, СЕРГА С.В.², ПРОЦЕНКО О.В.², ТРЕТЯК О.П.¹, КОЗЕРЕЦЬКА І.А.²

¹Чернігівський національний педагогічний університет імені Т.Г.Шевченка

Україна, 14013, Чернігів, вул. Гетьмана Полуботка, 53, e-mail: oks6378@yandex.ru

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

Україна, 01601, м. Київ, вул. Володимирська 64

МУТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ *DROSOPHILA MELANOGASTER* З РІЗНИХ ЗА РАДІАЦІЙНИМ ЗАБРУДНЕННЯМ ТЕРИТОРІЙ

Іонізуюча радіація у вигляді природного радіаційного фону Землі є одним із найбільш суттєвих екологічних факторів у процесах адаптації, видоутворення і еволюції живого світу в цілому. Однак із середини минулого століття характер впливу іонізуючої радіації на ці процеси різко змінився, що обумовилось глобальним забрудненням навколишнього середовища внаслідок радіаційних аварій і випробуванні ядерної зброї, збільшенням кількості об'єктів ядерної енергетики і воєнно-промислового комплексу, а також використання джерел РІР в медицині [1].

Так в результаті аварії на Чорнобильській атомній електростанції відбулося значне підвищення радіаційного фону довкілля, живі організми постійно знаходяться під дією хронічного опромінювання в малих дозах [7].

Встановлено [4], що в природних популяціях тварин і рослин, які знаходяться під впливом малих доз опромінення, спостерігаються зміни показників адаптивності особин до умов зовнішнього середовища (плодовитості, житте-

здатності потомства) та мутаційні зміни (домінантних і рецесивних мутацій). Однак, в природних популяціях на динаміку вказаних показників можуть здійснювати вплив і інші фактори навколишнього середовища, що в свою чергу, забезпечує модифікацію ефекту малих доз опромінювання.

Хронічне опромінення в малих дозах радіації призводить до збільшення генетичної мінливості популяцій [6], що складається з двох компонентів: 1) накопичення і підтримання в популяції генетичної мінливості (генетичний поліморфізм) 2) мутації, які виникають de novo в репродуктивному поколінні, чи власне мутаційний процес, який визначає спектр мутацій і швидкість мутування, створює і збагачує генетичний поліморфізм. Зокрема, було зафіксовано хвилеподібний характер темпів природного мутагенезу [3].

Дослідження генетичних процесів в природних популяціях *Drosophila melanogaster*, які розвиваються на радіоактивно забруднених територіях, є важливими для розуміння механізмів

генетичних процесів у природі, та як елемент загального моніторингу стану навколишнього.

Метою даного дослідження було дослідити мутаційні процеси в природних популяціях

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували випадкові вибірки із природних популяцій плодової мушки *D. melanogaster* (Diptera, Drosophilidae), що є видом космополітом і класичним модельним об'єктом. Відлов мух проводився в різних населених пунктах України, що мають неоднаковий рівень радіоактивного забруднення, а саме: Варва – 7 мкР/год, Мотовилівка – 8 мкР/год, Київ – 13 мкР/год, Одеса – 13 мкР/год, Дрогобич – 14 мкР/год, Лубни – 15 мкР/год, Харків – 16 мкР/год, Умань – 16 мкР/год. У Чорнобилі відлов проводили в двох різних місцях: місто Чорнобиль – 350 мкР/год та біля водойми –

Результати та обговорення

У різних регіонах України були зібрані вибірки, розмір яких відповідав щільності популяцій *D. melanogaster* в цих місцях. За результатами аналізу видимих фенотипових змін встановлено, що в усіх досліджуваних природних популяціях *D. melanogaster* спостерігались фенотипові порушення.

Проведеними дослідженнями було встановлено, що частота появи фенотипових порушень у *D. melanogaster* в 2012 році в більшості популяцій була вище 0,01%. Такі показники свідчать про те, що в період дослідження природні популяції знаходились у стані «мутаційного спалаху» (рис. 1).

У дрозофіл досліджуваних природних популяцій спостерігались переважно порушення розвитку другої поперечної жилки крила (С2), крім того були відмічені особини з вирізками на крилах, порушенням склеротизації черевця, зміною забарвлення очей.

У досліджених природних популяцій *D. melanogaster* частота порушення С2 в середньому становила 0,52%, сягаючи максимального значення 2,3% для популяції, що була зібрана біля водойми охолоджувача на ЧАЕС. Також було виявлено, що у самців частота появи мутації С2 в середньому становила 0,31 %, тоді, як у самок у 0,79 %, сягаючи максимального значення 4,7 % для популяції водойми охолоджувача ЧАЕС.

В ході статистичного опрацювання був встановлений кореляційний зв'язок між рівнем радіоактивного забруднення території та мутацій у природних популяціях *D. melanogaster*

D. melanogaster, які мешкають на територіях з різним рівнем радіоактивного забруднення. середовища..

охолоджувача ЧАЕС – 2100 мкР/год.

Всі зібрані в природі імаго аналізували під бінокулярним мікроскопом для ідентифікації фенотипових відхилень від ознак дикого типу. Особини з вказаними ознаками перевірялися на предмет успадковування порушень, якими вони характеризувалися.

В лабораторних умовах мух розводили на стандартному середовищі. Статистична обробка результатів проводилась за загальними стандартами з використанням програми “Excel” з пакету “Microsoft Office – 2003” та програм Statistika 6.0.

($r=0,7$; $p \leq 0,05$).

Аналіз впливу рівня радіоактивного забруднення на самців природних популяцій *D. melanogaster* показав, що поява мутацій у них тісно пов'язана з рівнем радіоактивного забруднення ($r=0,85$; $p \leq 0,01$). У самок значення цього показника статистично невірогідне.

Для оцінки сили і форми зв'язку між фенотиповими порушеннями у самців і дією радіації був проведений регресійний аналіз (рис. 2). Встановлена пряма, лінійна залежність, яка описується таким функціональним рівнянням: $y = 0,0061 + 0,0000179 \cdot x$, коефіцієнт детермінації $R^2 = 0,735$ (мал.2). Отже, результат впливу чинника (рівня радіоактивного забруднення) – 73,5 % варіації відносної частоти мутацій, що вказує на досить сильний зв'язок [5]

Отримані дані підтверджують тезу про те, що за статевої диференціації самці в еволюції популяції виражають тенденції мінливості [2]. Наділені меншими опірними можливостями ніж самки, вони, як правило, є першими жертвами несприятливих умов середовища. Зменшення чисельності самців мало впливає на гомеостаз популяції, проте сприяє змінам в потрібному напрямку, оскільки рідкі варіанти самців за панміксії мають більше шансів залишити адаптоване потомство.

Очевидно, що більша чутливість самців *D. melanogaster* до впливу радіації є проявом загальних тенденцій розвитку популяцій, коли одна стать (самки) забезпечує її генетичну стабільність, а інша (самці) – мінливість генетичного апарату

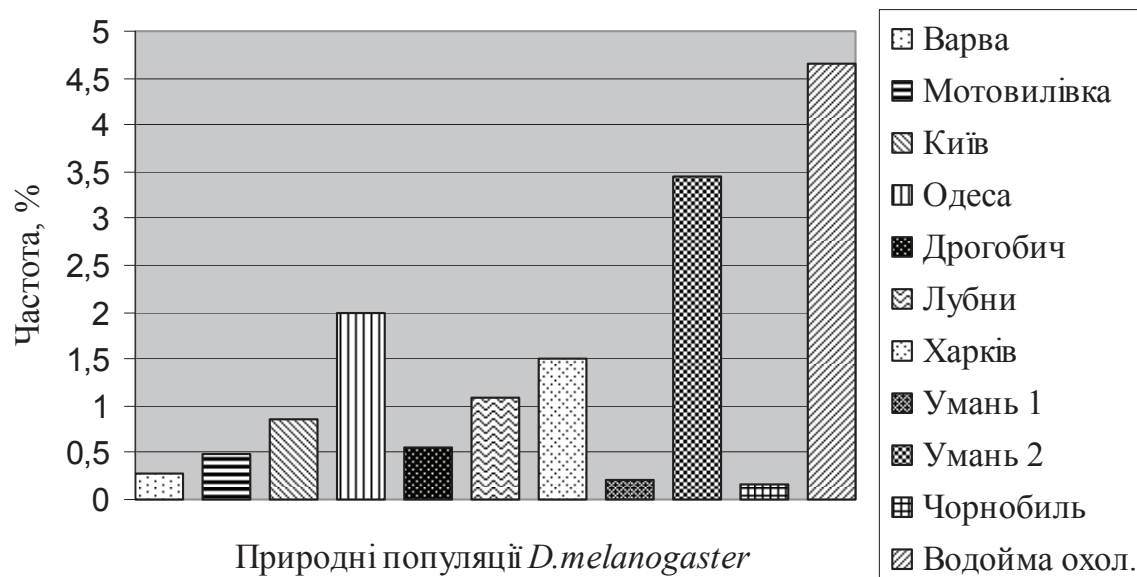


Рис. 1. Частота фенотипових порушень в природних популяціях *D. melanogaster*

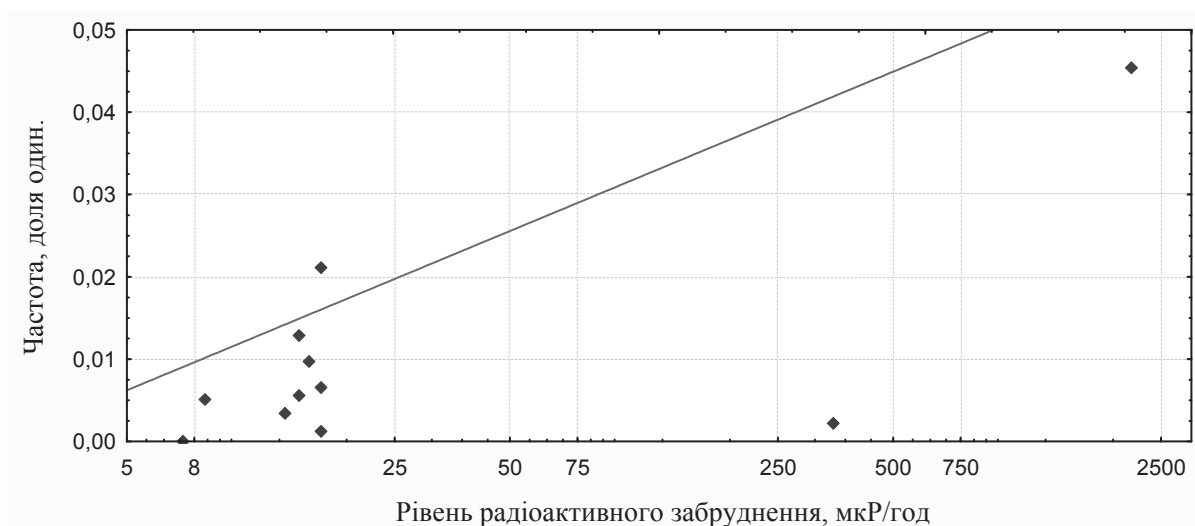


Рис. 2. Лінія регресії залежності появи мутаційних змін у самців *D. melanogaster* і рівня радіоактивного забруднення

Висновки

1. Встановлено, що в період дослідження більшість природних популяцій знаходились у стані «мутаційного спалаху».

2. Продемонстровано наявність кореляційного зв'язку між рівнем радіоактивного забруднення та частотою фенотипових змін у природних популяціях *D. melanogaster* ($p \leq 0,05$).

3. У досліджених популяціях виявлено неоднаковий рівень впливу ступеня радіоактивного забруднення на частоту фенотипових змін у представників різних статей.

4. Встановлено, що поява фенотипових порушень у самців тісно пов'язана з рівнем радіаційного забруднення ($p \leq 0,01$).

Література

1. UNSCEAR 2001. United Nations. Hereditary effects of radiation. Report to the General Assembly, with Scientific Annex. N.Y.// United Nations. — 2001. — P. 5–160.
2. Геодакян В. А. Роль полов в передаче и преобразовании генетической информации. Пробл. передачи информации // Наука. — М., 1965. — Т. 1, №1. — С. 105–112.
3. Гершензон С.М. "Вспышки" мутаций некоторых генов в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // Генетика. — 1997. — Т. 33, №4. — С. 421–430.
4. Зайнуллин В.Г. Генетические эффекты хронического облучения в малых дозах ионизирующего облучения. — СПб.: Наука, 1998. — 100 с.
5. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк. — 1990. — 352 с.
6. Моссэ И.Б. Радиация и наследственность. — Мн.: Университетское, 1990. — 205 с.
7. Шевченко В.А. Интегральная оценка генетических последствий действия ионизирующих излучений // Радиан. биол. Радиоэкол. — 1997. — Т. 37, №4. — С. 569–576.

KHARCHENKO O.O.¹, SERGA S.V.², PROCENKO O.V.², TRET'YAK A.P.¹, KOZERETSKA I.A.²

¹*T.G. Shevchenko National Pedagogical University of Chernihiv*

Ukraine, 14013, Chernihiv, Getmana Polubotka str. 53, e-mail: oks6378@yandex.ru

²*ESC "Institute of Biology", National Taras Shevchenko University of Kyiv*

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyrska str, 64

MUTATION PROCESSES IN THE NATURAL POPULATION OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* FROM RADIATION CONTAMINATED TERRITORIES

Aims. Explore mutational processes in natural populations of *Drosophila melanogaster* that inhabit the territories with different levels of radioactive contamination. **Methods.** We analysed 11 wild populations for the presence of phenotypic changes and conducted statistical data processing. **Results.** We have demonstrated that all populations we had studied were in the state of a so called mutational outbreak. We have found males and females to react differently to the effects of radioactive contamination. **Conclusions.** The data indicates that *Drosophila* males are more sensitive to the effects of radioactive pollution.

Key words: *Drosophila melanogaster*, natural populations, mutations, radiation.

ХОХЛОВ А.М.

Слобожанский государственный аграрный университет

Украина, 62341, Харьковская обл., Дергачевский район, п/о Малая Даниловка, ул. Академическая 1., e-mail:zoovet@zoovet.kharkov.ua

МИКРОЭВОЛЮЦИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОМА СВИНЬИ В СЕЛЕКЦИИ

Применение в селекционном процессе генетических основ, базирующихся на основополагающих принципах популяционной генетики, иммуногенетики, биохимического полиморфизма и ДНК- технологий (маркер -зависимой се-

лекции) позволяет прогнозировать и моделировать селекционный процесс и оказывать определяющее влияние на процесс пороодообразования и его конечный результат [4].

Материалы и методы

При изучении микроэволюции свиней непосредственным объектом наших исследований был европейский дикий кабан (*Sus scrofa ferus*), а так же крупная белая порода свиней – как модель доместикиации и пороодообразовательного процесса в Европе. При этом провели следующие исследования: археологические (изучение скелетов диких и одомашненных животных),

морфологические (изучение строение черепа, костей, внутренних органов, мышц), иммуногенетические (определение групп крови, полиморфизма белков), биохимические (фракции белков, фагоцитоз, бактерицидность и лизоцимная активность сыворотки крови), цитогенетические (кариотипы домашних и диких свиней) и другие.

Результаты и обсуждение

В эволюции свиньи можно выделить три основных периода: «доисторический» или преддоместикационный, продолжительностью около 37 млн. лет, «неолитический» или «доместикационный» – 10-12 тыс. лет и «породообразовательный» – 350-400 лет [7].

Современная домашняя свинья *Sus domesticus* (тип Chordata, класс Mammalia, отряд Artiodactyla, семейство Suidae) является продуктом многовековой эволюции; в результате естественного отбора, а с неолитического периода в результате процесса доместикации прошла сложный путь генетических и морфологических изменений [2].

У домашних свиней в соматических клетках 38 хромосом (19 пар), а европейская дикая свинья имеет 36 хромосом, очевидно в процессе эволюции свиньи число генов изменялось, изменялись и сами гены.

Наши расчеты показывают, что этот вид (*Sus scrofa*) на первом этапе микроэволюции имел 12,3 млн. поколений, когда животные сохраняли полную свободу обитания в естественном биоценозе, практически не испытывая со стороны человека ни прямых, ни косвенных воздействий [7].

Второй этап «неолитический» – этап доместикации или период, собственно, одомашнивания животных. Биологическая скорость эволюции этого периода исчисляется около 4 тысяч поколений. Этот этап характеризуется тем, что животные получают свое определенное название *Sus scrofa domestica* (домашние животные), но самое главное происходят существенные морфофункциональные изменения в фенотипе свиней.

В период одомашнивания наряду с доминантными генами в селекционный процесс вовлекаются рецессивные гены, которые в природных популяциях находились в гетерозиготной форме. Скорость эволюции отдельного гена зависела от его фенотипического проявления, от его частоты в популяции и интенсивности отбора. Еще быстрее этот процесс происходит у домашних животных, которые вовлечены в миграцию племен и целых этносов, когда посредством гибридизации объединяются морфотипы домашних животных из разных географических зон.

Для изучения процесса доместикации использовали метод иммуногенетического анализа эритроцитарных антигенов, основанный на определении молекулярно-генетических маркеров у представителей современных пород, исходных

пород и далеких диких предковых форм. Такие маркеры надежно прослеживаются в виде антигенов, детерминируемых генетическими аллелями в генотипах разной молекулярно генетической сложности.

Изменение частот аллелей и генотипов возможно не только вследствие отбора, но и в результате мутаций, миграции особей, случайного дрейфа генов, изоляции, а так же избирательного или ассортативного, скрещивания.

Первые два из генетических факторов – мутационный процесс и дрейф генов – сортируют эту изменчивость и дают начало микроэволюции в популяции [1]. Таким образом, отбор не сможет действовать, если мутационный процесс не будет поставлять ему новые генетические варианты. У кабана значительную долю новых мутаций составляют рецессивные мутации, которые открылись в популяциях при доместикационных процессах, а гены дикого типа доминируют. Объективность этого вывода подтверждается нами при изучении геногеографии некоторых биохимических маркеров в популяциях диких и домашних свиней.

Миграции особей, или поток генов, представляют собой обмен генами между популяциями. Роль дрейфа генов в естественных популяциях до конца не выяснена. Однако признано, что в маленьких популяциях частоты аллелей в значительной степени регулируются дрейфом генов [1].

Кроме рецессивности, в природных популяциях дикого кабана существовали другие генетические механизмы, позволяющие нивелировать проявление вредных в данных условиях существования мутаций: эпистаз, плейотропия, влияние генов-модификторов, а также неполная пенетрантность.

В период неолита в Украине физико-географические, климатические и экологические условия способствовали распространению и выживанию дикого кабана (*Sus scrofa*), который служил объектом охоты, а впоследствии и объектом одомашнивания.

Необходимо отметить, что на этом этапе доместикации животные в какой-то мере связаны с естественным биоценозом. Но и эта связь до крайности определена человеком. В благоприятные сезоны года кабан контактирует с экосистемой предопределенной эволюцией. В основном, одомашненные животные содержатся в помещениях и загонах. Увеличение продуктивности животных регулируется изменением состава рациона, для более успешной domesti-

кации животных ведется отбор, скрещивание животных.

Главными достижениями этого периода одомашнивания свиней – это преодоление сезонности размножения, высокая скороспелость, многоплодие и направленное развитие мясозировой ткани. Можно предположить, что филогенез свиньи шел таким путем: дикий европейский кабан (*Sus scrofa ferus*) – приручение – примитивная домашняя свинья – аборигенная, хорошо приспособленная до местных условий; достаточно продуктивная свинья – порода крупных размеров сального типа – узкоспециализированные породы (*Sus scrofa domestica*).

На этом этапе доместикизации изначально важную роль играл дестабилизирующий отбор. Между геном, который изменяется, и фенотипом, который оценивается отбором, находятся процессы развития с их регуляторными взаимодействиями. Если популяция подвергается давлению дестабилизирующего отбора по признакам, затрагивающим нейроэндокринные механизмы онтогенеза, то происходит разрушение систем стабилизации развития, сформированных в ходе предшествующей микроэволюции, и выявление скрытого запаса наследственной изменчивости.

Породообразование – это прежде всего микроэволюция, главнейшими составляющими которой являются гибридизация и отбор. Именно эти процессы и в природных, и в породных популяциях ведут к обогащению генофонда и активации генома за счет гетерозиготности, гетерозиса по биологическим и продуктивным признакам. Систематический, направленный к достижению определенной цели отбор и подбор (при соответствующих условиях кормления и содержания) постепенно через ряд поколений

привели к накоплению ценных свойств у групп животных, по которым они стали различаться между собой [7].

Мониторинг этих процессов можно постоянно осуществлять посредством молекулярно-генетического анализа динамики частоты антигенов групп крови, сывороточных белков, расшифровки ДНК или секвенирования генома свиньи определенных пород. Породообразовательный процесс происходит на протяжении 350-400 лет, можно предположить, что биологическая скорость микроэволюции, в процессе породообразования имеет протяженность 140-160 поколений.

В разных странах мира в результате микроэволюции политипического вида *Sus scrofa* в настоящее время образовалось большое число подвидовых популяций свиней *Sus scrofa domestica*, которых насчитывается в зависимости от используемых классификаций от 201 до 400 пород. Имеются данные, что на территории современного Китая за многовековую историю созданы и сейчас разводятся около 100 консолидированных пород, в Великобритании – 60, в Украине – 15. Большинство из этих пород и породных групп достаточно четко различаются по морфофизиологическим признакам: масти, форме головы, постановке ушей, телосложению, половой и мясной скороспелости, соотношению мяса и сала в туше при убое в разном возрасте, многоплодию и другим свойствам, связанным с экстерьером и интерьером, определяющие генетическую приспособленность к эколого-географическим условиям существования и хозяйственному использованию [7].

За прогнозами ученых биологический потенциал продуктивности свиней должен быть таким (табл. 1).

Таблица 1. Биологический лимит продуктивности свиней

Признаки	Биологический потенциал
Количество зрелых яйцеклеток, штук	35
Количество новорожденных поросят, голов	20-25
Живая масса поросят при рождении, кг	1,5-2,0
Количество выращенных поросят на опорос, голов	20
Живая масса поросят у 2 мес. возрасте, кг	25-28
Среднесуточный прирост на откорме, г	1400-1450
Возраст молодняка при достижении 100 кг, дней	107-110
Затраты корма, кг (стандарт. комбикорма)	2,0-2,2
Площадь «мышечного глазка», см ²	46-48,4

В 2013 году исполняется 162 года, когда селекционерами Великобритании была создана крупная белая порода свиней, которая произош-

ла от дикого европейского кабана (*Sus scrofa ferus*) и её можно рассматривать как модель доместикизации и породообразовательного процесса.

Доля свиней крупной белой породы в племенном поголовье в России – 90 %, Украине - 84%, в Канаде – 65 %, в Англии – 55 %, в Швеции – 25 % и в США – 18 %.

Среди древних базовых пород развития мирового свиноводства можно назвать высокопродуктивные специализированные породы: беркшир, крупная белая, крупная черная, ландрас, дюрок, гемпшир, пьетрен и др.

На пути реализации биологического потенциала продуктивности свиней, например, в США при оценке хряков породы ландрас, дюрок, йоркширской и гемпширской было получено у потомства среднесуточный прирост 997-1064 г, толщина шпига на спине 17,2-19,0 мм, возраст достижения живой массы 104 кг (стандарт страны) – 145-154 дня и площадь «мышечного глазка» 32,9-37,4 см².

Выделяют пять основных положений, которые определяют эффективность селекции: генетическую обусловленность изменчивости признака, точность оценки наследственных качеств, то есть генотипа; отбор; подбор, частоту смены поколений. Для быстрого повышения генетического потенциала отечественных пород свиней по мяسو – откормочным качествам и получения конкурентоспособной свинины необходимо применять совместно с методами класси-

ческой селекции маркерную, учитывающую полиморфизм генов – маркеров продуктивных качеств. В этой связи возникла научная и практическая потребность в разработке и широком применении методов ДНК–технологий в селекции в комплексе с классическими методами [3-5, 8, 9]. Так, односторонняя селекция на увеличение мясности и одновременное снижение содержания жира в туше свиней привела к значительному ухудшению качества мяса. Свиньи чувствительны к синдрому стресса (PSS), часто имеют бледное, мягкое, экссудативное мясо (PSE) или темное, жесткое, сухое мясо (DFD) и синдром злокачественной гипертермии (MHS). Установлено, что доминирующей причиной проявления пороков мяса является генетический дефект, связанный с рецептором рианодина RYRJ. Выявление мутаций в гене RYRJ позволяет исключить из популяции свиней «генетический груз» уже на ранних стадиях селекционного процесса. В этих целях необходим мониторинг как отдельных животных, так и популяции свиней по генетическим маркерам. Используя метод ДНК-технологий исследователями выявлен полиморфизм по генетическим маркерам, которые могут быть использованы при селекции животных (табл. 2).

Таблица 2. Генетические маркеры используемые в свиноводстве

Признаки	Генетические маркеры
Стрессоустойчивость	RYRJ, HAL
Цвет кожи (домин. белый AA)	c KIT
Цвет кожи (красный/черный)	MCJR
Репродуктивные качества	ESR, PRLR, H450, FSHR
Откормочные качества	MC4R
Сохранность поросят	FUTJ
Мясные качества	MSTN, MYOD, LEP, LEPR, JGF2
Качество мяса	CYP2E1, CAST
Внутримышечный жир	HFABP, AFABP
Диарея	K88AB, ECRF18

Таким образом, для некоторых селекционируемых признаков определены сопутствующие гены: для репродуктивных показателей (локус рецептора эстрогена (ESR), пролактина (PRLR) и др.; откормочных (локус гена MC4R и др.), а также мясных качеств (локус миостатина MSTN, инсулиноподобного фактора роста JGF2) и другие. Влияние гена стрессоустойчивости у свиней RYRI, а также возможности определять происхождение животных с достоверностью до 99%, позволяют контролировать и управлять селекционным процессом как в племенных, так

и товарных стадах [3, 4, 6, 9].

Величайшим достижением XXI века можно считать изучение и расшифровку генома свиньи [9].

Геном – это хромосомный набор, совокупность генов, локализованных в одиночном наборе хромосом данного организма. В расшифровке генома домашней свиньи приняли участие ученые из одиннадцати стран мира, работающие в центрах исследования генома на протяжении 20 лет. Объектом исследований был хряк американской породы дюрок, у которого было рас-

шифровано 98 % генома. Руководители исследованиями профессор Лоуренс Счук и Джон Бивер из Иллинойского университета (США). На протяжении 20 лет вся информация собиралась в Британском институте Сенгера. Стоимость работы 24,5 млн. долларов.

Как и геном других млекопитающих, в том числе человека и коровы, геном свиньи состоит приблизительно из трех миллиардов основных пар

(А-Т, Т-А). Эти три миллиарда пар разделены на 19 различных хромосом свиньи, и содержат информацию примерно 20000 различных генов. Эти гены присутствуют в каждом организме и, хотя они примерно на 99,9 процентов идентичны, для каждой особи существует небольшое изменение в 0,1 процента, определяющее некоторую генетическую особенность многочисленных пород или индивидуальные варианты в пределах породы. Эти особенности лежат

Выводы

1. Секвенирование (расшифровка) генома свиньи позволяет не только установить карту генов видового генома животных, но и определить в генотипе отдельных особей молекулярно-генетические маркеры, позволяющие в селекционном процессе контролировать проявление важнейших хозяйственно-полезных и биологических признаков: воспроизводство, качество мяса, стрессоустойчивость, показатели естественного иммунитета и другие физиологические и генетические изменения в организме животных.

2. Расшифровка генома свиньи создает возможности по-новому оценить микроэволюционные процессы в популяциях, в том числе

в основе геномных фенотипических различий, в том числе и в предрасположенности к определенным заболеваниям.

Изучение генетических возможностей пород свиней привело к созданию ДНК-чипа, способного определять более чем 60000 молекулярно-генетических маркеров (SNP-однонуклеотидный полиморфизм, который используется в качестве молекулярно-генетических маркеров) [3].

В настоящее время число выявленных геномных маркеров продолжает увеличиваться, они выделены у всех основных видов скота (свиньи, овцы, коровы). Эти генетические инструменты и сама геномная информация представляют высочайшие возможности при изучении вида, пород, линий, семейств и дальнейшего понимания эволюционных и селекционных процессов.

объективно оценить процессы доместикиции или одомашнивания животных, более глубоко с генетической точки зрения подойти к селекционному процессу создания новых линий, типов и пород с получением у потомства высокой продуктивности или эффекта гетерозиса.

3. Изучение генома свиньи позволило выявить генетические и фенотипические различия между породами свиней, установить генетическую предрасположенность к наследственным заболеваниям, разработать систему профилактических мер, предупреждающих появление генетических заболеваний, сохранить редкие и исчезающие популяции домашних и диких свиней.

Литература

1. Алтухов Ю.П. Генетические процессы в популяциях: научное издательство. – М.: Наука, 1989. – 328 с.
2. Банников А.Г., Флинт В.Е. Отряд парнокопытных // Жизнь животных. – Т. 7., М.: Просвещение, 1989. – С. 426-434.
3. Епишко Т.И., Дойлидов В.А. и др. Достижения и перспективы использования ДНК-технологий в свиноводстве: Монография – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 260 с.
4. Лобан Н.А., Шейко И.П. Способ маркерной селекции для повышения мясо - откормочных качеств свиней на основе скрининга гена JGF-2. // Проблемы зооинженерії та ветеринарної медицини. – Вип.21.Частина 1. – Харків, 2010. – С.179-185.
5. Машуров А.М. Генетические маркеры в селекции животных. – М.: Наука, 1980. – 318 с.
6. Трофименко О.Л., Гиль М.І. Генетика популяцій. – Миколаїв.: МДАУ, 2003. – С. 160-170.
7. Хохлов А.М. Генетичний моніторинг доместикації свиней. – Харків.: Еспада, 2004. – 126 с.
8. Шейко И.П., Епишко Т.И. ДНК – технологии в селекции сельскохозяйственных животных // Актуальные проблемы интенсификации производства продукции животноводства. – Жодино, 2005. – С. 79-81.
9. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the JGF2 locus in pigs (C. Nesper, L. Moreau, B. Brouwers [ect].) // Nat. Genet., 1999. – Vol. 21. – P. 155-156.

KHOKHLOV A.M.

*Slobozhanskiy State Agrarian University
Ukraine, 62341, Kharkov region., Dergachi district, p /Small Danilovka st. Academic one,
e-mail:zoovet@zoovet.kharkov.ua.*

MICROEVOLUTION AND PROSPECTS OF SWINE GENOME USE IN SELECTION

Purpose. The study and use in the selection process the genetic methods based on the achievements of immune genetics, biochemical polymorphism and DNA technologies that allow to model and predict the processes of hybridization and breed formation in swine breeding are the main tasks of the investigation.

Methods. The morphological, immunogenetic, cytogenetic, biochemical and archaeological methods of investigation have been used when studying microevolution of swine from Neolithic period to up-to-date breed formation process. **Results.** The biological rate of evolution at different stages of domestication of the *Sus* order, the sources of genetic mutation have been defined. **Conclusions.** The general characteristic of the swine genome creates the possibility to estimate microevolutional processes in the population of wild and domestic swines from another point of view, to focus more on the selection process of the creation of new lines, hybrids and breeds with high level of productivity.

Key words: swine, phenotype, gene, selection.

ЧИРКОВ С.Н., ИВАНОВ П.А., ШЕВЕЛЕВА А.А.

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова
Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, 1/12, e-mail: s-chirkov1@yandex.ru*

ОБНАРУЖЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ НОВОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПЫ СЛИВЫ (PLUM POX VIRUS)

Вирус оспы сливы (ВОС, *Plum pox virus*, род *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*) считается самым вредоносным вирусным патогеном косточковых культур. Вследствие большого экономического значения вызываемого им заболевания («шарки»), интенсивных молекулярно-биологических исследований и широкого использования в биотехнологических разработках, ВОС является одним из наиболее изученных вирусов растений [1].

Вирионы ВОС представляют собой нитевидные частицы длиной 750 нм и диаметром 15 нм, которые состоят из одной молекулы РНК положительной полярности длиной около 10 тыс. нуклеотидов и белка оболочки (БО) с мол. м. около 36 кДа. Геномная РНК бидистронна, содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области (NCR) длиной 146 и 217 нуклеотидов, вирусный белок, ковалентно связанный с 5'-концом молекулы РНК, и поли-А-последовательность на 3'-конце. В зараженных клетках РНК транслируется с образованием полипротеина, который нарезается вирусспецифическими протеазами на 10 функционально активных белков. N-конец БО экспонирован на поверхности вирусной частицы и является самой вариабельной частью молекулы. В нем локализовано большинство вирус- и штаммспецифичных эпитопов. Антигенные раз-

личия N-конца молекулы БО и вариабельность последовательности гена БО послужили основой для выделения 5 штаммов ВОС: Dideron (D), Marcus (M), Cherry (C), El Amag (EA) и Winona (W). Секвенирование других генов вируса позволило идентифицировать еще 2 рекомбинантных штамма ВОС. У штамма Rec 3'-концевая часть генома происходит от штамма M, а остальная – от штамма D в результате рекомбинации между этими штаммами в гене репликазы (NIb). Штамм T (Turkish) является продуктом рекомбинации штамма M с ВОС неясного происхождения в области генов НсPro и Р3. Штаммы различаются по эпидемиологическим свойствам, географическому распространению и патогенности для различных видов косточковых культур. Штаммы D, M и Rec распространены повсеместно, остальные встречаются сравнительно редко и/или являются эндемичными для определенных регионов [2 – 3].

ВОС способен заражать многие, если не все, растения косточковых культур, относящиеся к роду *Prunus* [4, 5]. Вишня (*Prunus cerasus*) и черешня (*P. avium*) считались устойчивыми к этому вирусу, пока в конце прошлого века ВОС не был обнаружен на вишне в Молдавии [6] и черешне в Италии [7]. С тех пор штамм PPV-C считали единственным, который может систем-

но заражать вишню. Другие штаммы ВОС на вишне и черешне до недавнего времени выявлены не были.

В 2012 году при мониторинге ВОС в декоративных насаждениях в г. Москве нами были обнаружены деревья вишни с симптомами кольцевой пятнистости на листьях, напоминающими симптомы ВОС. В соответствии с их локализацией, образцы были обозначены Кр8-1, Кр8-1U, Кр8-2U, Кр8-2D, Fl-1, Fl-2, Fl-3, Pul-1 и Pul-DS. Экстракты из листьев этих растений давали положительную реакцию в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа с поликлональными антителами, выполненным с помощью ELISA reagent set SRA 31505 (Agdia, США). В то же время, анализ этих экстрактов в Triple-antibody sandwich (TAS)-ELISA с помощью наборов K10B (Agritest, Италия), основанных на применении моноклональных антител 5B-IVIA к универсальному вирус-специфическому эпитопу ВОС [8], показал отсутствие реакции в анализируемых образцах. Анализ тех же экстрактов методом иммуноспецифической полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ИСОТ-ПЦР) с 2 парами универсальных праймеров, специфичных к 3'-NCR [9] и к 3'-терминальному участку гена БО [10], показал образование продуктов ПЦР ожидаемой длины 220 и 243 пн, соответственно, что подтверждало зараженность этих образцов ВОС.

Штамм выявленных изолятов определяли методом ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к известным штаммам ВОС [11 – 14]. Ни с одним из образцов не было обнаружено положительной реакции, в том числе и с праймерами к штамму PPV-C. Можно было предположить, что выявленные изоляты являются атипичными представителями штамма PPV-C или принадлежат к неизвестному штамму ВОС.

Секвенирование геномной РНК вируса или гена БО позволяет надежно идентифицировать штамм определенного изолята ВОС. Последовательности генов БО были амплифицированы методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к 3'-NCR и к 3'-концу гена N1b PPV-C, секвенированы в фирме Евrogen (г. Москва) и депонированы в базе данных GenBank (JX472432 – JX472440).

Установлено, что ген БО атипичных вишневых изолятов состоит из 996 нуклеотидов и кодирует белок, состоящий из 332 аминокислот. Сравнение последовательностей гена БО атипичных изолятов выявило их сходство внутри группы на 99,2 – 100%. Большинство из немногих нуклеотидных замен оказались молчащими.

В то же время, обнаружена высокая степень дивергенции атипичных изолятов от известных штаммов ВОС. Уровень сходства варьировал от 62,1% при сравнении со штаммом PPV-EA до 85,2% при сравнении со штаммом PPV-C.

Для определения таксономического положения этих изолятов было построено филогенетическое дерево, основанное на сравнении генов БО атипичных изолятов и ряда изолятов, принадлежащих к другим штаммам вируса. Их нуклеотидные последовательности были взяты из базы данных GenBank. Для построения дерева использовали алгоритм Neighbor-Joining, встроенный в программу MEGA5 [15], с бутстрэп-анализом из 1000 случайных выборок. Результаты анализа (Рис. 1) показали, что выявленные нами изоляты («atypical isolates») группируются отдельно от всех известных штаммов, что указывает на их принадлежность к неизвестному ранее штамму ВОС, и объясняет отрицательный результат ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к известным штаммам. Очевидно, что атипичные изоляты и представители штамма PPV-C дивергировали от общего предка и представляют собой две независимые эволюционные линии.

Во время выполнения нашей работы появилось сообщение Glasa et al. [16] об обнаружении необычных изолятов ВОС на вишне в Самарской и Саратовской областях РФ. Анализ последовательностей их геномов показал, что они только на 70 – 80% идентичны изолятам, принадлежащим к известным штаммам ВОС. Эту группу изолятов было предложено выделить в отдельный штамм PPV-CR (Cherry Russian).

Были разработаны праймеры для специфического определения изолятов, относящихся к новому штамму. При их использовании для идентификации обнаруженных нами вишневых изолятов образовывался продукт ПЦР ожидаемого размера 427 пн во всех 9 образцах. Результаты ОТ-ПЦР показывали, что атипичные вишневые изоляты являются представителям нового штамма PPV-CR.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей N-конца БО атипичных изолятов и 3 изолятов, обнаруженных Glasa et al. [16] (Ru-17sc, RU-18sc и Ru-30sc) представлено на рис. 2. Это сравнение показывает, что изоляты, найденные в Москве, на 96,6 – 98,3% идентичны изолятам, обнаруженным в Самарской и Саратовской областях, что является еще одним доказательством принадлежности всех их к штамму PPV-CR и указывает на высокую генетическую стабильность нового штамма.

В универсальном эпитопе всех изолятов, принадлежащих к штамму PPV-CR, аспаргиновая кислота (D) в позиции 96 заменена на глутаминовую кислоту (E) (Рис. 2). Эта замена может негативно сказываться на взаимодействии моно-

клональных антител 5B-IVIA с универсальным эпитопом [8] и объяснять отрицательные реакции при определении этих изолятов в TAS-ELISA.

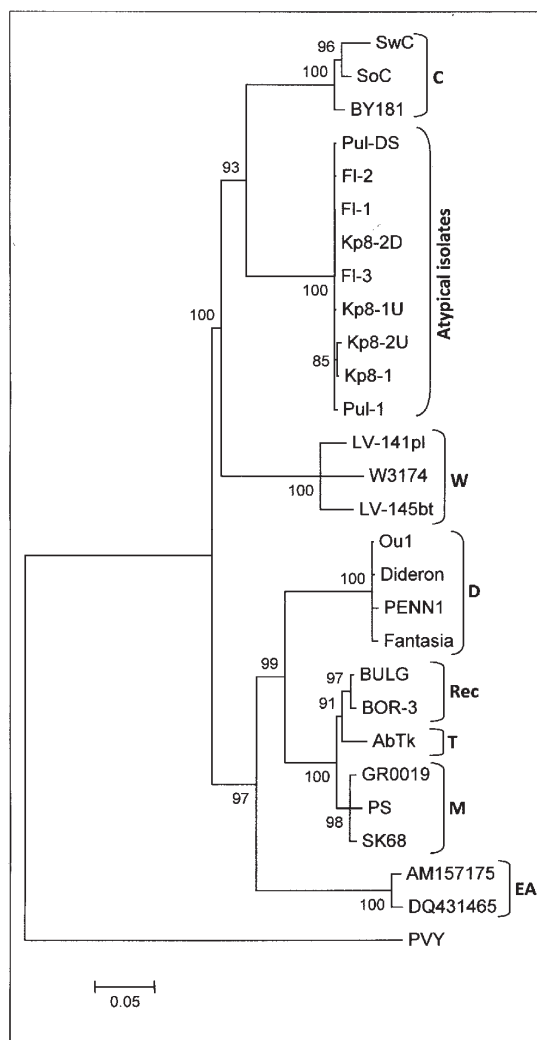


Рис. 1. Филогенетический анализ 9 атипичных вишневых изолятов и репрезентативных изолятов ВОС, представляющих известные штаммы вируса, на основе сравнения генов БО. Значения бутстрэп-анализа (только выше 70%) указаны на ветвях дерева. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид. Номера последовательностей, извлеченных из GenBank: EU734794 (AbTk), GU461889 (BULG), AY028309 (BOR-3), FM955843 (GR0019), AJ243957 (PS), M92280 (SK68), AY184478 (SoC), Y09851 (SwC), HQ840518 (BY181), AY912055 (W3174), HQ670746 (LV-141pl), HQ670748 (LV-145bt), AY912056 (Fantasia), AF401295 (PENN-1), X16415 (Dideron). Для изолятов штамма PPV-EA номера показаны на ветвях дерева. Последовательность гена БО потивируса Y картофеля (PVY) использована в качестве филогенетической аутгруппы (X12456)

Таким образом, в растениях вишни обнаружены изоляты ВОС, относящиеся к новому штамму PPV-CR. Места находок этих изолятов отстоят один от другого на сотни километров, что может свидетельствовать о широком распространении нового штамма на территории Европейской России. Полученные результаты впервые показывают, что вишня может зара-

жаться не только PPV-C, но и другими штаммами ВОС. В заключение следует отметить, что предпринятые в последние годы исследования генетического разнообразия ВОС на постсоветском пространстве привели к открытию многих уникальных изолятов [13, 14, 17–19], что существенно расширяет и изменяет представления о биологическом разнообразии этого вируса.

1 10 20 30 40 50 60

Fl-1 ANEGGDDDDVTLVDAGKSTVTTAATTPITTSACLPPPVPQLRSTTPMFEPITPATTQPT

Fl-2

Fl-3

Kp8-1

Kp8-1U

Kp8-2D

Kp8-2U I.....A.....

Pul-DS

Pul-1

RU-17sc ..N.....S.....

RU-18sc ..N.....

RU-30sc ..NN.....

* * * ..*****.*****.*****.*****

70 80 90 100 110

Fl-1 IKPVTSPMTSPFSYGVIGNQNVAPSSSNALANTRKERDVDAGTVGTFSVPRKAMTSKL

Fl-2

Fl-3

Kp8-1

Kp8-1U

Kp8-2D

Kp8-2U

Pul-DS

Pul-1

RU-17sc .Q.....

RU-18scT.....

RU-30scP.....

* * * * ..*****.*****.*****.*****

Рис. 2. Множественное выравнивание N-терминальных аминокислотных последовательностей БО атипичных вишневых изолятов, обнаруженных в Москве, в Саратовской и Самарской областях. Выравнивание начинается с первой аминокислоты БО. Последовательность универсального эпитопа затенена

Литература

1. Scholthof K.-B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology // Mol. Plant Pathol. – 2011. – Vol. 12. – P. 938–954.
2. Garcia J.A., Cambra M. Plum pox virus and sharka disease // Plant Viruses. – 2007. – Vol. 1. – P. 69–79.
3. Sochor J., Babula P., Adam V., Krska B., Kizek R. Sharka: The Past, the Present and the Future // Viruses. – 2012. – Vol. 4. – P. 2853–2901.
4. James D., Thompson D. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild *Prunus* species // EPPO Bull. – 2006. – Vol. 36. – P. 222–224.
5. Llácer G., Cambra M. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species // EPPO Bull. – 2006. – Vol. 36. – P. 219–221.
6. Kalashyan Y.A., Bilkey N.D., Verderevskaya T.D., Rubina E.V. Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldavia // EPPO Bull. – 1994. – Vol. 24. – P. 645–650.
7. Crescenzi A., Nuzzaci M., Levy L., Piazzolla P., Hadidi A. Plum pox virus (PPV) in sweet cherry // Acta Hort. – 1995. – Vol. 386. – P. 219–225.
8. Candresse T., Saenz P., Garcia J. A., Boscia D., Navratil M., Gorrís M.T., Cambra M. Analysis of the epitope structure of *Plum pox virus* coat protein // Phytopathology. – 2011. – Vol. 101. – P. 611–619.
9. Levy L., Hadidi A. A. Simple and rapid method for processing tissue infected with Plum pox potyvirus for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays // EPPO Bull. – 1994. – Vol. 24. – P. 595–604.
10. Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox virus* // EPPO Bull. – 2004. – Vol. 34. – P. 247–256.
11. Nemchinov L., Hadidi A. Specific oligonucleotide primers for the direct detection of plum pox potyvirus-cherry subgroup // J. Virol. Meth. – 1998. – Vol. 70. – P. 231–234.

12. Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asensio M. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA // *J. Virol. Meth.* – 1997. – Vol. 68. – P. 127–137.
13. James D., Varga A. Preliminary molecular characterization of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain // *Acta Hort.* – 2004. – Vol. 657. – P. 177–182.
14. Glasa M., Malinowski T., Predajna L., Pupola N., Dekena D., Michalczyk L., Candresse T. Sequence Variability, Recombination Analysis and Specific Detection of the W Strain of Plum pox virus // *Phytopathology.* – 2011. – Vol. 101. – P. 980–985.
15. 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 // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.
16. Glasa M., Prichodko Y., Zhivaeva T., Schneider Y., Predajna L., Subr Z., Candresse T. Complete and partial genome sequences of the unusual *Plum pox virus* (PPV) isolates from sour cherry in Russia suggest their classification to a new PPV strain. Book of Abstracts of 22th International Conference on Virus and Other Transmissible Disease of Fruit Crops. June 3–8, 2012. Rome, Italy. – 2012. – P. 37.
17. Чирков С.Н., Бызова Н.А., Шевелева А.А., Митрофанова И.В., Приходько Ю.Н., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Испытания отечественных иммуно хроматографических тест-полосок для экспресс-диагностики вируса шарки сливы // *Сельскохозяйств. Биол.* – 2012. – №1. – С. 110–116.
18. Sheveleva A., Ivanov P., Prihodko Y., James D., Chirkov S. Occurrence and genetic diversity of Winona-like Plum pox virus isolates in Russia // *Plant Dis.* – 2012. – Vol. 96. – P. 1135–1142.
19. Приходько Ю.Н., Мазурин Е.С., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Соколова Е.Е. Изучение штаммов вируса шарки слив в Российской Федерации // *Защита и карантин растений.* – 2011. – №11. – С. 29–32.

CHIRKOV S.N., IVANOV P.A., SHEVELEVA A.A.

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University
Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory 1/12, e-mail: s-chirkov1@yandex.ru*

DISCOVERY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A NOVEL PLUM POX VIRUS STRAIN

Aim. Atypical isolates of Plum pox virus (PPV) discovered in naturally infected sour cherry in urban ornamental plantings in Moscow, Russia have been studied. **Methods.** The isolates were detected by polyclonal double antibody sandwich ELISA and RT-PCR using universal primers specific to 3'-non-coding and to coat protein (CP) genome regions but failed to be recognized by triple antibody sandwich ELISA with the universal monoclonal antibody 5B and by RT-PCR using primers specific to the conventional PPV strains. **Results.** The CP gene sequence analysis of 9 isolates revealed the 99.2 – 100% of within-group identity and 62 - 85% identity with the conventional PPV strains. **Conclusion.** Phylogenetic analysis and alignment of the N-terminal CP aa sequences showed that the atypical isolates represent a group distinct from the known PPV strains and belong to a new tentative PPV strain CR.

Key words: *Plum pox virus*, sour cherry, phylogenetic analysis, PPV strain CR.

ШПИЛЬЧИН В.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

*Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України
Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net*

ЗАСТОСУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЙ IRAP ТА РАМАР ДЛЯ ПОШУКУ ПОЛІМОРФІЗМУ СЕРЕД АМФІДИПЛОЇДІВ, НЕСТАБІЛЬНИХ ЗА ОЗНАКОЮ ВОСКОВА ОСУГА

Штучний гексаплоїд Авротика має геном ААВВТТ, де частина ААВВ від м'якої пшениці, ТТ — геном диплоїдного егілопса *Aegilops mutica*. Амфідиплоїд Міоза (ААВВМ^tМ^t) об'єднує геноми твердої пшениці *Mutiko italicum* (ААВВ) та диплоїда *Ae. comosa* (М^tМ^t). Ініціальні амфідиплоїди не мали воскової осуги на листках та колосі, тобто були зеленими. За

кілька генерацій серед зелених рослин стали з'являтися рослини з восковою осугою, блакитні, які не відрізнялись від зеленої форми за жодною з інших ознак морфології рослини [1]. Блакитні форми амфідиплоїдів є константними, зелені у кожній генерації вищеплюють блакитні рослини. Можливість перезапилення та розщеплення гетерозигот повністю відкидається. Ре-

зультати попереднього гібридологічного аналізу показали, що успадкування ознаки, що досліджується, відбувається з відхиленням від співвідношень, очікуваних від розкриття біному $(3 : 1)^n$, на користь рослин з восковою осугою [2]. Останнім часом в літературі надається все більше уваги процесам, які відбуваються в природних та штучно створених амфідиплоїдах під час формування їхнього геному [4, 5]. Схоже, що у геномах Авротики та Міози, які мають гібридне походження, відбувається якийсь процес, наслідком чого є зміна домінантного алелю одного з кількох ідентифікованих на сьогодні генів, які спричиняють відсутність осуги на рослинах, на рецесивний з частотою, яка набагато перевищує відомі нам середні частоти спонтанного виникнення мутації на ген на покоління. Цей процес може відбуватися у межах так званого «геномного стресу». Одним із факторів такого процесу є активність мобільних генетичних елементів. Показано, що ретротранспозони присутні у більшості рослинних геномах і займають до 80% його розміру [5]. Дослідити їхню роль можливо за допомогою технології, що у якості

Матеріали і методи

Геномну ДНК геномно-заміщених амфідиплоїдів Авротики 1, Авротики 2, геномно-доданих амфідиплоїдів Міоза, які є контрастні за восковою осугою, а також сорту Аврора, ампліфікували з праймерами до довгих термінальних повторів ретротранспозонів.

Виділення ДНК з листя та етиольованих паростків досліджуваних рослин поводити за модифікованою методикою із СТАВ-буфером. Реакційна ПЛР-суміш об'ємом 25 мкл містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезоксинуклеотидтрифосфату, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1 у Таq-полімерази (Fermentas, Лит-

Результати та обговорення

Гексаплоїди Авротики та Міоза є самозапилювачами, тому мають характеризуватися гомозиготністю за всіма генетичними системами, що цікаві для вивчення. Блакитні варіанти Авротики та Міози є стабільними, реверсії до зелених аналогів не спостерігали жодного разу, тому цілком можливим є припущення про наявність різниці між різними зразками на генетичному рівні, в тому числі на рівні внутрішньохромосомних змін, які спричиняються рухом ретротранспозонів. Щоб перевірити таке припущення, ми скринували геноми амфідиплоїдів з різним виразом ознаки, використовуючи системи IRAP та REMAP. Гіпотеза була така: якщо варіювання

праймерів для ампліфікації застосовує фрагменти з довгих термінальних повторів ретроелементів. Для нашої роботи ми обрали дві системи: IRAP та REMAP [6]. Метод IRAP (Inter-Retrotransposon Amplification Polymorphism) виявляє поліморфізм, спричинений вставкою мобільного елемента, завдяки ампліфікації фрагменту ДНК між двома сусідніми ретротранспозонами. У даному випадку використовується один або два праймери до одного або двох типів довгих термінальних повторів ретроелемента. Метод REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplification Polymorphism) є подібним до IRAP, з тією різницею, що у ролі одного з праймерів використовується, такий, що є специфічним до певного SSR локусу. Зазначені методи дають можливість виявляти значні зміни у структурі геному штучно створених амфідиплоїдів, мінливих за ознакою інтересу. У статті викладено результати дослідження поліморфізму за ретротранспозонними системами між гексаплоїдами Авротики та Міози з восковою осугою та без неї.

ва) у буфері виробника. Умови проходження ампліфікації (35 циклів, ампліфікатор Applied Biosystem 2700): початкова денатурація – 94°C, 4 хв; денатурація – 94°C, 45 сек; гібридизація – 55°C – 61°C (в залежності від праймера), 59 сек; елонгація – 72°C, 45 сек; кінцева елонгація – 72°C, 10 хв. Продукти ампліфікації у суміші 8 – 10 мкл ампліфікату з 1 мкл буфером нанесення (30% гліцерину, бромфеноловий синій, ксиленціанол) розділяли у 1,5%-ому агарозному гелі. Продукти візуалізували за допомогою етидіум броміду.

ознаки є наслідком перебудов у хромосомі, які змінюють відстань між ретротранспозонами (або ретротранспозоном та мікросателітом), розташованими біля гена, зміна експресії якого призводить до зміни у прояві ознаки, у електрофоретичному спектрі компонентів буде реєструватися різниця між контрастними фенотипами, і ця пара ретротранспозонів (або ретротранспозон-мікросателіт) може використовуватися для подальшого дослідження геному у зв'язку з варіюванням ознаки. Отже, якщо ампліфікація відбувається і її продукти відрізняються в межах контрастних за ознакою інтересу зразків, це означає, що поряд з геном може знаходитися

послідовність – наслідок активності мобільних генетичних елементів і впливати на прояв ознаки.

Для скринування геномної ДНК штучних амфідиплоїдів, контрастних за ознакою воскова осуґа було використано багато варіантів сполучення праймерів чотирьох ретротранспозонів з

Таблиця 1. Варіанти комбінування праймерів у системах IRAP (1–5) і REMAP (6–8) та продукти ампліфікації

Комбінація праймера	T _(a)	Максимальна кількість розділених продуктів	Розмір продуктів
1. Nikita/Nikita	60	9	340-2840
2. REMAPGAn/ REMAPGAn	58	4	380-1500
3. Sukkula/Sukkula	55	20	600-4500
4. Sabrina/Sabrina	60	5	1200-2480
5. Nikita/Sukkula	60	6	360-1700
6. Nikita/(CT) ₉ G	60	9	300-1160
7. Sukkula/(CT) ₉ G	53	9	260-800
8. Sabrina/(CT) ₉ G	61	12	780-2480

З IRAP-праймерами пари Nikita/Nikita були отримані поліморфні продукти ампліфікації для контрастних зразків Авротика 1, зелена та Авротика 2, блакитна. Спектр Аврори відрізнявся від обох зразків (табл. 2). Найбільшу кількість компонентів у спектрі має амфідиплоїд Авротика 1, зелена, яка має унікальний компонент 2 (близько 1300 п.о), який і відрізняє цей спектр від спектру Аврори. Авротика 2, блакитна, має найменшу кількість компонентів і відрізняється від зеленого аналога відсутністю компонентів 2, 8, 9 та наявністю нового компоненту, 10 (850 п.о.), який не представлений ані у Аврори ані у Авротика 1. Спектри геномно-доданих форм Міоза є ідентичними (рис. 1).

Ампліфікація з праймерами до пари Sukkula/Sukkula продукувала спектри компонентів, які значно розрізняються для ДНК Аврори та геномно-заміщених амфідиплоїдів. У спектрі Авротика 2, блакитної відсутні десять компонентів, які є характерними для Авротика 1, зелена та Аврори. Авротика 1, в свою чергу, відрізняється від Аврори наявністю компонентів 1, 2, 3 та відсутністю компонента 17. Спектр компонентів ДНК Міози зелена відрізняється від такого Міози блакитної відсутністю компонентів 14, 15, 16 та наявністю компонента 10. При застосування праймерів до LTR ретротранспозонів Sabrina/Sabrina спектри компонентів контрастних форм Міози є однаковими. З даними праймерами найбільшу кількість компонентів продукує геном Аврора. Спектр Авротика 1, зеленої,

праймерами до різних мікросателітних локусів, проте продукти було отримано лише для трьох з них та одного мікросателіта (CT)₉G, широко розповсюдженого у геномі. Зате продукти ампліфікації було отримано для всіх однойменних пар з чотирьох транспозонів та для однієї пари різних транспозонів (табл. 1).

відрізняється від спектра Аврори наявністю компонента 3, та відсутністю компонента 5.

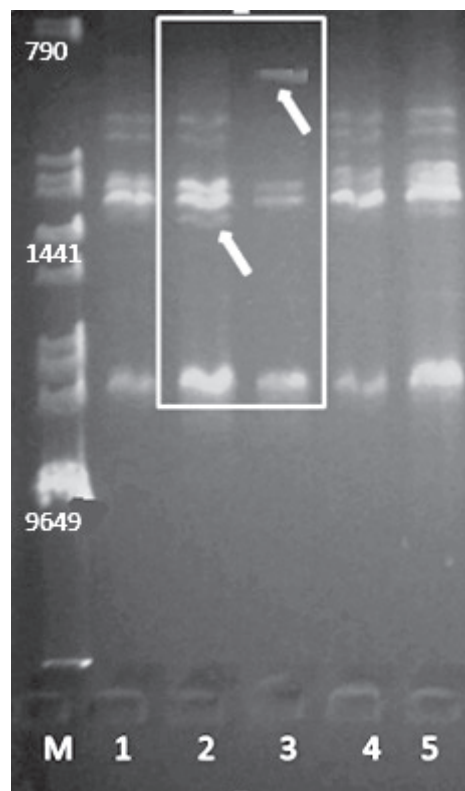


Рис. 1. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації з IRAP-праймерами Nikita/Nikita. М – маркер мас, 1 – Аврора, 2 – Авротика 1, зелена, 3 – Авротика 2, блакитна, 4 – Міоза зелена, 5 – Міоза блакитна

ДНК Авротики 2, блакитної, взагалі не давала продуктів з даною парою праймерів.

Спектри компонентів, отримані з парою праймерів REMAP Sabrina/(CT)9G для контрастних зразків Міози не відрізнялися, хоча і продукували по 11 компонентів. Спектри Авротики зеленої та блакитної також один від одного не

відрізняються, хоча дуже відрізняються від спектру компонентів ДНК Аврори скороченням кількості компонентів: у Аврори 11, у обох Авротик по чотири. Апліфікація з праймерами пари REMAPGAn/ REMAPGAn продукували лише чотири компоненти, за якими поліморфізму між вивченими зразками встановлено не було.

Таблиця 2. Продукти ампліфікації геномної ДНК рослинних зразків з IRAP та REMAP праймерами

Рослинний матеріал	Продукти ампліфікації, наявні у спектрі зразка			
	Nikita/Nikita	Sukkula/Sukkula	Sabrina/Sabrina	Sabrina/(CT)9G
Аврора	1,3,4,8,9	2,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,16,17,18	1,2,4,5	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12
Авротика 1, зелена	1,2,3,4,8,9	1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,16,18	1,2,3	2,8,9,10
Авротика 2, блакитна	1,3,4,10	1,2,4,7,8,11,12	продуктів не було	2,8,9,10
Міоза зелена	1,5,6,7,8,9	2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,17,18,19,20	1,3,5	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12
Міоза блакитна	1,5,6,7,8,9	2,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20	1,3,5	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12

Висновки

Ампліфікація ДНК геномно-заміщених та геномно-доданих амфідиплоїдів пшениці, контрастних за ознакою наявності/відсутності воскової осуги, з праймерами систем IREP та REMAP продукувала спектри компонентів, які були своєю поліморфними для різних зразків та пар праймерів. На даному рослинному матеріалі та єдина пара праймерів системи REMAP, яка дала продукти ампліфікації, Sabrina/(CT)9G, виявилася неефективною для розрізнення ДНК зразків амфідиплоїдів з контрастними генотипами. Неефективними були пари праймерів Nikita/Nikita,

Sabrinai/Sabrina для контрастних зразків Міози та пара REMAPGAn/ REMAPGAn для всіх вивчених зразків. Поліморфізм за компонентами спектру було виявлено для пар Nikita/Nikita, Sukkula/Sukkula, Sabrinai/Sabrina при ампліфікації ДНК контрастних рослин Авротики. У всіх випадках спектр Авротики 1, зеленої, відрізнялася від спектру Аврори новим компонентом, а спектр Авротики 2, блакитної, відрізнявся від спектру зеленого аналога втратою компонентів спектру.

Література

1. Шпильчин В.В. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскова осуга серед представників підтриби *Triticinae* / Шпильчин В.В. Антонюк М.З., Терновська Т.К // Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. – 2010. – Т. 106. – С. 3–8.
2. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Зміна прояву ознаки воскова осуга у генераціях амфідиплоїдів підтриби *Triticinae* // Наукові записки НаУКМА. – 2011. – Т. 119. – С. 3–7.
3. Zhao N., Xu L., Zhu B., Li M., Zhang H., Qi B., Xu Ch., Han F., Liu B. Chromosomal and genome-wide molecular changes associated with initial stages of allohexaploidization in wheat can be transit and incidental // *Genome*. – 2011. – Vol. 54, №8. – P. 692–699.
4. Liu B., Xu Ch., Zhao N., Qi B., Kimatu J.N. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement // *J. Genet. Genomics*. – 2009. – Vol. 36. – P. 519–528.
5. Flavell R.B., Rimpau J., Smith D.B. Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes // *Chromosoma*. – 1977. – Vol. 63. – P. 205–222.
6. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – P. 2478–2484.

SHPYLCHYN V.V., TERNOVSKA T.K.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy"

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net

IRAP AND REMAP TECHNIQUES FOR POLYMORPHISM DETECTION IN AMPHIDIPOIDS WHICH ARE INSTABLE FOR GLAUCOUSNESS

Aims. To study polymorphism of amplification products derived from the DNA of amphidiploids which are contrast for glaucousness with primers of IRAP and REMAP systems. **Methods.** PCR with primers to LTR of retrotransposons and microsatellites. Electrophoresis of DNA fragments. **Results.** DNA amplification of investigated plants produced monomorphic or polymorphic components of spectrum depending on amphidiploid genome, AABBTT or AABBM^tM^t and primers used. LTR/LTR primers in this plant material were detected as more informative as LTR/SSR primers. **Conclusions.** In this plant material the polymorphism for amplification products with primers to LTR of retrotransposons for pair Nikita/Nikita, Sukkula/Sukkula, Sabrinai/Sabrina were detected.

Key words: *Triticinae*, retrotransposons, glaucousness, amphidiploids.

АНОПРІЄНКО О.В., ВАГІНА І.М., ЗАХАРУК О.А., МОРОЗОВА Л.М., СТРОКОВСЬКА Л.І.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, Київ, ул. ак. Заболотного, 150; e-mail: o.v.anoprienko@imbg.org.ua

ЕКСПРЕСІЯ ІНТЕРФЕРОН-ЧУТЛИВИХ ГЕНІВ ПРИ СУМІСНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ КЛІТИН МЕЛАНОМИ І ФЕТАЛЬНИХ ФІБРОБЛАСТІВ МИШІ

На сучасному етапі стає все більш очевидно, що мікрооточення різних типів пухлин відіграє набагато критичнішу роль в ініціації пухлинного процесу, його прогресії і розвитку метастазів, ніж вважалося раніше [1]. Серед компонентів строми активовані фібробласти або пухлино-асоційовані фібробласти (ПАФ) привертають увагу як продуценти протуморогенних чинників. Одним з джерел ПАФ можуть бути мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), що мають властивість тропізму до місць запалення і утворення пухлини. Ця властивість, а також відносна доступність і вивченість методів отримання МСК слугують приводом для досліджень можливості їх застосування як “векторних клітин”, що доставляють терапевтичний агент безпосередньо до пухлини або місць метастазування [2]. Особливо актуальною стратегія векторних клітин може бути для чинників, таких як β -інтерферон, що проявляють системну токсичність при внутрішньовенному введенні в організм у терапевтичних дозах. У ряді модельних експериментів з доставки IFN- β до пухлини за допомогою МСК був продемонстрований протипухлинний ефект [3]. Проте невивченими залишаються довготривалі і віддалені наслідки

такої потенційної терапії з огляду на здатність МСК надавати самостійну стимулюючу дію на ракові клітини. Ці факти роблять необхідним як ретельнішу характеристику системи «векторні клітини/протипухлинний агент/ракові клітини», так і пошук додаткових мішеней і засобів їх ін активації для більш ефективного пригнічення або знищення ракових клітин. Попередньо нами була показана інгібуюча дія IFN- β , що синтезується фетальними фібробластами, трансдукованими бакуловірусним вектором (Ac-CMV-IFN), на проліферацію пухлинних клітин меланоми миші (ММ4) при їх сумісному культивуванні. Для вивчення змін експресії інтерферон-чутливих генів в системі сумісно-культивованих фетальних фібробластів та клітин меланоми миші, яка моделює взаємодію стромальних фібробластів з клітинами пухлин *in vivo*, було проаналізовано 7 генів: *Mx1*, *p21*, *Dicer1*, *Ccl5*, *α -Sma(Acta2)*, *Epsti1*, *Gremlin1*. Загалом, ці гени є або інтерферон-індукованими генами, які грають певну роль у процесі онкогенезу, й/або генами, експресія яких відображає вплив стромальних клітин на трансформовані пухлинні клітини.

Матеріали і методи

Клітинні культури. В якості контрольних були обрані наступні монокультури клітин: культура клітин фетальних фібробластів миші C57Fb; фібробласти C57Fb, трансдуковані диким бакуловірусом AcMNPV через 24 години після трансдукції; C57Fb, трансдуковані рекомбінантним бакуловірусом Ac-CMV-IFN через 24 години після трансдукції; сублінія клітин меланоми миші (B16) ММ4; ММ4, оброблені кондиційним середовищем (с.м.). Для отримання кондиційного середовища фібробласти C57Fb трансдукували рекомбінантним бакуловірусом Ac-CMV-IFN. Після інкубації з вірусом клітини відмивали три рази розчином PBS і додавали свіже середовище. Після 24 годин культивування кондиційне середовище відбирали і викорис-

товували в співвідношенні 1:1 із свіжим DMEM+10%FBS для інкубації клітин ММ4 протягом 24 годин, після чого з клітин виділяли РНК.

Для дослідження можливих змін експресії обраних генів в системі сумісних культур фібробластів і клітин меланоми брали суміш клітин C57Fb:ММ4 у співвідношенні 1:10 і суміш фібробластів C57Fb, трансдукованих Ac-CMV-IFN, і ММ4 в тому ж співвідношенні. Динаміку змін експресії спостерігали при відборі культивованих клітин а) безпосередньо після змішування (0h); б) 24 години після сумісного культивування (24h) і в) на 5 добу сумісного культивування (120h). Для контролю зміни рівню експресії рекомбінантного інтерферону у ці ж часові точки

збирали фібробласти, трансдуковані Ас-СМV-IFN.

Виділення РНК та синтез кДНК. РНК виділяли за допомогою набору для виділення РНК на мініколонках фірми Fermentas (Літва, Thermo Fisher Scientific) згідно протоколу фірми-виробника. 2 мкг РНК обробляли ДНКазою (Fermentas) після чого по 1мкг РНК використовували в реакції зворотної транскрипції (RT+) для отримання кДНК з праймером oligo-dT та контрольної (RT-) реакції (без зворотної транскриптази) за допомогою набору для синтезу

Результати і обговорення

Злоякісна метастазуюча меланома є однією з найагресивніших пухлин людини. Застосування векторних клітин, як засобу доставки інтерферону може вносити додаткові фактори, які в свою чергу можуть модифікувати відповідь клітин меланоми на цей терапевтичний агент. Ми поставили завдання отримати початкову характеристику системи «потенційні векторні клітини C57Fb/IFN- β /клітини меланоми ММ4» за генами, експресія яких є інтерферон-залежною і свідчить про активацію певних сигнальних шляхів, а також, з огляду на великий метастатичний потенціал клітин меланоми, генами що відображають стромально-пухлинну взаємодію, і які можуть відігравати певну роль у підвищенні метастатичного потенціалу.

Ген *MxA/Mx1* (Muxovirus (Influenza virus) resistance A) є високоспецифічним біомаркером відповіді на інтерферони I типу. Його інгібуюча активність відносно рухливості й інвазивних властивостей ракових клітин була виявлена відносно недавно [4]. *MxA* розглядають як нову перспективну мішень для цілей попередження виникнення або терапії метастазів [4]. В наших експериментах експресія *MxA* на низькому рівні спостерігалась і в фібробластах, і в клітинах ММ4. Індукція інтерфероном відбувається в обох типах клітин. При сокультивуванні клітин спостерігається збільшення експресії *Mx1* візуально пропорційно рівню експресії *Ifn- β* і кількості інтерферон-продукуючих клітин в зразках (рис. 1).

В цілому, незважаючи на відсутність детекції експресії *Ifn- β* у відповідь на трансдукцію контрольним диким бакуловірусом (БК) клітин C57Fb ми спостерігаємо у них невелике підвищення експресії інтерферон-стимульованих генів (*Mx1*, *Epst11*, *Ccl5*) у порівнянні з контрольними фібробластами, що свідчить про певну активність самих БК-векторів по відношенню до клітин і здійсненню в них інтерферонової відпо-

кДНК (Fermentas). 2 мкл синтезованої кДНК використовували для ПЛР з праймерами на обрані гени. *Gapdh* було обрано у якості референтного гену домашнього господарства.

ПЛР. Полімеразну ланцюгову реакцію виконували за допомогою Таq-полімерази (Fermentas) у 20мкл реакційної суміші, що містила 10x буфер для полімерази, 300мкМ dNTP, по 10pmol прямого й зворотного праймерів, 1 од. Таq-полімерази і 2 мкл кДНК-матриці. Реакцію виконували на ампліфікаторі BIS Thermocycler (ООО “БИС-Н”).

віді. Це може бути важливим при застосуванні векторних клітин на базі БК і вивченні імунної відповіді організму на терапію такими клітинними векторами.

Ген *p21WAF1* є інтерферон-чутливим, кодує інгібітор циклін-залежних кіназ СР1 і є одним з основних ефекторних генів супрессору пухлин p53. В нашому експерименті ми спостерігаємо деяке підвищення рівню експресії гену *p21* в культурі клітин меланоми під впливом кондиційного середовища (рис. 1). Проте зміни експресії у сумісній культурі клітин неявні і вочевидь потребують дослідження за допомогою більш точних методів. Як було встановлено у інших роботах, IFN- β спричиняє більш виражену ніж IFN- α індукцію апоптозу у багатьох типах ракових клітин [5]. Але не всі клітини переходять у стадію апоптозу і, можливо, частина зупиняється у G0/G1 фазі клітинного циклу, що при зупиненні дії терапевтичного чинника дозволяє останнім продовжувати ріст.

DICER є ключовим фактором процесінгу мікроРНК (міРНК). Рівень експресії міРНК загалом знижений в пухлинах людини. Є дані про негативну регуляцію DICER інтерферонами I типу і при стресі [6]. Незалежно показано, що пригнічення експресії *DICER* є одним з шляхів, що призводять до розвитку менш диференційованого фенотипу трансформованих епітеліальних клітин, що є ознакою процесу Епітеліально-Мезенхімального переходу і сприяє метастазуванню [7]. В нашому аналізі експресії *Dicer* в культурах клітин миші спостерігається деяке зменшення рівню експресії мРНК гену при сумісному культивуванні клітин меланоми і фібробластів (рис. 1), що може бути ще одним з шляхів загального зниження активності DICER і підвищені метастазування клітин пухлини.

Експресія гену *α -Sma* (α -smooth muscle actin) є характерною ознакою міофібробластів – активованих фібробластів або ПАФ строми пух-

лин. На невеликому рівні він експресується також в мезенхімальних стовбурових клітинах, які ймовірно є основним джерелом ПАФ. Продукт гену грає певну роль в прогресуванні пухлини, проте механізм його дії невідомий. Аналіз експресії гену в клітинах C57Fb виявив його досить високий рівень в цих клітинах, відсутність індукції інтерфероном, проте відносно невелику індукцію в клітинах MM4 під впливом кондицій-

ного середовища (рис. 1). Але не спостерігається ніякої різниці у кількості продукту цього гену в сумісних культурах ні в динаміці, ні за різницею в пропорційній кількості клітин C57Fb і MM4, ні за експресією інтерферону. Ці дані вказують на додаткові фактори регуляції експресії цього гену і перспективність подальшого вивчення його ролі у розвитку пухлин різного походження.

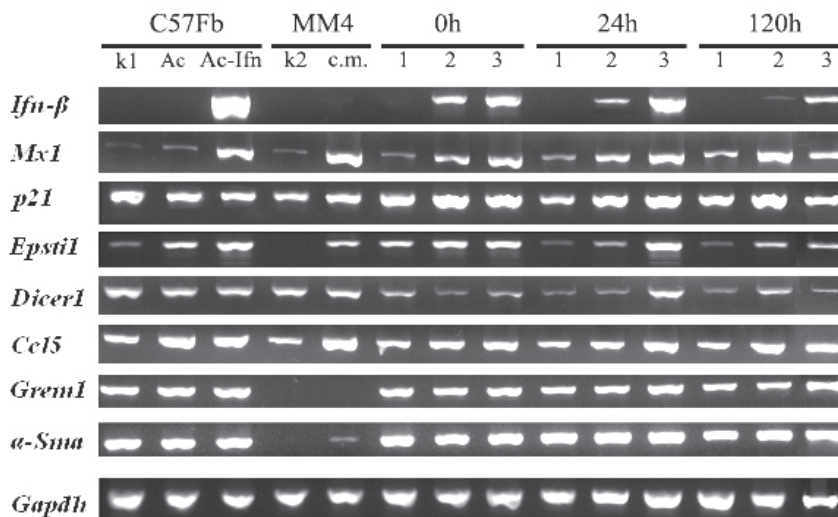


Рис. 1. Зміни експресії інтерферон-чутливих генів при сумісному культивуванні фетальних фібробластів C57Fb з клітинами меланоми миші MM4. Контрольні варіанти: k1 – фетальні фібробласти C57Fb; Ac – C57Fb, трансдуковані диким бакуловірусом AcMNPV; Ac-Ifn – C57Fb, трансдуковані Ac-CMV-IFN; k2 – клітини меланоми (MM4); c.m. – MM4, оброблені кондиційним середовищем; Варіанти сумісного культивування: 1. – контрольна суміш клітин C57Fb:MM4 (1:10); 2. –Ifn β -C57Fb:MM4 (1:10) – C57Fb, трансдуковані Ac-CMV-IFN:MM4; 3. – C57Fb, трансдуковані Ac-CMV-IFN (контроль)

GREMLIN-1 є секреторним антагоністом сигнального шляху BMP. Експресія GREMLIN 1 спостерігається виключно в стромі багатьох карциномних пухлини, але не в відповідних нормальних органах *in vivo* [8] Було зроблено висновок, що GREMLIN та інші антагоністи BMP роблять внесок в утворення сприятливого мікрооточення для росту багатьох типів раку. В нещодавній роботі було встановлено, що маркери *α-Sma* і *Gremlin-1* не перекриваються в популяції ПАФ шлункової дисплазії, що, за висновком авторів, свідчило про те, що *Gremlin-1* є маркером скоріше МСК в їх ніші в кістковому мозку, і також в мікрооточенні пухлини [9]. В нашому досліді експресія *Gremlin-1* спостерігається виключно в клітинах C57Fb. Індукція інтерфероном відсутня (рис. 1). Проте як і для *α-Sma* не спостерігається ніякої різниці у кількості продукту цього гену в сумісних культурах ні в

динаміці, ні за різницею в пропорційній кількості клітин C57Fb і MM4 (10% частина клітин C57Fb у зразках 0h№1 і 0h№2 і 100% фібробластів у контрольному зразку 0h№3). Ці дані, як і у випадку гену *α-Sma* потребують додаткового аналізу. Проте загалом, за попередніми даними експресії генів *α-Sma* і *Greml1* фетальні фібробласти C57Fb мають ознаки МСК-подібних клітин і їх застосування у якості модельних для вивчення взаємодії стромальні клітини/клітини пухлини може бути перспективним.

Хемокин CCL5(RANTES) грає певну роль в хемотаксисі та метастазуванні клітин раку молочної залози. Його експресія значно підвищувалась при сумісному культивуванні мезенхімальних стовбурових клітин з слабометастазуючими клітинами раку молочної залози, що збільшувало їх рухливість, інвазивність і метастазування [10]. У нашому експерименті спостері-

гається невелика індукція *Ccl5* в фібробластах при трансдукції як контрольним бакуловірусом, так і рекомбінантним Ас-СМV-IFN- β . Також помітне підвищення експресії *Ccl5* в клітинах ММ4 у відповідь на кондиційне середовище з інтерфероном у порівнянні з контрольними клітинами без обробки (рис. 1). Але значного підвищення рівню мРНК *Ccl5* у відповідь на сокультування двох типів клітин не виявлено. Це може бути результатом різного співвідношення фібробластів і пухлинних клітин (1:10 проти 1:2 у Karnoub et al., 2007) проте може також відображати різницю в характеристиках клітин, які використовували в експерименті в якості аналогів ПАФ (фетальні фібробласти і МСК).

Фактор EPSTI (Epithelial Stromal Interaction I) стимулює інвазивні властивості пухлинних клітин раку молочної залози, і є інтерферон-регульованим [11]. Ми підтвердили індукцію синтезу РНК *Epsti1* у відповідь на IFN- β як у фібробластах, так і в клітинах меланоми ММ4. При сумісному культивуванні C57Fb і ММ4 виявлено помітне зменшення рівню його РНК на 24 години і на 5 добу (120h) в порівнянні з 0 годиною. Проте сумісна культура ММ4 з фібробластами, що продукують інтерферон все ж виявляла дещо більший рівень експресії *Epsti1*, ніж сумісна культура з нетрансдукваними фібробластами (відповідно зразки 2 і 1 на 24 години і 120

годин). Таким чином потенційно цей фактор може робити вклад у віддалені наслідки як інтерферонової терапії, так і терапії векторними клітинами.

Таким чином, на невеликому наборі генів в системі «векторні клітини/IFN/клітини пухлини» ми спостерігаємо досить непросту картину змін експресії генів, активність яких направлена як в напрямку пригнічення рухливості і інвазивних властивостей пухлинних клітин, так і в протилежному напрямку. Ці зміни можуть бути опосередковані впливом як векторних фібробластів і власних активованих фібробластів пухлини (зменшення рівню експресії *Dicer* і *Epsti1*), так і дією інтерферону (підвищення експресії *Mx1*, *p21*, *Epsti1* і *Ccl5* і інгібування *Dicer* на посттрансляційному рівні), що робить необхідним подальше вивчення взаємодії всіх компонентів системи «клітинних векторів» з огляду на віддалені наслідки потенційної терапії з використанням цього методу. Інгібуюча дія інтерферону охоплює вочевидь не всі можливі шляхи, що сприяють росту і метастазуванню пухлин. Проведений аналіз дозволяє зробити висновки про перспективність пошуку підсилюючих терапевтичний вплив інтерферону чинників, можливо направлених у бік стромальних компонентів пухлин.

Література

1. Ostman A., Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth-bystanders turning into key players // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2009. – Vol. 19. – P. 67-73.
2. Hall B., Dembinski J., Sasser A.K., et al. Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles // Int. J. Hematol. – 2007. – Vol. 86, № 1. – P. 8-16.
3. Kidd S., Caldwell L., Dietrich M., et al. Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment // Cytotherapy. – 2010. – Vol. 12. – P. 615-625.
4. Mushinski J.F., Nguyen P., Stevens L.M., et al. Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 15206-15214.
5. Chawla-Sarkar M., Leaman D.W., Borden E.C. Preferential induction of apoptosis by Interferon (IFN)- β compared with IFN- α : correlation with TRIL/Apo2L induction in melanoma cell lines // Clinical Cancer Research. – 2001. – Vol. 7. – P. 1821-1831.
6. Wiesen J.L., Tomasi T.B. Dicer is regulated by cellular stresses and interferons // Mol. Immunol. – 2009. – Vol. 46, №6. – P. 1222-1228.
7. Martello G., Rosato A., Ferrari F., et al. MicroRNA targeting dicer for metastasis control // Cell. – 2010. – Vol. 141, №7. – P. 1195-1207.
8. Sneddon J.B., Zhen H.H., Montgomery K., et al. Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, №40. – P. 14842-14847.
9. Quante M., Tu S.P., Tomita H., et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth // Cancer Cell. – 2011. – Vol. 19. – P. 257-272.
10. Karnoub A.E., Dash A.B., Vo A.P., et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis // Nature. – 2007. – Vol. 449, №7162 – P. 557-563.
11. de Neergaard M., Kim J., Villadsen R. et al. Epithelial-stromal interaction 1 (EPSTI1) substitutes for peritumoral fibroblasts in the tumor microenvironment // The American J. of Pathol. – Vol. 176, №3. – P. 1229-1240.

ANOPRIYENKO O.V., VAGINA I.N., ZAKHARUK O.A., MOROZOVA L.M., STROKOVSKA L.I.
Institute of molecular biology and genetics NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, ak. Zabolotnogo str., 150; e-mail: o.v.anoprienko@imbg.org.ua

EXPRESSION OF INTERFERON-SENSITIVE GENES IN COCULTURE OF MOUSE MELANOMA AND FETAL FIBROBLAST CELLS

Aims. On the model of triple system «potential vector cells C57Fb/ IFN- β / melanoma MM4 cells» we aimed to trace changes in expression of interferon-sensitive genes, and genes which expression may depend on stromal part of tumors and might play roles in enhancing of metastatic potential of tumorous cells. **Methods.** Mono cell cultures and cocultures of C57Fb fibroblasts and MM4 melanoma cells were used to investigate gene expression changes by PR-PCR. **Results.** On the set of 7 genes in the system «potential vector cells C57Fb/IFN- β /melanoma MM4 cells» we observe pattern of complicated changes in expression of genes, which activity is assigned towards the inhibition of motile and invasive properties of tumorous cells, and in the opposite direction. These changes may be mediated as by the vector fibroblasts or own tumor activated fibroblasts and by the action of interferon. **Conclusions.** We speculate the promise of finding factors enhancing the therapeutic effect of interferon directed toward stromal components of tumors.
Key words: cancer therapy, cancer-associated fibroblasts; melanoma, interferon, baculovirus.

БІЛИНСЬКА О.В.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України
61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

ВПЛИВ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ ДОНОРНИХ РОСЛИН ТА СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ РІПАКУ ЯРОГО В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Для ріпаку, як і для інших видів, встановлено чітку залежність індукції андрогенних структур та перебігу регенерації від умов вирощування рослин-донорів пиляків [1–3]. Зокрема, доведено, що оптимальним режимом для отримання високоякісного щодо індукції морфогенезу в культурі *in vitro* пиляків та ізольованих мікроспор матеріалу ріпаку є субоптимальна температура: 10 °C день/5 °C ніч [1, 4]. Однак такий температурний режим може бути підтриманий лише за наявності спеціальних камер штучного клімату з технічними можливостями для забезпечення істотного зниження температури при високому рівні освітленості, що неминуче призводить до значних витрат електроенергії. Менш енерговитратними є теплиці з комбінованим освітленням, але вони не забезпечують стабільного температурного режиму [5].

Слід зазначити, що з огляду на високу вартість вирощування рослин у камерах штучного клімату, польові умови при різних строках сівби нерідко залишаються єдиним засобом отримання вихідного матеріалу для біотехнологічних досліджень. Більш того, як показали наші експерименти, проведені на ячмені ярого, пожнивна сівба (липень–серпень) за штучного поливу дозволяє вирощувати матеріал, який не лише не

поступається рослинам оптимального весняного строку сівби за здатністю до андрогенезу *in vitro*, але й перевищує їх [6]. Практика поживної сівби, за рахунок якої проведення робіт переноситься на менш спекотні вересень і жовтень, на нашу думку, є особливо актуальною на тлі глобальних змін клімату.

Не менш важливим чинником для реалізації морфогенетичного потенціалу в культурі *in vitro* будь-яких експлантатів, включаючи пиляки [7–9], є склад живильного середовища. Для культивування пиляків ріпаку застосовуються середовища на основі композиції солей макро- та мікроелементів B5 [10] та MS [11]. Ізольовані мікроспори культивують також на середовищі NLN-13 [12], яке відрізняється зменшеним вдвічі вмістом нітратного азоту.

Характерною особливістю цих середовищ є високий вміст сахарози та низький вміст стимуляторів росту ауксинової дії. Разом з тим відомо, що за стресових умов, які можуть мати місце в період вирощування матеріалу для експериментів у галузі андрогенезу *in vitro*, підвищення концентрації ауксинів чи застосування у живильному середовищі їх більш активних за фізіологічним ефектом аналогів дозволяє отримати стабільніші результати [13].

Зважаючи на викладене вище, метою досліджень було визначення можливості вирощування рослин-донорів пиляків ріпаку яркого за поживної сівби та удосконалення складу сере-

Матеріали і методи

Як модельний генотип використано сорт ріпаку яркого (*Brassica napus* L.), у якого за результатами попередніх досліджень виявлено високу здатність до андрогенезу *in vitro* [14].

Сівбу проводили у третій декаді березня на дослідній ділянці по чорному пару ручною саджалкою широкорядним способом з шириною міжрядь від 45 см та відстанню в рядку між рослинами 15 см, на глибину 3 см. Норма висіву: 120 насінин на 1 м². Оптимальну густоту – 80 рослин на 1 м² – було сформовано шляхом проривки в фазі другої пари справжніх листків. З огляду на несприятливий гідротермічний режим у період вегетації застосовували штучний полив.

Поживну сівбу проводили у другій декаді серпня з дорощуванням рослин у теплиці в осінньо-зимовий період при температурі від 24 °С до 27 °С, освітленні лампами Махус 105 Вт і ДРВ-750 Вт. Частину рослин залишали на ділянці для перезимівлі, вкривши їх при зниженні температури до мінус 5 °С шаром листя.

Суцвіття або бутони для маніпуляцій *in vitro* добирали, починаючи з першої декади травня. При цьому керувалися рекомендаціями з літературних джерел щодо розміру бутонів з оптимальною фазою розвитку пиляків і деяких фенотипових маркерних ознак пиляків, пелюсток, мікроспор, пилку [4, 5, 15].

Суцвіття та бутони вміщували у зволожені пакети з фільтрувального паперу, які зберігали у чашках Петрі або металевих контейнерах у холо-

Результати та обговорення

Спроби отримати матеріал для маніпуляцій *in vitro* в осінньо-зимовий період з насіння, висіяного у вегетаційні посудини з ґрунтовою сумішшю у світловій кімнаті чи теплиці, незважаючи на досить високу освітленість (лампи ДРВ-750 Вт), не дали позитивного результату через значне підвищення температури (до 35 °С), викликане нагріванням ламп. Рослини після появи справжніх листків мали тонкі видовжені стебла і вилягали. Використання ламп Махус 150 Вт дозволило знизити температуру на рівні рослин до 27 °С, але вилягання спостерігалося у фазі проростків з сім'ядолями. Цікаво, що рослини, отримані з насіння *in vitro* і пересажені у вегетаційні посудини у фазі чотирьох справжніх листків з добре розвинутою кореневою

довища для культивування пиляків на основі зміни якісного та кількісного складу ауксинів, а також збільшення вмісту сахарози.

дильнику в темряві впродовж трьох діб при температурі 4 °С, потім висаджені пиляки – впродовж трьох діб при 35 °С, як рекомендовано [1, 15].

Стерилізацію бутонів проводили комерційним препаратом “Domestos” (концентрація 50,0 %, тривалість обробки від 20 хв до 25 хв) з подальшим відмиванням у трьох змінах стерильної дистильованої води.

Пиляки культивували в термостаті при температурі 26 °С на середовищі [6], яке містило солі макро- та мікроелементів В₅ [10], вітаміни В₁ – 10,0 мг/л; В₆ – 1,0 мг/л; РР – 1,0 мг/л; міоїнозитол – 100,0 мг/л; глютамін – 800,0 мг/л; НУК – 0,1 мг/л; 2,4-Д – 0,1 мг/л; сахарозу – 100,0 г/л; агар-агар “Difco” – 0,8 %; рН 5,6–5,7. У дослідних варіантах було використано живильні середовища, які містили солі макро- та мікроелементів NLN-13 [12] (KN), сахарозу в збільшеній до 150,0 г/л концентрації (KS); 0,2 мг/л 2,4-Д (K₂); 0,5 мг/л 2,4-Д (K₅). Отримані ембріоїди пересаджували на середовище MS [11] без фітогормонів із зниженим до 10,0 г/л вмістом сахарози.

Ефективність ембріодогенезу у культурі пиляків *in vitro* оцінювали за такими показниками: кількість ембріоїдів і кількість рослин у відсотках від загального числа культивованих пиляків. Результати експериментів піддавали статистичній обробці за використання загальновідомих статистичних методів [16].

системою, були менш чутливими до температурно-світлового режиму.

Сівба в оптимальні для ріпаку яркого строки за достатньої кількості вологи в ґрунті дозволила отримати добре розвинуті рослини. Але підвищення температури повітря до 30 °С вже у третій декаді квітня і першій декаді травня, на які припадають фаза бутонізації і добір суцвіття для культури пиляків *in vitro*, призвело до істотного погіршення стану посівів.

Спостереження за ростом і розвитком рослин поживної сівби (третьа декада серпня) свідчать, що застосування штучного поливу в умовах літньої посухи дозволило одержати дружні сходи і зберегти посіви, а опади та помірна температура впродовж вересня–жовтня сприяли

формуванню рослин, які перевищили за площею листової поверхні рослини весняного строку сівби. При зниженні температури до 3 °С ці рослини були пересажені у вегетаційні посудини і перенесені для дорошування у теплицю та використані у фазі бутонізації як матеріал для

досліджень (рис. 1). Слід зазначити, що за рахунок пересадки рослин більш пізніх фаз розвитку і скорочення тривалості вегетації в умовах штучного клімату було значно зменшено енерговитрати.



Рис. 1. Вирощування рослин сорту ріпаку ярого Аріон в умовах штучного клімату

Дослідження показали (рис. 2), що саме за використання високоякісного тепличного матеріалу у сорту Аріон було досягнуто високих показників гаплопродукції. Зокрема, частоти прямого ембріодогенезу та регенерації рослин становили відповідно 69,8 % і 53,8 %. За використання рослин весняного строку сівби було отримано майже вдвічі нижчі показники ембріодогенезу і регенерації рослин, що, безперечно, пов'язано з високою температурою (до 50 °С на

поверхні ґрунту і на рівні суцвіть) у момент досягнення оптимальної для добору бутонів фази розвитку.

Поодинокі рослини поживної сівби у відкритому ґрунті відновили вегетацію навесні одночасно з ріпаком озимим. Але вони значно поступалися матеріалу весняного строку сівби за якістю та за ефективністю морфогенезу в культурі пиляків *in vitro* (рис. 2).

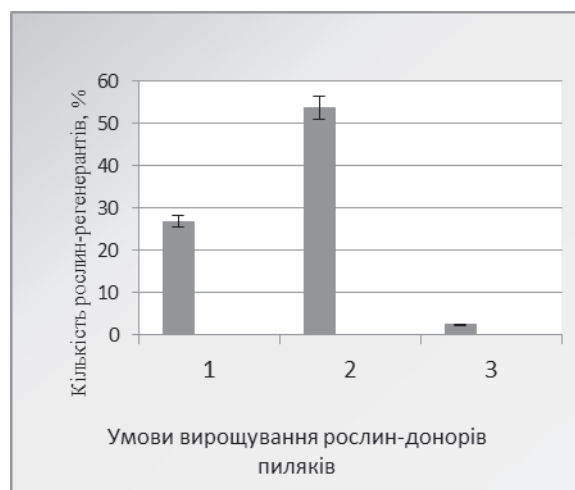
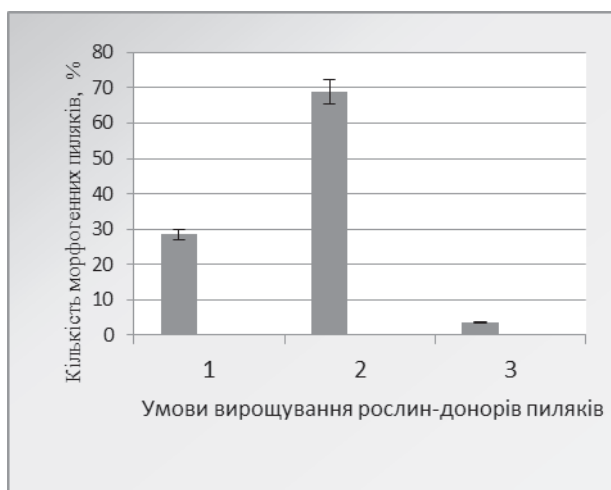


Рис. 2. Здатність до андрогенезу *in vitro* сорту ріпаку ярого Аріон за різних умов вирощування донорних рослин: 1 – поле, оптимальний строк сівби; 2 – поживна сівба, дорошування в теплиці; 3 – поживна сівба, перезимівля

Культивування пиляків на живильних середовищах, які різнилися за мінеральною основою, вмістом фітогормонів та сахарози, показало, що базове середовище [1] було більш ефек-

тивним, ніж інші варіанти (рис. 3). Зокрема, культура виявилася чутливою до зростання вмісту 2,4-Д навіть на 0,1 мг/л (середовище K₂).

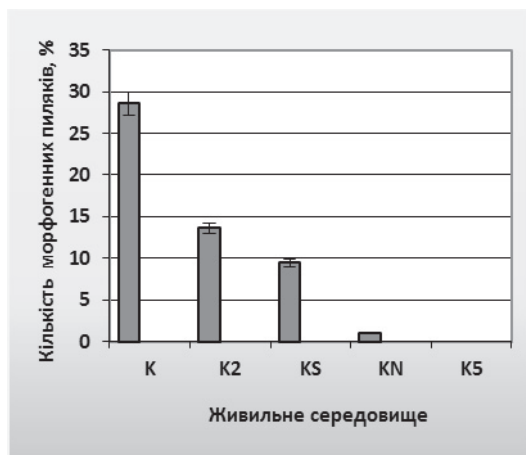


Рис. 3. Здатність до андрогенезу *in vitro* сорту ріпаку ярого Аріон в залежності від складу живильного середовища: К – солі макро- та мікроелементів В₅ (Gamborg, et al., 1968), по 0,1 мг/л 2,4-Д та НОК, 100,0 г/л сахарози; К₂ – 0,2 мг/л 2,4-Д, 100,0 г/л сахарози; KN – солі макро- і мікроелементів (Lichter, 1981), по 0,1 мг/л 2,4-Д та НОК, 100,0 г/л сахарози; К₅ – 0,5 мг/л 2,4-Д, 100,0 г/л сахарози; KS – по 0,1 мг/л 2,4-Д та НОК, 150 г/л сахарози.

Дещо несподіваним виявився результат, отриманий на середовищі з мінеральною основою NLN-13 (середовище KN). Це ефективне для культури ізольованих мікроспор середовище [13] містить підвищену до 130 г/л концентрацію

сахарази, що необхідно для підтримання високого осмотичного потенціалу. Але для культури пиляків *in vitro* підвищення вмісту сахарози мало негативний ефект.

Висновки

Агротемпературні умови Східного Лісостепу України дозволяють вирощувати високоякісний рослинний матеріал ріпаку ярого для біотехнологічних досліджень за комбінування поживної сівби з дорощуванням рослин в умовах штучного клімату. З огляду на те, що основним лімітуючим фактором у період літньої вегетації є недостатня кількість опадів доцільним є розміщення посівів на дослідних ділянках, забезпечених можливістю штучного поливу. Най-

більший вихід ембріодів і рослин-регенерантів у культурі пиляків *in vitro* сорту Аріон було отримано за використання як донорів пиляків рослин поживного строку сівби. Заміна композиції солей макро- та мікроелементів В₅ на NLN-13, а також підвищення концентрації 2,4-Д і сахарози призвели до зменшення частоти ембріодогенезу та регенерації рослин у культурі пиляків *in vitro* ріпаку ярого.

Література

1. Keller W.A., Armstrong K.C. High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther culture // *Z. Pflanzenzucht.* – 1978. – Vol. 80. – P. 100–108.
2. La K.-H., Pauls P.K. Plant growth environment effects on rapeseed microspore development and culture // *Plant Physiology.* – 1992. – Vol. 99. – P. 468–472.
3. Prakash J., Giles K.L. Induction and growth of Androgenic haploids // *Intern. Rev. Cytol.* – 1987. – Vol. 107. – P. 273–292.
4. Custers J.B. M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) // *Doubled haploid production in crop plants.* – Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2003. – P. 185–193.
5. Smýkalová I., Větrovcová M., Klíma M., Mářčácková I., Griba M. Efficiency of microspore culture for double haploid production in breeding project “Czech Winter Rape” // *Czech Journal of Genetics and plant breeding.* – 2006. – Vol. 42, №2. – P. 58–71.
6. 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.
7. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // *Тр. Никит. Бот. сада.* – 1997. – Т. 119. – С. 63–95.
8. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы: атлас / Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю. и др.; отв. ред И.И. Шамров. – М.: Наука, 2005. – 99 с.
9. Wan G.L., Naeem M.S., Geng X.X., Xu L., Li B., Jilani G., Zhou W.J. Optimization of microspore embryogenesis

- and plant regeneration protocols for *Brassica napus* // International Journal of agriculture & Biology. – 2011. – Vol. 13. – P. 83–88.
10. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Experimental Cell Research. – Vol. 50. – P. 151–158.
 11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
 12. Lichter R. Anther culture of *Brassica napus* L. in a liquid culture medium // Z. Pflanzenphysiol. – 1981. – Vol. 103. – P. 229–237.
 13. Kasha K.J., Simion E., Oro R., Yao Q.A., Hu T.C., Carlson A.R. An improved in vitro technique for microspore culture of barley // Euphytica. – 2000. – Vol. 120, №3. – P. 319–385.
 14. Білінська О.В., Сокольнікова Я.М. Особливості морфогенезу сорту ріпаку ярого (*Brassica napus* L.) Аріон у культурі *in vitro* пиляків і сім'ядольних експлантатів // Генетичні ресурси рослин для стабільного задоволення різноманітних потреб людей: матеріали Міжнародної наукової конференції. – Велика Бакта, 2012. – 26–27 вересня 2012. – С. 105–107.
 15. Абадовская Т.В. Особенности андрогенеза *in vitro* в процессе создания дигиплоидных линий рапса: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Минск, 1994. – 18 с.
 16. Плохинский Н.А. Биометрия. – М.: Изд. Московского ун-та, 1964. – 367 с.

BILYNSKA O.V.

*Yurjev Plant Production Institute of National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine
Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky av. 142, e-mail: bilinska@ukr.net*

EFFECT OF DONOR PLANT GROWTH CONDITIONS AND NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION ON THE EFFICIENCY OF SPRING RAPESEED HAPLOID PRODUCTION IN ANTHER CULTURE *IN VITRO*

Aims. Donor plant growth conditions and nutrient medium composition together with genotype are known to be the decisive factors for determination of anther culture *in vitro* responsibility of different species. Investigations aimed to study a possibility of donor plant growth in summer/autumn period instead of traditional for spring rapeseed spring/summer one and to improve an induction medium for anther culture *in vitro*. **Methods.** Plants of spring rapeseed cv. Arion were grown in a plot (two sowing dates) and in a greenhouse. Aseptic anther culture was obtained according to standard procedure with some modifications. Isolated anthers were cultivated on five media differed by mineral salt, auxin and sugar content. **Results.** It was revealed that anthers isolated from plants growing during summer/autumn period in a field and then transferred to a greenhouse had the highest level of direct embryogenesis and plant regeneration. Nutrient medium containing B₅ macro- and micronutrients, 0,1 mg/l 2,4-D, 0,1 mg/l NAA, 100 g/L sucrose was appeared to be the best for spring rapeseed cv. Arion anther culture *in vitro*. **Conclusions.** The data indicate the advantages of donor plants growing in a moderate temperature regime in comparison with a high temperature one and a medium with a low level of auxins.

Key words: *Brassica napus* L., anther culture *in vitro*, plant growth conditions, nutrient media.

БУЛКО О.В., ЛЁШИНА Л.Г.

*Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины
Украина, 02160, Киев, Харьковское ш., 50, e-mail: obulko@mail.ru*

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ИЗ ЗИГОТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ И КАЛЛУСА ГИНГГО ДВУЛОПАСТНОГО *GINKGO BILOBA* L.

Гингго двулопастное (*Ginkgo biloba* L.) – реликтовое растение и единственный представитель класса Гингговых (*Ginkgoaceae*) из отдела гингговидные (*Ginkgophyta*) надотдела голосеменных растений [1]. Гингго издавна использовали в восточной медицине, а с 60-х годов XX столетия начались научные исследования с кли-

ническими испытаниями препаратов из листьев гингго двулопастного. В химический состав листьев входят флавоноловые гликозиды - производные кемпферола и кверцетина, мирицетин; бифлавоноиды и их гликозиды (бисмозиды): сиядопитизин, билобетин, гинкгетин, изогинкгетин, аментофлавоин, а также антоцианидин, нон-

акозан, гексакозанол, пинит; шикимовая, линолевая, хинная и гидрогинголовая кислоты; лактоны, терпены (гинкголиды А, В, С и J, аллонтонны, тимол, бисаболол и билобалиды), катехины, воск, крахмал, маннан, пентозан, β -ситостерин, жирные и эфирные масла [2]. На основе субстанций листьев гинкго двулопастного фармакологические предприятия Франции, Германии, США, Канады, Швеции, Словении, Индии, Вьетнама производят большое количество препаратов, из которых в Украине разрешены для применения такие, как танакан, билобил, мемоплант, гинкор форт, гинкор гель [3]. Препараты гинкго билоба улучшают кровообращение, повышают снабжение кислородом сердца, головного мозга и других органов, имеют антиоксидантное действие, снижают уровень артериального давления. В настоящее время гинкго билоба – одно из пяти наиболее продаваемых в мире лекарственных растений. Разработка биотехнологии получения и клонального размножения высокопродуктивных, устойчивых к заболеваниям чистых линий с помощью соматического эмбриогенеза является перспективным и активно изучаемым направлением.

Материалы и методы

Плоды и листовые экспланты были собраны в ноябре 2012г. в НБС им. Н.Н.Гришко НАН Украины. Семязачатки, освобожденные от саркотесты, промывали в проточной воде, высушивали и хранили в темноте при 4°C в течение 2-х месяцев.

Методики стерилизации эксплантов гинкго подбирали экспериментально для каждого типа исходного материала. Листья и черешки для каллусогенеза нарезали фрагментами по 1 см², промывали в проточной воде 30 мин, выдерживали в 70% этиловом спирте 1 мин и погружали на 4-5 мин в 0,1% HgCl₂. Затем отмывали стерильной дистиллированной водой и помещали на агаризованную среду МС [7] или LM [8] с различным содержанием гормонов.

Семена гинкго четыре раза обжигали пламенем, снимали жесткую оболочку (склеротесту), выдерживали в 70% этаноле (1 мин) и 0,1% сулеме (6-9 мин). Зародыши, отделенные от эн-

Результаты и обсуждения

Стерилизация эксплантов *G. biloba* вызвала значительные трудности, что отмечалось ранее другими авторами [9]. Нами было опробовано много вариантов обеззараживания исходного материала, используя в качестве основного дезинфектанта 0,1% HgCl₂ или 0,1-0,3% AgNO₃, а

Соматический эмбриогенез подробно изучен у самых распространенных представителей голосеменных - хвойных [4]. У гинкго двулопастного прямой и непрямой соматический эмбриогенез были получены из зрелых и незрелых зиготических зародышей при добавлении к культуральной среде разных комбинаций экзогенных гормонов [5]. Причем наиболее эффективным считается введение достаточно высокой концентрации цитокинина (10 μ M БАП) [6]. Однако еще не отработано получение растений-регенерантов из соматических зародышей, культивируемых на средах для развития и укоренения с различными комбинациями экзогенных гормонов, которые, очевидно, накапливаясь в большинстве случаев, приводят к остановке роста и последующей гибели зародыша.

Целью данной работы является разработка биотехнологии получения соматических зародышей гинкго двулопастного из зиготических зародышей на безгормональных средах и из каллусной культуры на различных модификациях сред, а также цитоморфологическая характеристика полученных эмбриокультур.

досперма, размещали на агаризованной среде МС и МС ½ макросолей с модификациями (1%, 2% глюкоза; pH5,0, pH5,6; аквариумная вода). Для каждого варианта сред использовали по три вида зиготических зародышей разной степени созревания: незрелый глобулярный, незрелый в стадии позднего эмбриогенеза и зрелый зародыш. Опыты проводили в трех повторностях.

Условия инкубирования: темный термостат, температура 26°C \pm 1°, световой блок, 24°C \pm 2°C.

Цитоморфологический анализ проводили на стереоскопическом микроскопе МБС-9 (ЛЮМО) и на временных неокрашенных влажных препаратах на световом тринокулярном микроскопе KONUS BIOREX-3 со встроенной фотокамерой при 400 \times увеличении. Морфологические изменения фиксировались цифровой фотокамерой Nikon Coolpix P100 (Япония).

как вспомогательные – 70% и 96% этанол, раствор KMnO₄, детергент (моющее средство Gala), стерильную дистиллированную воду. В целом, при обеззараживании сегментов молодой листовой пластинки и черешков листьев гинкго наилучшие результаты мы получили при их обра-

ботке 70% этиловым спиртом (1,5мин) и 0,1% раствором сулемы (4-5мин). При стерилизации семян гинкго наиболее эффективным оказался метод с применением обжига пламенем (семена на 30-40с окунали в 96% этанол, после чего проносили над пламенем, которое гасили через 3-5с, чтобы не повредить семенную оболочку [10]). Такую процедуру повторяли четырёхкратно, затем с семян снимали верхний плотный слой (склеротесту) и эндотесту и проводили их последующую стерилизацию 70% этанолом (1 мин) и 0,1% сулемой (6-9 мин). Затем зиготические зародыши отделяли от гаметофитных тканей и размещали на агаризованной среде различного состава. Применение этих методик стерилизации позволило получить 65-70% обеззараженных эксплантов гинкго.

После размещения эксплантов листьев и черешков на среде МС или LM с экзогенными гормонами (варианты комбинаций гормонов: 2 мг/л 2,4-Д; 1 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л кинетин; 0,5 мг/л НУК+0,2 мг/л 2,4-Д + 0,9мг/л БАП; 0,1 мг/л НУК + 0,1мг/ л кинетин) рост каллусных клеток наблюдался через 14-17 дней на всех вариантах. На фрагментах листовой пластины и отрезках черешков каллус нарастал вдоль линий надреза. Дедифференцированные клетки были рыхлые, легко распадающиеся и имели светло-желтую окраску. На среде МС с добавлением 0,1 мг/ л НУК + 0,1мг/ л кинетина наблюдался сильно оводненный каллус.

Активнее всего каллус образовывался на листовых эксплантах на среде LM+1мг/л НУК + 0,1мг/л кинетина (с частотой 94%). Средняя частота каллусогенеза составляла 88,4%. Субкультивирование активно пролиферирующего каллуса проводили на среде МС с добавлением 2мг/л БАП, 0,5 мг/л НУК, 0,5 мг/л ИУК и

0,2мг/л кинетина (среда VB). Периодичность пассирования составляла 25-30 суток.

Какие-либо модификации сред не приводили к образованию эмбрионного каллуса. Поэтому для инициации морфогенеза мы использовали среду МС со следующими комбинациями фитогормонов: 0,5 мг/л БАП + 0,5 мг/л кинетина; 0,75 мг/л БАП + 0,75 мг/л кинетина; 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л кинетина; 1 мг/л БАП+ 0,05 мг/л НУК; 1 мг/л кинетина+ 0,05 мг/л НУК; 2мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК; 2мг/л кинетина+ 0,1 мг/л НУК; 1 мг/л НУК; 0,1 мг/л НУК; 1мг/л ИМК; 0,1мг/л ИМК. После трех недель культивирования на всех средах наблюдалось подсыхание каллуса и остановка роста. После переноса со сред с 1 мг/л БАП+ 0,05 мг/л НУК и 1мг/л кинетина+ 0,05 мг/л НУК на среду без гормонов, при инкубации культуры на свету каллус приобретал способность к хлорофиллообразованию. Отдельные участки приобретали темно-зеленый цвет и на них появлялись морфогенные образования (на стадии глобулы и сердца). Однако дальнейшего развития зародышей не наблюдалось. На МС $\frac{1}{2}$ с добавлением 1 мг/л НУК и 0,1мг/л ИМК появлялись короткие утолщенные корешки. Добавление высокой концентрации цитокинина (до 3 мг/л) и повышение содержания сахарозы до 5 г/л с целью стимуляции морфогенеза не оправдало себя. Наблюдалось потемнение каллуса, замедление роста и постепенное его засыхание.

Для соматического эмбриогенеза из зиготических зародышей использовали зрелые и незрелые зародыши (рис.1), отделенные от гаметофита (эндосперма).

Следует отметить, что 50±1,3% из исследуемых семязачатков гинкго не содержали зародыша.

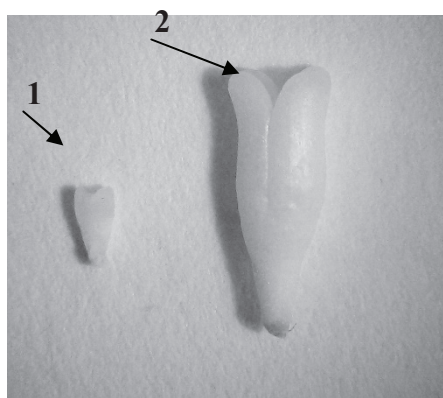


Рис. 1. Зиготические зародыши: незрелый (1), зрелый (2)

После стерилизации по описанной выше методике зародыши высаживали на следующие варианты сред (таблица 1):

Зародыши инкубировали в темноте (5 дней – при 10 °С, затем 1 сутки – при комнатной температуре, потом – 7 дней в термостате

при 26 °С), а в дальнейшем переносили на световой блок с температурой 22-24 °С, причем продолжительность освещения постепенно увеличивали с 3-5 часов (первые 5 дней) до 16 часов в сутки (с 19-го дня инкубации).

Признаки роста появились на 8-14-й день после высадки на всех вариантах сред. У 90% зрелых зиготических зародышей первичные боковые органы – семядоли раскрылись и появилась почечка (плюмула), а на гипокотиле появился зародышевый корешок. Незрелые зародыши вели себя по-разному. На вариантах сред №№ 2, 4, 6 и 7 проявилась тенденция к образованию неэмбриогенного каллуса, из чего можно сде-

лать вывод о том, что понижение рН среды до 5,0 стимулирует каллусогенез, как и приготовление питательной среды на основе воды из аквариума. На 18-й день на МС с половинным содержанием макроэлементов (№№ 5 и 6) на зародышах в стадии позднего эмбриогенеза появились зародышевые корешки. Эффективность роста клеток зависела от размера исходного зародыша. Маленькие глобулярные зародыши на всех вариантах сред лишь немного подрастали, а зародыш в стадии позднего эмбриогенеза активно формировал эмбриогенный и неэмбриогенный каллус, что согласуется с данными, представленными [6].

Таблица 1. Варианты сред для проращивания *G. biloba*

№№ вариантов среды	рН	Содержание глюкозы, (%)	Содержание макроэлементов МС, (%)	Основа
1(К)	5,6	2	100	H ₂ Odist
2	5,0	2	100	H ₂ Odist
3	5,6	1	100	H ₂ Odist
4	5,0	1	100	H ₂ Odist
5	5,6	2	50	H ₂ Odist
6	5,6	2	50	аквариумная вода
7	5,6	2	100	аквариумная вода

Дальнейшее культивирование на свету привело к позеленению отдельных групп клеток и образованию очагов эмбриогенного каллуса. На средах №№3 и 5 на зеленых участках появи-

лись зачатки соматических эмбрионов (рис. 2). На эмбрио генном каллусе размером 1-2 мм наблюдалось появление 2-3-х зародышей.

Цитологический анализ показал, что паренхимные клетки неэмбриогенного каллуса, исследуемые в фазе стационарного роста, имеют вытянутую форму, с четко визуализируемыми ядрами и включениями (рис. 3а).

Клетки расположены хаотично по отношению друг к другу. В эмбриогенном каллусе клетки более растянуты, структурированы и образуют эмбриональные трубки с примыкающими к ним кластерами эмбриональных глобул (рис. 3, б).

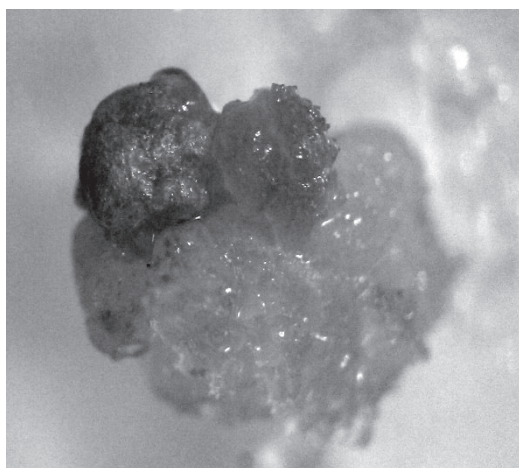
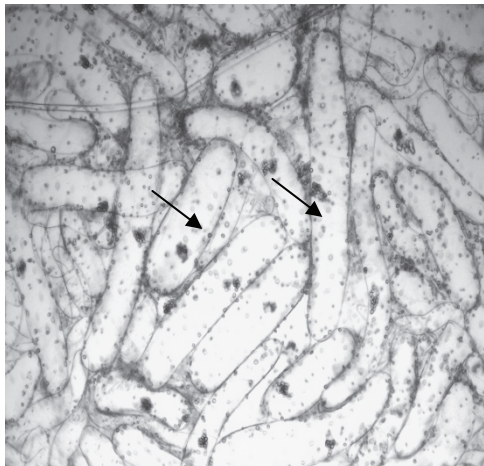
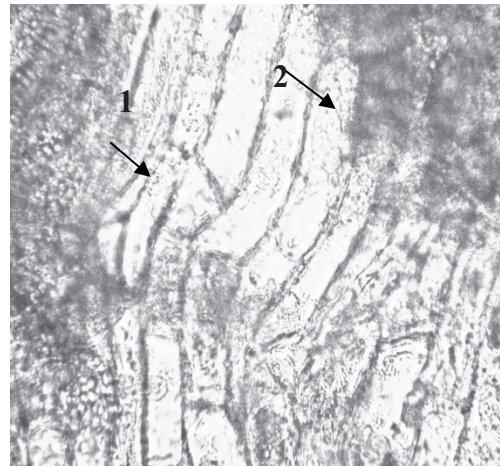


Рис. 2. Эмбриогенный каллус *Ginkgo biloba* через 30 суток культивирования. Стрелочками показаны пролиферирующий эмбриогенный каллус соматические зародыши распался на фрагменты, которые после пересадки продолжали активно расти



а



б

Рис. 3. Клетки неэмбриогенного (а) и эмбриогенного (б) каллуса гинкго двулопастного. 1 – эмбриональные трубки; 2 – эмбриональные глобулы

Выводы

Показано, что из незрелых зародышей гинкго двулопастного путем варьирования минерального состава и концентрации углеводного компонента культуральной среды можно получить соматические эмбрионы без использования экзогенных фитогормонов. Изменение содержания глюкозы с 2% на 1% и снижение концентрации макросолей в два раза инициирует образование соматических зародышей, которые в дальнейшем можно культивировать на среде для развития, содержащей фитогормоны. Использование безгормональной среды на стадии инициации эмбриогенеза уменьшает негативное дейст-

вие накапливающихся экзогенных фитогормонов, что позволит в дальнейшем повысить процент выживаемости полученных соматических эмбрионов.

Рыхлый каллус гинкго имеет очень низкий морфогенный потенциал, поэтому он образует морфогенные структуры только в результате культивирования на среде с добавлением гормонов. Внесение 1 мг/л БАП+ 0,05 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина+ 0,05 мг/л НУК при инкубации на свету стимулирует появление соматических зародышей, а 1 мг/л НУК и 0,1мг/л ИМК инициирует появление ризогенных образований.

Литература

1. Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. – М.: Мир., 1990. – Т.1. – 348 с.
2. Зузук Б. М., Куцик Р.В., Томчук Ю., Дармограй Р. Е. Гинкго билоба (*Ginkgo biloba L.*) (Аналитический обзор) // Провизор. – 2001. – № 19, 21-23.
3. Державний реєстр лікарських засобів України. <http://www.drlz.kiev.ua>.
4. Tautorus T.E., Fowke L.C., Dunstan D.I. Somatic embryogenesis in conifers // Can. J. Bot. – 1991. – Vol. 69. – P. 1873-1899.
5. Choi P.-S., Cho D.-Y., Soh W.-Y. Shoot Organogenesis from Immature Zygotic Embryo Cultures of *Ginkgo biloba* // Biol. Plantarum. – 2003. – Vol. 47, №2. – P. 309-312.
6. Laurain D., Chenieux J.-C., Tremouillaux-Guiller J. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Ginkgo biloba* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1996. – Vol. 44. – P. 19-24.
7. Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473-497.
8. Litvay J.D., Johnson M.A., Verma D., Einspahr D., Weyrauch K. Conifer suspension culture medium development using analytical data from developing needles // IPG Technical paper series. – 1981. – №115. – IPC, Appleton, Wisconsin.
9. Гузь М.М., Остудімов А.О. Особливості розмноження гінкго дволопатевого *in vitro* // Науковий вісник НЛТУ України. – 2008. – Вип. 18.7. – С. 7-16.
10. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических растений *in vitro*. – К.: Наук. Думка, 2008. – 560 с.

BULKO O.V., LIOSHINA L.G.

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry NAS of Ukraine
Ukraine, 02160, Kyiv, Kharkivske hwy, 50, e-mail: obulko@mail.ru*

SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM ZYGOTIC EMBRYOS AND CALLUS *GINKGO BILOBA* L.

Aims. Development of biotechnology *Ginkgo biloba* L. somatic embryos from zygotic embryos on hormone-free media and from callus culture on different modifications of media. **Methods.** Immature zygotic embryos and callus were cultured on different media modifications (pH, glucose content makrosalt) in the light at 24±2°C for one month to induce embryogenesis. At various stages of development the cytological analysis was carried. **Results.** We have shown that by choosing the media (the glucose reduction to 1% and a decrease makrosalt twice) from immature embryos of somatic embryos can be obtained without the use of exogenous phytohormones. Adding to the callus culture 1 mg/l BA +0.05 mg/l NAA and 1 mg/l kinetin+0.05 mg/l NAA, incubated in the light can stimulate the formation of somatic embryos, and 1mg/l NAA and 0,1mg/l IBA initiates rhizogenesis. **Conclusions.** From immature embryos of *Ginkgo biloba* can be obtained somatic embryos without the exogenous phytohormones using different media compounds. Formation somatic embryos in callus ginkgo is possible only on the media with hormones.

Key words: *Ginkgo biloba* L., somatic embryogenesis, zygotic embryos, callus.

ГЕРАСИМЕНКО И.М., ШЕЛУДЬКО Ю.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: ysheludko@ukr.net*

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ТРАНЗИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ИМПОРТ РЕПОРТЕРНОГО БЕЛКА В ХЛОРОПЛАСТЫ С РАЗНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ

Использование растений в качестве систем для синтеза гетерологических белков имеет ряд важных преимуществ. Прежде всего это возможность пост-трансляционных модификаций эукариотического типа, относительно низкая вероятность загрязнения готового продукта патогенами и токсинами, опасными для человека, а также сравнительно низкая себестоимость производства [1]. Основным недостатком генетически-модифицированных растений с точки зрения биотехнологии является обычно низкое содержание целевого белка в результате невысокого уровня экспрессии трансгена и/или действия растительных протеаз. Разработаны подходы, позволяющие увеличить количество накапливающегося белка за счет оптимизации разных процессов: трансформации растений и интеграции трансгена, его транскрипции, трансляции и обеспечения стабильности конечного продукта [2]. Подбирая компартмент растительной клетки, оптимальный для накопления гетерологического белка, часто удается значительно повысить стабильность и, следовательно, содержание целевого продукта [2, 3].

Белки, которые кодируются ядерными генами и функционируют в хлоропластах, синтезируются в виде предшественников, имеющих

на N-конце так называемый транзитный пептид, который удаляется в ходе транспорта. Транзитные пептиды после фосфорилирования цитоплазматическими протеинкиназами в комплексе с шаперонами взаимодействуют с системами транслокации через мембраны хлоропластов, которые обеспечивают энергозависимый транспорт внутрь органеллы [4]. Присоединение к N-концу белка гетерологического транзитного пептида приводит к накоплению целевого продукта внутри хлоропластов [5], однако есть данные о том, что использование аналогичных сигналов внутриклеточного транспорта из разных видов может значительно влиять на уровень накопления рекомбинантного белка [3, 6].

Для накопления рекомбинантных белков в хлоропластах нами были выбраны два транзитных пептида (предшественников малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы *Nicotiana tabacum* и активазы рубиско *Spinacia oleracea*). Была подтверждена их способность обеспечивать транспорт репортерного зеленого флуоресцентного белка в хлоропласты *N. excelsior* и показана различная эффективность этого процесса при помощи исследованных транзитных пептидов.

Материалы и методы

Для подбора транзитных пептидов использовали информацию о внутриклеточной локализации белков, полученную из базы данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Избранные нуклеотидные последовательности (кодирующие аминокислоты 1-57 предшественника малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum*, Асс.Но. Р69249, и аминокислоты 1-58 предшественника активазы рубиско *Spinacia oleracea*, Асс.Но. Р10871), фланкированные сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции *ClaI* и *NcoI*, были синтезированы (GenScript, США) и встроены в векторные конструкции, созданные на основе pBIN19, в одной рамке считывания с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) под контролем 35S промотора ВМЦК (Рис.1). В последовательность, кодирующую транзитный пептид предшественника малой субъединицы рубиско *N. tabacum*, была введена мутация G→C

в предпоследней позиции для создания сайта *NcoI*. В работе использовали ЭР и Т4 ДНК лигазу New England Biolabs (США) и наборы для выделения плазмидной ДНК (NucleoSpin Plasmid) и экстракции ДНК из агарозных гелей (NucleoSpin Extract) (Macherey-Nagel, ФРГ). Конструирование векторных молекул проводили с использованием стандартных методик [7] в штамме *E. coli* XL1Blue. Готовые генетические конструкции переносили в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Транзientную экспрессию проводили в листьях тепличных растений *N. excelsior* с использованием супрессора замолкания генов p19 вируса кустистой карликовости томата (Tomato bushy stunt virus) по описанной ранее методике [8]. Интенсивность флуоресценции GFP на поверхности листьев измеряли с помощью спектрофлуориметра Флюорат-02 (Люмэкс, Россия).

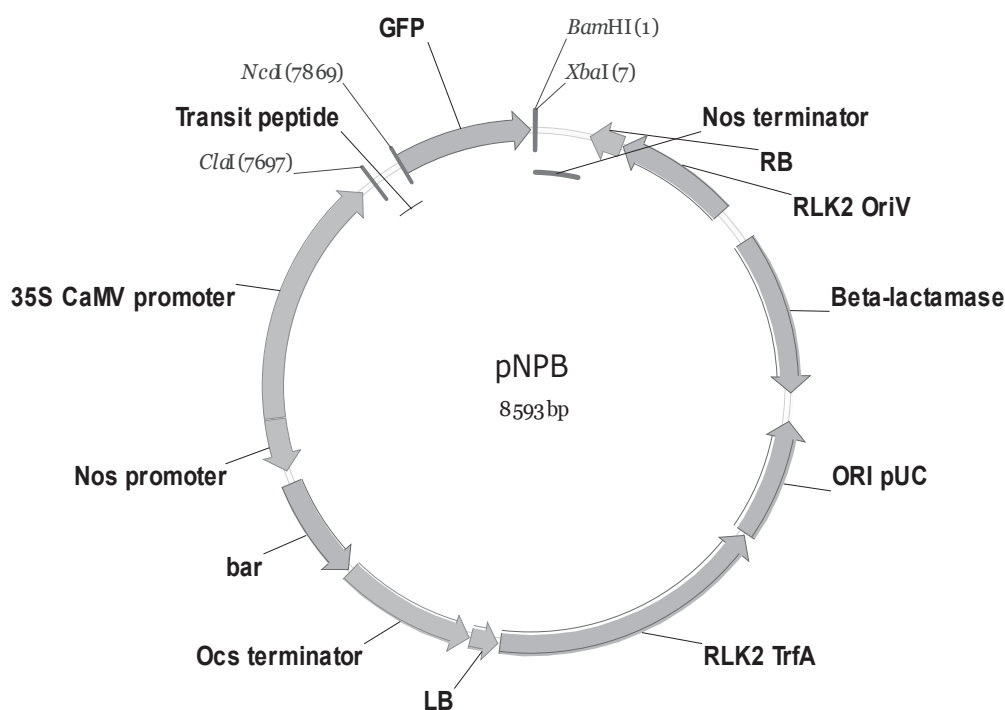


Рис. 1. Схема генетических конструкций для накопления целевых белков в хлоропластах. Transit peptide – последовательность, кодирующая транзитный пептид (tpRbs - предшественника малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum* в конструкции pNPB0107 или tpRca - предшественника активазы рубиско *Spinacia oleracea* в конструкции pNPB0108)

Результаты и обсуждение

Последовательности, кодирующие транзитные пептиды предшественников малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum* (tpRbs) и активазы рубиско *Spinacia oleracea* (tpRca), были слиты в одной рамке считывания с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP). Полученные гены были транзientно экспрессированы в

листьях *N. excelsior* для подтверждения способности избранных транзитных пептидов обеспечивать транспорт рекомбинантных белков в хлоропласты. В качестве контроля использовали ген GFP без транспортных сигналов. В соответствии с литературными данными [8], интенсивность флуоресценции контрольного репортерно-

го белка достигла максимума на 4-5 день после инфильтрации и в дальнейшем постепенно снижалась. Сходную динамику накопления репортерного белка наблюдали и при использовании гена *tpRbs::GFP*, хотя интенсивность была выше по сравнению с контролем. Снижение интенсивности флуоресценции происходило медленнее, чем в контроле, и до конца периода измерений она была выше при экспрессии гена *tpRbs::GFP* (рис. 2).

Существенные отличия динамики изменения флуоресценции репортера наблюдали при экспрессии гена *tpRca::GFP*. Если в первые четыре дня после инфильтрации интенсивность флуоресценции быстро нарастала, как и при использовании других генов, то впоследствии снижение интенсивности флуоресценции происходило значительно медленнее (рис. 2). До четвертого дня интенсивность флуоресценции продукта гена *tpRca::GFP* была ниже, чем *tpRbs::GFP*, а на пятый день соотношение стало обратным. В дальнейшем интенсивность флуоресценции листьев, экспрессирующих *tpRca::GFP*, была выше, чем при использовании как контрольного гена, так и *tpRbs::GFP*. Заметный уровень флуоресценции при экспрессии *tpRca::GFP* сохранялся даже на 50-й день после

инфильтрации, несмотря на старение листьев.

Микроскопическое исследование клеток, транзитно экспрессирующих изучаемые гены на 5-ый день после инфильтрации, показало, что оба транзитных пептида обеспечивают транспорт репортерного белка в хлоропласты. Однако при экспрессии гена *tpRbs::GFP* зеленая флуоресценция наблюдалась не только в хлоропластах, но и в цитоплазме, в отличие от продукта гена *tpRca::GFP*, который обнаруживается только в пластидах.

В проведенных опытах репортерный белок синтезировался в результате транзитной экспрессии генов, которая происходит в течение нескольких дней (наиболее активно как правило до 4-го дня [9]), о чем свидетельствует быстрое увеличение интенсивности флуоресценции в первые 4-5 дней после инфильтрации. В дальнейшем уровень транзитной экспрессии снижается и накопленный белок постепенно разрушается под действием протеаз. Замедленное снижение интенсивности флуоресценции листьев при экспрессии *tpRca::GFP* объясняется, по нашему мнению, более эффективным импортом репортера в хлоропласты, где его стабильность выше, чем в цитоплазме.

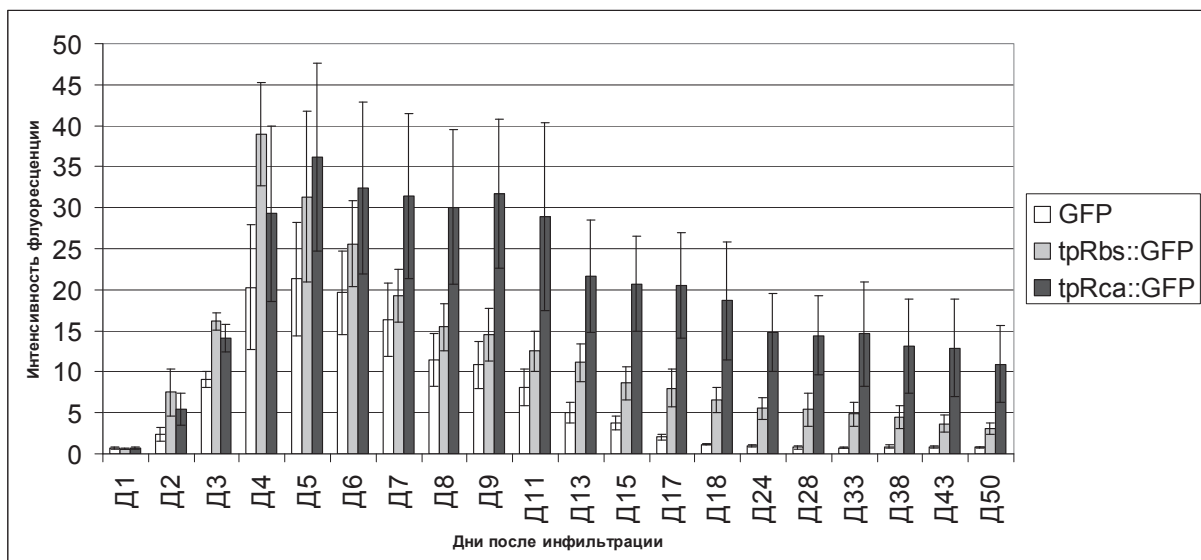


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции листьев *N. excelsior*, транзитно экспрессирующих гены зеленого флуоресцентного белка без сигналов внутриклеточного транспорта (GFP) и с транзитными пептидами предшественников малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum* (*tpRbs::GFP*) и активазы рубиско *Spinacia oleracea* (*tpRca::GFP*). На диаграмме представлены доверительные интервалы ($P=0,95$)

По литературным данным, транзитные пептиды можно разделить на группы в зависимости от их способности обеспечивать импорт белков в хлоропласты в листьях разного возраста

[10]. Возможно, неполный транспорт репортера в хлоропласты при помощи *tpRbs* в наших опытах можно объяснить неоптимальным для этого транзитного пептида возрастом листьев,

однако это предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Аминокислотные последовательности транзитных пептидов не обнаруживают заметной гомологии, однако имеют сходные физико-химические свойства и, предположительно, пространственные структуры [11]. N-концевой участок транзитных пептидов незаряжен, остальная часть включает несколько положительно заряженных аминокислотных остатков. Вся последовательность обогащена гидроксильными аминокислотами. В водной среде транзитные пептиды не структурированы, при взаимодействии с мембранами пластид частично приобретают α -спиральную конформацию. Предполагается, взаимодействию транзитных пептидов с

фосфо- и гликолипидами пластидных мембран способствуют положительно заряженные и гидроксильные аминокислотные остатки [11]. Возможно, trRca обеспечивает более эффективный импорт репортера в пластиды благодаря высокому даже по сравнению с другими транзитными пептидами содержанию таких аминокислот (рис. 3).

Созданные генетические конструкции позволяют заменять репортерный ген GFP на другие последовательности (с помощью ЭР *NcoI* - *BamHI*, *XbaI*, рис. 1), что позволяет проводить подбор способа экспрессии, более эффективного для требуемых видов растений и целевых белков.

ats1A MASSMLSSATMVASP--AQATMVAPFNGLKSSAAFPATRKANNDITSITSN-GGRVNC--- 14/4
 ats1B MASSMLSSAAVVTSP--AQATMVAPFTGLKSSAFPVTRKANNDITSITSN-GGRVSC--- 17/4
 rbsNt MASSVLSSAAVATRSNVAQANMVAPFTGLKSAASFPVSRKQNLDTIASN-GGRVQS--- 14/5
 rcaSo MATAV-STVGAATR⁺APLN⁺NGSSAGASVPTSGFLGSSL⁺KKHTNV-RFPSSSR⁺TTSM⁺TVKA- 19/7
 rcaAt MAAAV-STVGAIN⁺RAPL⁺SLNGSGSGAV-SAPASTFLG-KKVVTVSR⁺FQSN⁺KKNSG⁺SFK⁺VL 13/7
 rcaOs MAAAFSSTVGAPASTPTNFLGKKL⁺KKQ-VTSAVNYHG-KS-SNINRFK⁺VMA----- 10/8

Рис. 3. Аминокислотные последовательности транзитных пептидов предшественников малой субъединицы рубиско *Arabidopsis thaliana* (гены *ats1A* и *ats1B*) и *Nicotiana tabacum* (*rbsNt*); активазы рубиско *Spinacia oleracea* (*rcaSo*), *A. thaliana* (*rcaAt*) и *Oryza sativa* (*rcaOs*). Указано количество гидроксильных (подчеркнуты) и положительно заряженных (выделены черным) аминокислот

Выводы

Созданы генетические конструкции, позволяющие осуществлять накопление целевого белка в хлоропластах при помощи двух разных транзитных пептидов - предшественников малой субъединицы рубиско *Nicotiana tabacum* и активазы рубиско *Spinacia oleracea*. Продемонстри-

рована различная эффективность импорта в органеллы при использовании двух исследованных транзитных пептидов. Созданные векторные конструкции позволят проводить подбор способа экспрессии, более эффективного для требуемых видов растений и целевых белков.

Работа выполнялась при поддержке гранта НАНУ УкрИНТЭИ № 0110U006061.

Литература

1. Yusibov V., Streatfield S.J., Kushnir N. Clinical development of plant-produced recombinant pharmaceuticals // Human Vaccines – 2011. – Vol. 7. – P. 313-321.
2. Streatfield S.J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants // Plant Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 5. – P. 2–15.
3. Gils M., Kandzia R., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system // Plant Biotechnol. J. – 2005. – Vol. 3. – P. 613-620.
4. Jarvis P, Soll J. Toc, Tic, and chloroplast protein import // Biochim. Biophys. Acta – 2001. – Vol. 1541. – P. 64–79.
5. Gnanasambandam A., Polkinghorne I.G., Birch R.G. Heterologous signals allow efficient targeting of a nuclear-encoded fusion protein to plastids and endoplasmic reticulum in diverse plant species // Plant Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 5. – P. 290–296.
6. Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M., Sheludko Y.V., Olevinskaya Z.M., Spivak N.Y., Kuchuk N.V. Production of human interferon alfa 2b in plants of *Nicotiana excelsior* by *Agrobacterium*-mediated transient expression // Tsitol. Genet. – 2010. – Vol. 44. – P. 60-64.
7. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 521с.
8. Sheludko Y.V., Sindarovska Y.R., Gerasymenko I.M., Bannikova M.A., Kuchuk N.V. Comparison of several

- Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression // Biotechnol. Bioeng. – 2007. – Vol. 96. – P. 608-614.
9. Sheludko Y.V. *Agrobacterium*-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants // Recent Patents on Biotechnology. – 2008. – Vol. 2. – P. 198-208.
 10. Teng Y.-S., Chan P.-T., Li H.-M. Differential Age-Dependent Import Regulation by Signal Peptides // PLOS Biol. – 2012. – Vol. 10. – P. 1-14.
 11. Bruce B.D. Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution // Trends Cell Biol. – 2000. – Vol. 10. – P. 440-447.

GERASYMENKO I.M., SHELUDKO Y.V.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str 148, e-mail: ysheludko@ukr.net*

HETEROLOGOUS TRANSIT PEPTIDES ALLOW FOR REPORTER PROTEIN IMPORT INTO CHLOROPLASTS WITH VARYING EFFICIENCY

Aim. The stability of recombinant proteins in plants can be improved by targeting into optimal cell compartment. Two transit peptides (TPs), of RuBisCO small subunit from *Nicotiana tabacum* (tpRbs), and RuBisCO activase from *Spinacia oleracea* (tpRca), were tested for their ability to insure chloroplast import and increase stability of a reporter GFP. **Methods.** The sequences encoding TPs were fused with the reporter GFP gene under control of 35S CaMV promoter. The obtained recombinant genes were transiently expressed in *Nicotiana excelsior* leaves. The level of reporter protein was estimated by surface fluorescence, and GFP subcellular localization was investigated microscopically. **Results.** Using of both TPs allowed for reporter protein accumulation at higher levels than with control GFP gene without targeting signals. Chloroplast import efficiency was better with tpRca than tpRbs, that resulted in improved reporter stability after *tpRca::GFP* gene expression. **Conclusions.** Genetic vectors containing TPs with different efficiency were constructed. They can be used to select the best way for production of valuable proteins in plants.

Key words: plant genetic transformation, subcellular localization, transit peptide.

ГОНЧАРУК О.М.¹, БАВОЛ А.В.¹, МОРГУН Б.В.², ДУБРОВНА О.В.¹

¹*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук 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*

AGROBACTERIUM-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ШЛЯХОМ ІНОКУЛЯЦІЇ БАЗАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ ПАГОНА

На сьогодні, біотехнологічні рослини пшениці, стійкі до стресових чинників, отримують, в основному, методами генетичної інженерії та клітинної селекції. Генетична модифікація рослин може здійснюватись за допомогою *Agrobacterium*- опосередкованого методу або шляхом прямого перенесення генів. Найбільш поширеним методом для рослин є генетична трансформація з використанням агробактерій *Agrobacterium* для перенесення екзогенних Т-ДНК в рослинну клітину. Незважаючи на те, що такий підхід широко застосовується для більшості сільськогосподарських культур, у зернових спочатку не було отримано успіхів, оскільки ці культури були, природно, не сприйнятливі до *Agrobacterium* [1, 2]. Тим не менш, вдосконалення технологій *Agrobacterium*-

опосередкованої трансформації до середини 1990-х років, призвело до бажаної генетичної модифікації пшениці [3-5].

Цей метод має декілька переваг у порівнянні з іншими підходами: в геном реципієнта включається обмежене число копій генів, можливість передачі відносно великих генетичних конструкцій з мінімальною її перебудовою, простота методик та загалом менша вартість. Очікується, що *Agrobacterium* буде використовуватися в якості надійного і недорогого вектора для доставки екзогенних генів у геном пшениці. Проте, використання такого підходу ускладнене тим, що для його успішного застосування існуючі методики потребують вдосконалення та адаптації для роботи з конкретним рослинним об'єктом. Розробка відповідного способу

Agrobacterium-опосередкованої трансформації дуже складне завдання, тому що важливо розуміти роль усіх чинників, які впливають на доставку Т-ДНК в клітини, з яких в подальшому буде здійснюватися регенерація рослин. Після отримання фертильних рослин, необхідні подальші аналізи для перевірки інтеграції та стабільності Т-ДНК з метою підвищення ефективності трансформації.

Визначено декілька факторів, які впливають на перенесення Т-ДНК у клітини рослин: первинний експлант, штам *Agrobacterium*, векторна конструкція, щільність суспензії агробактеріальних клітин, склад поживних середовищ, умови трансформації (температура і час прекультивування, інокуляції та кокультивування), наявність поверхнево-активних речовин або індукційних агентів при інокуляції та кокультивуванні, антибіотики або селективні маркери та ін. [6-9].

Одним з найбільш визначальних факторів, що впливає на ефективність *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин є вибір відповідного типу експланта. Використання в

якості експлантів базальної частини пагонів пшениці має принципові переваги в порівнянні з традиційними типами експлантів, такими як незрілі зародки та ембріогенний калюс [10]. По-перше, при використанні базальної частини пагонів відсутня необхідність індукції калюсу, внаслідок чого не виникає ефект соматональної мінливості. Отримані рослини-регенеранти характеризуються нормальним розвитком і повністю відповідають характеристикам сорту. Цей метод дозволяє використовувати для трансформації широкий перелік сортів, навіть тих, в яких ускладнений процес індукції калюсу та регенерації рослин. По-друге, цей тип експланта характеризується зручністю у використанні, оскільки його отримання не обмежено сезонами року і підготовка до проведення трансформації не потребує багато часу.

У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідження ефективності використання базальної частини пагона пшениці в якості експланта для подальшої *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та отримання канаміцин-стійких рослин.

Матеріали і методи

В досліджах використовувався сучасний високопродуктивний сорт озимої пшениці Подолянка, створений в Інституті фізіології рослин і генетика НАН України. Насіння пшениці було стерилізовано шляхом інкубації в 70% розчині етанолу протягом 1 хв, потім 2%-вому розчині КМnO₄ - 3 хв, і в подальшому 10 хв в 2%-вому розчині гіпохлориту натрію. Насіння тричі промивали стерильною дистильованою водою. Стерилізоване насіння пророщували при 25о С на

світлі протягом 2-3 діб на модифікованому середовищі МС.

Для трансформації використовували штам GV 2260 з плазмідом pCB002 (рис. 1), яка містить гени *gus* – ген ферменту β-глюкуронідази та *npt II* – ген неоміцинофосфотрансферази II *E. coli*, який надає стійкість до антибіотиків групи аміноглікозидів, таких як канаміцин, неоміцин та паромоміцин.

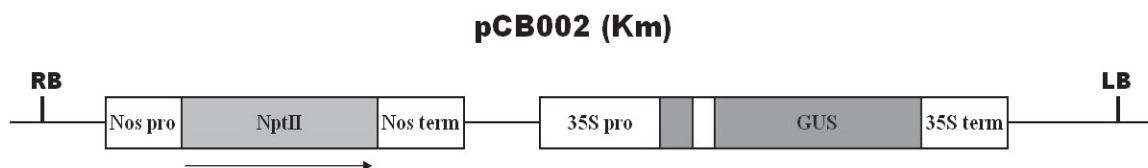


Рис. 1. Схема області Т-ДНК векторної конструкції pCB002 (штам GV2260)

Суспензію клітин *A. tumefaciens* отримували за культивування на рідкому середовищі LB з додаванням рифампіцину 50 мг/л і канаміцину 100 мг/л на ротатійному шейкері протягом 18 год. Для інокуляції експлантів використовували суспензію клітин агробактерій з оптичною щільністю OD₆₆₀=0,8. Культура була осаджена центрифугуванням при 5000 об/хв протягом 5 хв. Потім її ресуспендували у МС середовище (без фітогормонів), що містило 100 мкМ ацетосірінгону, яке і використовували для інокуляції.

В якості селективного агента застосовували антибіотик канаміцин в концентрації 100 мг/л.

Екстракцію ДНК проводили з молодих листків за використання комплекту реагентів “ДНК–сорб-С” (ФБУН ЦНИИС Роспотребнадзора, Росія). Концентрацію та чистоту ДНК визначали спектрофотометрично. Молекулярно-генетичний аналіз стійких до канаміцину форм проводили методом ПЛР. Наявність гена *npt II* визначали з використанням праймерів 5'-CCTGAATGAACTCCAGGAGGAGGCA-3' (F) та

5'-GCTCTAGATCC- AGAGTCCCGCTCAGAAG - 3'(R). ПЛР проводилась на ампліфікаторі Mastercycler Personal 5332 Eppendorf згідно наступної програми: початкова денатурація при

94° С 4 хв; 35 циклів (денатурація 94° С - 30 с, відпал 54° С - 30 с, елонгація 72° С - 35 с) та фінальна елонгація 72° С 10 хв. Очікувана довжина амплікона складає 649 п.н.

Результати та обговорення

Коли колеоптіль досягав довжини 1-2 см, його відрізали стерильним скальпелем під кутом 45° у напрямку повздовжньої осі. Потім відрізали верхню частину в горизонтальному напрямку і таким чином залишалась базальна частина, що містить апікальну меристему пагона, яку і піддавали інокуляції агробактерією. Для трансформації на зріз наносили 2-4 мкл ресуспендованої *A. tumefaciens*. Всього було використано 400 на-

сінин. Після трансформації вижило близько 60% проростків (рис. 2). Отримані рослини висаджували в стерильні чашки Петрі на фільтрувальний папір до появи нових листків, а в подальшому пересаджували в горщики. На стадії 5-го–7-го листка, проводили інсуфляцію сіянців розчином, що містить 100 мг/л канаміцину. Після обробки молодих листків вижило 7 рослин, які мали зелене забарвлення та не сповільнювали ріст.

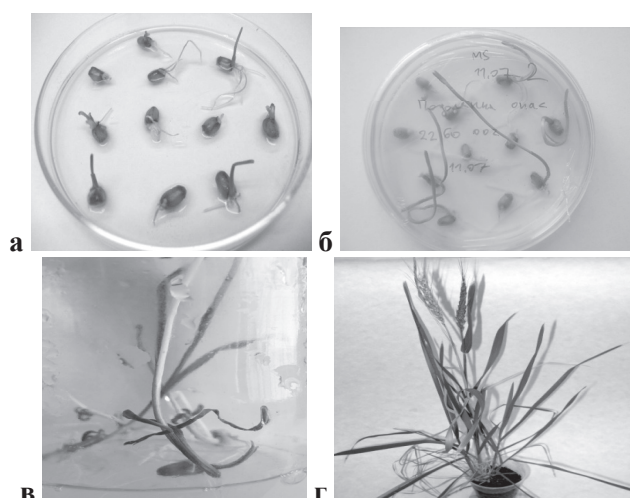


Рис. 2. Етапи *Agrobacterium*–опосередкованої трансформації клітин базальної частини пагона: а – інокуляція базальної частини пагона; б - відростання листків; в - селекція на середовищі з канаміцином; г- отримання насінневого покоління T₁

Крім того, після інокуляції та відростання листя частина рослин була висаджена на поживне середовище з 100 мг/л канаміцину та культивувалися на ньому протягом 2-4 тижнів (1-2 пасажі). Канаміцин-стійкими вважались рослини, що за дії селективного чинника зберігали зелене

забарвлення. У рослин, які не набули стійкості до антибіотика спостерігалось знебарвлення тканин внаслідок руйнування хлоропластів, вони повільно росли, загалом були менш розвинені (рис. 3.а) та поступово гинули. На середовищі з канаміцином було виділено 5 зелених рослин.

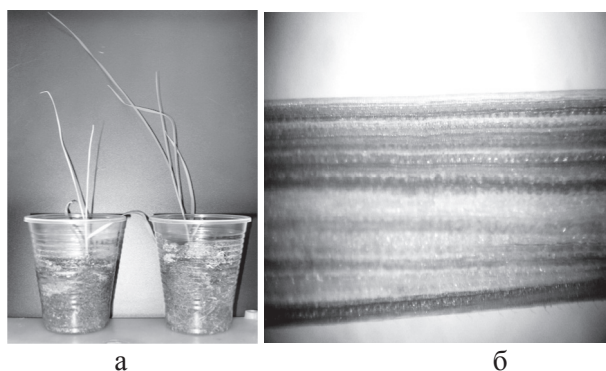


Рис. 3. Стійкі та нестійкі до канаміцину рослини пшениці; а – рослини отримані після селекції на середовищі з канаміцином: зліва – безхлорофільна рослина, справа –рослина зеленого кольору, з нормальною швидкістю росту; б – листок рослини-химери (збільшення x35)

Всі отримані зелені рослини для яровизації витримували 45 днів за температури 4° С, а в подальшому вирощували в умовах вегетаційного експерименту для отримання насіннєвого покоління.

Також було отримано рослини, які характеризувались наявністю тканин двох типів: стійких до канаміцину, які утворилися після перенесення екзогенної ДНК, та нестійких до селективного агента, в яких не відбулося вбудовування

чужорідної ДНК. За дії канаміцину, такі химерні рослини набували строкатого кольору: ділянки зеленого кольору змінювались безхлорофільними секторами (Рис. 3. б).

Після добору зелених рослин проводили їх ПЛР-аналіз з використанням праймерів, специфічних до селективного гена *npt II*. Результати ампліфікації для 12 зразків ДНК, виділених із отриманих рослин, що були інокульовані штамом GV 2260 приведені на рис. 4.

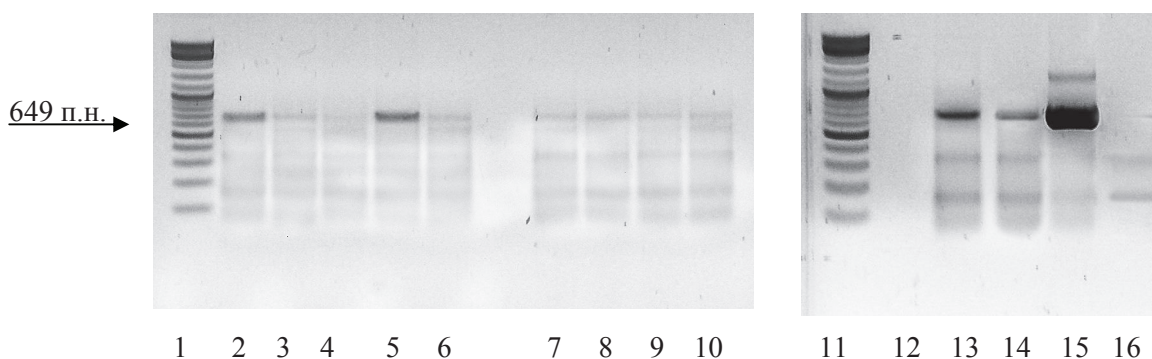


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ПЛР за використання праймерів, специфічних до гена *npt II* (очікувана довжина амплікона 649 п.н.): 1, 11 – ДНК-маркер GeneRuler 100bp DNA Ladder; 2-6 – ДНК рослин, стійких до канаміцину (отриманих на селективному середовищі); 7-10, 12-14 – ДНК рослин, отриманих за добору методом інсуфляції; 15 – позитивний контроль (GV 2260); 16 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої пшениці)

Загалом серед 12-ти проаналізованих зразків тільки у чотирьох підтверджено наявність гена *npt II*. Нами також контролювалася відсутність домішок *A. tumefaciens* у досліджуваних зразках за геном *vir C*. За результатами аналізу у зразках ДНК отриманих рослин показано відсутність агробактеріального зараження.

Слід зазначити, що можливість отримання трансформованих рослин пшениці з використанням як експланта базальної частини пагона вперше була показана у роботі Зао і співавторів [11], у якій дослідники підтвердили трансгенний статус та успадковування перенесених генів у насіннєвому поколінні T₂. Зокрема, Чен та Дейл [12] вважають, що таким способом можливо отримати трансформанти на підставі наступних міркувань: 1) *A. tumefaciens* переносить трансгени не тільки в геном клітин апікальної меристеми, а й в геном вже диференційованих клітин; 2) трансгени, інтегровані у вже диференційовані клітини, можуть визначити тільки фенотип нижньої частини зрілих рослин, проте не верхньої

частини рослини; 3) трансгени, інтегровані в геном ще недиференційованих клітин меристеми пагона, з якої в подальшому формується колос, визначають фенотип верхньої частини зрілої рослини; 4) оскільки статеві клітини генеративних органів (яйцеклітини і пилок) утворюються з меристеми верхнього інтеркалярного вузла, то в подальшому при заплідненні утворюється зигота, що містить трансгени. Таким чином, насіння T₁ і наступні покоління, не повинні бути химерами, а істинними трансформантами.

Отримані нами дані свідчать про те, що інокуляція базальної частини пагонів пшениці суспензією клітин *A. tumefaciens*, може використовуватися для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації м'якої пшениці. Встановлено, що використання методу інсуфляції дозволяє за короткий період вибраковувати нетрансформовані форми, оскільки вони швидко гинуть. Методом ПЛР підтверджено трансгенний статус чотирьох отриманих рослин.

Література

1. Potrykus I. Gene transfer to cereals: as assessment // Biotechnology. – 1990. – Vol. 8. – P. 535-542.
2. Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology (Annual Review of Plant Biology since 2002). – 1991. – Vol. 42. – P.

205-225.

3. Cheng M., Fry J., Pang S., Zhou H., Horinaka C., Duncan D., Conner T., Wan Y. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 115. – P. 971–980.
4. Peters N., Ackerman S. Davis E.A. A modular vector for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // Plant Molecular Biology Reporter. –1999. – Vol. 17. – P. 323-331.
5. Jones, H., Wilkinson M., Doherty A., Wu H. High throughput *Agrobacterium* transformation of wheat: a tool for functional genomics, In: Wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November - 2 December 2005, Mar Del Plata, Argentina, H.T. Buck, J.E. Nisi & N. Salomon. (Ed.). – 2007. – P. 693-699.
6. Jones H., Doherty A., Wu. H. Review of methodologies and a protocol for the *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat // Plant methods. – 2005. – Vol. 1. – №5.
7. Bhalla P.L., Ottenhof H.H., Singh, M.B. Wheat transformation—an update of recent progress // Euphytica. – 2006. – Vol. 149. – P. 353-366.
8. Opabode J.T. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency // Biotechnology and Molecular Biology Review. – 2006. – Vol. 1. – P. 12-20.
9. Kumléhn, J., Hensel G. Genetic transformation technology in the triticeae // Breeding Science. – 2009. – Vol. 59. – P. 553-560.
10. Hess D., Dressler K., Nimmrichter R. Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium tumefaciens* into the spikelets of wheat (*Triticum Aestivum* L) // Plant Sci. – 1990. – Vol. 72. – P. 233–244.
11. Zhao T.J., Zhao S.Y., Chen H.M., Zhao, Q.Z., Hu, Z.M., Hou B.K., Xia, G.M. Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling // Plant Cell Reports. – 2006. – Vol. 25. – P. 1199-1204.
12. Chen D., Dale P. A comparison of methods for delivering DNA to wheat: the application of wheat dwarf virus DNA to seeds with exposed apical meristems // Transgenic Res. – 1992. – Vol. 1. – P. 93–100.

GONCHARUK O.M.¹, **BAVOL A. V.**¹, **MORGUN B. V.**², **DUBROVNA O. V.**¹

¹*Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine*

03022, 31/17 Vasylkivska St., 03680, Kyiv, Ukraine, e-mail: dubrovny@ukr.net

²*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NAS of Ukraine*

148 Acad. Zabolotnoho St., 03680, Kyiv, Ukraine

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF THE BASAL PORTION OF WHEAT SEADLING

Aims. The aim of our work was to study the effectiveness of the basal portion of wheat seedlings as explants for *Agrobacterium*-mediated transformation. **Methods.** We has been used the method of *Agrobacterium*-mediated transformation and PCR to display results. **Results.** As a result of genetic transformation we obtained resistant to kanamycin plants. Transgenic status of the four obtained forms was confirmed by PCR. **Conclusions.** The data suggest that basal portion of wheat seedlings can be used for *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat.

Key words: *Triticum aestivum* L., *Agrobacterium*-mediated transformation, wheat.

ГУЛЯЄВА Г.Б., БОГДАН М.М

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: prasya_2010@ukr.net

ВПЛИВ ОБРОБКИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КОМПОНЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Сучасні сорти рослин мають досить обмежений потенціал стійкості проти шкідливих організмів. Тому захист рослин є невід'ємним компонентом агротехнології та може підвищувати врожайність сільськогосподарських культур на 23 % і більше [5, 7, 9]. Найвищу рентабе-

льність можна отримати, застосовуючи препарати, що діють проти комплексу хвороб [5, 7].

Відомо три групи механізмів стійкості рослин до стресових факторів: 1) стрес-індуковане новоутворення макромолекул із захисними властивостями, 2) синтез спільних осмолітів з мно-

жинними протекторними функціями, 3) антиоксидантні системи [3, 8]. Однією з ранніх відповідей на дію стресових факторів є утворення на клітинній поверхні активних форм кисню (АФК), зокрема супероксиду і пероксиду водню [8, 12]. Клітинною системою захисту від цих радикалів і їх похідних є антиоксидантна система. До антиоксидантних ферментів відносяться супероксидисмутази, каталази, пероксидази та ін. Їх синтез індукується у відповідь на підвищення рівня вільних радикалів [8]. За літературними даними, пероксидаза пов'язана з цілим рядом метаболічних перетворень, що відбуваються в клітині [3, 15].

Важлива роль каталази відома в якості однієї з термінальних оксидаз рослинної клітини, що відповідає за розкладання перекису, та фактору, що бере участь у регуляції зміни фаз аеробних і анаеробних процесів, окисленні перекисів в пероксисомах при фотодиханні [8]. Встановлено, що розчинні пероксидази, представлені цитоплазматичною та слабо зв'язаною з клітинною стінкою ферментативними формами, які найбільш чутливі до впливу стресових факторів. Одним з основних механізмів системної фітостійкості, вважається утворення активних форм кисню, в тому числі перекису водню, в зв'язку з цим, рядом авторів запропоновано в якості біоіндикаторів розвитку стійкості рослин визначати зміну активності розчинних і слабо зв'язаних з клітинною стінкою форм пероксидаз [4].

Дослідженню впливу різних абіотичних факторів на пероксидазну активність присвячені численні роботи [1, 4, 6, 11–13, 15]. Вивчаючи вплив різних факторів на пероксидазну активність соку коренів хрону, Давидова встановила, що хімічний склад соку і його пероксидазна активність залежать від факторів, що визначають умови росту рослин - кількості вологи, складу ґрунту і освітленості. У дослідженнях Г.Ф. Давидова та О.А. Ярмакова встановили зв'язок пероксидазної активності лікарських трав від температури навколишнього середовища [5].

Представляють також інтерес дослідження Половникова М.Г., рослин у районах з різним рівнем забруднення атмосферного повітря, яким виявлені достовірні зміни активності залізовміс-

них ферментів: збільшення активності пероксидази і деяке зниження активності каталази. При цьому стійкі види рослин в порівнянні з нестійкими характеризувалися більш низькими значеннями даних показників [3]. В якості ферменту, підвищення активності якого може свідчити про забезпеченість рослин фосфатами у вигляді макроергічних зв'язків АТФ та показником стійкості рослин, ми визначали активність ферменту АТФази. АТФаза рослинних тканин складається з декількох ферментативних систем, біологічна роль яких ще недостатньо повно вивчена. АТФази звільняють енергію пірофосфатних зв'язків при гідролізі АТФ: $\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{АДФ} + \text{P}_n$. У зв'язку з цим АТФазі належить велика роль на заключному етапі енергетичного обміну клітини.

У мітохондріях знайдено кілька АТФаз, що активуються двовалентними катіонами (Ca^{2+} , Mg^{2+}) та розрізняються за характером залежності від рН середовища.

Показано, що фосфор активує мембранну H^+ -АТФазу, яка підтримує цитоплазматичний рН і регулює мембранний іонний транспорт [2]. Первинно-активний транспорт іонів в більшості випадків здійснюється транспортними АТФази (іонними насосами), джерелом енергії для яких є гідроліз АТФ або пірофосфат. У мембранах хлоропластів і мітохондрій при роботі систем первинно-активного іонного транспорту джерелом енергії є діяльність окисно-відновних ланцюгів. Особливу роль у створенні різниці потенціалів на мембрані належить мембранному ферменту H^+ -АТФазі. Її функція полягає в тому, що вона перекачує протони з клітини назовні, підтримуючи рН цитоплазми близько до нейтрального (що важливо для протікання багатьох ферментативних процесів), а також створює на мембрані різницю потенціалів, значно визначаючи електричні властивості вищих рослин [2, 10].

Метою досліджень було визначення впливу різних факторів, таких як обробка фунгіцидом і позакоренева обробка поживними елементами на ферментативну активність пероксидази, каталази – компонентів антиоксидантної системи, а також АТФазну активність коренів рослин озимої пшениці.

Матеріали та методи

Дослідження впливу обробки біологічно активними речовинами на активність антиоксидантних ферментів проводили в лабораторних та вегетаційних умовах. Лабораторний дослід проводився за схемою: 1. Контроль: $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06 мМоль/л P); 2. $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06

мМоль/л P) + обробка 3 %-м р-ном монофосфат калію; 3. $\frac{1}{2}$ X-A + $\frac{1}{4}$ P (0,06 мМоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м р-ном монофосфат калію + 2 %-м р-ном MgSO_4 + 0,05 % CuSO_4 . Вегетаційні досліді проводили у вегетаційному будинку на території Інституту фізіології рослин

і генетики НАН України. Об'єкт дослідження - озима пшениця сорту Фаворитка. Рослини, по 12 штук, вирощували в посудинах Вагнера на 8 кг сірого опідзоленого ґрунту на варіантах без обробки і з обробкою рослин фунгіцидом амістар екстра 280 SC в фазі кущення, виходу в трубку та цвітіння-колосіння. Схема досвіду: 1. Контроль N₉₀K₉₀P₄₅; 2. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МКФ; 3. N₉₀K₉₀P₄₅ + обробка амістар екстра 280 SC; 4. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МКФ + 2 %-й розчин MgSO₄ + 0,05 % CuSO₄ + обробка амістар екстра 280 SC.

Активність антиоксидантних ферментів визначали на другу добу після обробки біологічно активними речовинами. Активність ферменту каталази (І.І.І.6) визначали титрометричним

Результати та обговорення

Отримані нами результати визначення активності ферментів антиоксидантної системи каталази і пероксидази в коренях 14-денних рослин озимої пшениці свідчать про вплив позакореневої обробки на показники активності ферментів, що входять до антиоксидантної системи. Нашими дослідженнями (табл. 1) встановлено зниження активності каталази (І.І.І.6) на 25 % за позакореневої обробки 3 %-м розчином монофосфату калію і в 1,7 рази – з 1,28 до 0,74 мл O₂ г⁻¹ хв⁻¹ за позакореневої обробки сумішшю елементів живлення Р + Mg + Cu. Поряд із цим активність пероксидази (І.І.І.7) в коренях дещо зросла – на 17,5 % при обробці монофосфатом і майже вдвічі – при позакореневій обробці сумішшю елементів живлення Р + Mg + Cu.

методом, а пероксидази (І.І.І.7) - за методом Бояркіна [3] і виражали в умовних одиницях на мг сирої ваги тканин. Активність ферменту каталази (І.І.І.6) виражали у кількості O₂, що утворився в результаті дії ферменту за 1 хв на 1 г сирої речовини (мл O₂*г⁻¹*хв⁻¹). Визначення активності ферменту АТФази в тканинах коренів озимої пшениці проводили за методом, що оснований на визначенні приросту неорганічного фосфору в середовищі в ході АТФазної реакції. Реакцію починали з додавання в зразки розчину АТФ відповідної концентрації та припиняли, додаючи розчин ТХУ. Оптичну щільність вимірювали на ФЕК. Активність ферменту визначали за кількістю неорганічного фосфату, відщепленого від аденозинтрифосфату АТФ-азою та виражали в мкг Р г⁻¹ сирої речовини год⁻¹[3].

За дослідженнями В.С. Миколаївського [14], існує зв'язок посилення аеробного дихання із зростанням активності термінальних оксидаз. За його даними зміна якості та активності окисно-відновних ферментів може служити не тільки певним показником реакції рослинного організму до несприятливих факторів середовища, але і для оцінки пристосування рослин до умов існування. Тому зміна активності антиоксидантних ферментів в тканинах коренів 14-денних рослин (підвищення активності пероксидази і зниження активності каталази) може бути показником підвищення адаптивних можливостей рослин в умовах позакореневої обробки, оскільки реакція на будь-які впливи на рослинний організм є неспецифічною.

Таблиця 1. Ферментативна активність в коренях 14 денних рослин озимої пшениці (лабораторний дослід)

Контроль: ½ X-A + 1/4 P(0,06 мМоль/л P)	½ X-A + 1/4 P (0,06 мМоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м монофосфатом калію	½ X-A + 1/4 P(0,06 мМоль/л P) + позакоренева обробка 3 %-м монофосфатом калію + 2 %-м р-ом MgSO ₄ + 0,05 % CuSO ₄
Активність каталази (І.І.І.6) (мл O ₂ ·г ⁻¹ ·хв ⁻¹)		
1,28 ± 0,06	0,96 ± 0,05	0,74 ± 0,04
Активність пероксидази (І.І.І.7), г ⁻¹ ·с ⁻¹		
1,37 ± 0,7	1,61 ± 0,07	2,92 ± 0,1

Визначення активності каталази (І.І.І.6) і пероксидази (І.І.І.7) в прапорцевих листках озимої пшениці в фазі колосіння-цвітіння в умовах вегетаційного дослідження мало подібну тенденцію (табл. 2). Активність ферменту каталази (І.І.І.6) знизилася на 7,8 % (при позакореневій обробці 3 %-м р-ном МКФ + амістар екстра) і на 37 % (тільки при обробці фунгіцидом), обробка ж рослин

озимої пшениці багатокомпонентною сумішшю знижувала каталазну активність - на 26 %. Пероксидазна активність при цьому збільшилася на 0,082 г⁻¹ · с⁻¹ як при обробці 3 %-м р-ном МКФ так і доданні до нього фунгіциду. В останньому варіанті, як і у випадку з каталазою зміни активності були не настільки значні, тобто пероксидазна активність підвищилася з 0,115 до 0,124 г⁻¹ · с⁻¹.

Таблиця 2. Ферментативна активність у листках рослин озимої пшениці (вегетаційний дослід)

Контроль: N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + 3 %-й р-н МКФ + амістар екстра 280 SC	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + амістар екстра 280 SC	N ₉₀ K ₉₀ P ₄₅ + 3 %-й р-н МКФ + 2 %-й р-н MgSO ₄ + 0,05 % CuSO ₄ + амістар екст- ра 280 SC
Активність каталази (І.П.І.6) (мл O ₂ ·г ⁻¹ ·хв ⁻¹)			
1,15 ± 0,05	1,06 ± 0,05	0,43 ± 0,02	0,85 ± 0,05
Активність пероксидази (І.П.І.7), г ⁻¹ ·с ⁻¹			
0,115 ± 0,01	0,197 ± 0,01	0,198 ± 0,01	0,124 ± 0,01

Визначення АТФазної активності в коренях у фазу колосіння-цвітіння показало підвищення активності ферменту при обробці амістар екстра з 158,7 до 190,4 тобто на 31,7 мкг Р · г⁻¹ сир. ваги · г⁻¹, при обробці сумішшю фунгіциду і 3 % р-ну МКФ в 3,3 рази і при обробці сумішшю Р + Mg + Cu + амістар екстра в 3,8 разів (рис.).

Відомо, що активність ферменту АТФази повинна корелювати з вмістом АТФ, більша ча-

стина молекул якої синтезуються в результаті дихальних процесів. У такому випадку, збільшення АТФазної активності узгоджується з роботою В.С. Миколаївського [14], в якій він визначив ефект посилення аеробного дихання як одного з проявів захисних реакцій тканин і встановив зв'язок цього фактора з ростом активності термінальних оксидаз.

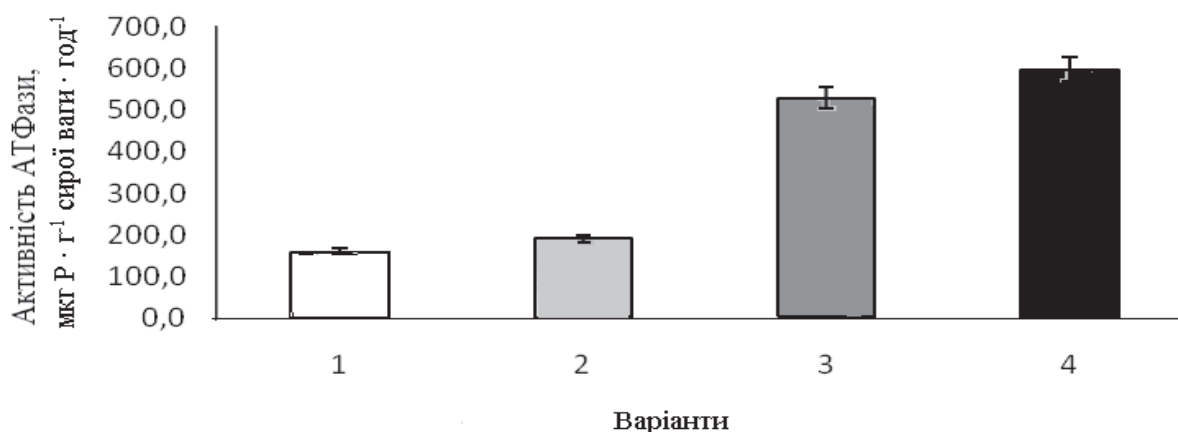


Рис. Вплив позакореневої обробки фунгіцидом і сумішшю елементів живлення на АТФазну активність коренів озимої пшениці сорту Фаворитка (вегетаційний дослід).

Варіанти: 1. Контроль N₉₀K₉₀P₄₅;

2. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МКФ;

3. N₉₀K₉₀P₄₅ + обробка амістар екстра 280 SC;

4. N₉₀K₉₀P₄₅ + позакоренева обробка 3 %-м р-ном МКФ + 2 %-й розчин MgSO₄ + 0,05 % CuSO₄.

Висновки.

Таким чином, позакоренева обробка рослин фунгіцидом амістар екстра окремо і в суміші з елементами живлення призводить до зміни активності ферментів антиоксидантних систем:

збільшення активності пероксидази (І.П.І.7) та зниження активності каталази (І.П.І.6), що є показником розвитку стійкості рослин озимої пшениці до несприятливих чинників довкілля.

Література

1. Аверьянов А.А., Лапикова В.П. Пероксидазная активность выделений здоровых и зараженных пирикулярриозом листьев риса // Докл. акад. наук. – 1995. – Т. 350, № 5. – С. 702–704.
2. Антонов В.Ф., Черныш А.М., В.И. Пасечники др. Биофизика: учебник для вузов. – М.: Владос, 2000. – 283 с.
3. Воскресенская О.Л., Алябышева Е.А., Половникова М.Г. Большой практикум по биоэкологии: учебное пособие. – Йошкар-Ола, Марийский государственный университет., Ч. 1. – 2006. – 107 с.

4. Граскова И.А., Живетьев М.А., Путилина Т.Е. и др. Активность и изоферментный спектр пероксидазы листьев некоторых видов травянистых растений, произрастающих на берегах озера Байкал, при абиотическом стрессе [Электронный ресурс] // Электронный научный журнал "Исследовано в России". – 2010. – 023. – С. 293–303. – Режим доступа к журн.: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2010/023.pdf>.
5. Гулидова, В.А. Ресурсосберегающая технология озимой пшеницы. – Липецк: ООО "Центр полиграфии", 2006. – 400 с.
6. Давыдова Г.Ф., Ермаков О.А., Панасенко А.И., Тищенко А.М. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза // Химия растительного сырья. – 1998. – № 1. – С. 15–18.
7. Клуб 100 центнерів. Сорти та технології вирощування високих урожаїв озимої пшениці / В.В. Моргун, С.В. Санін, В.В. Швартау, О.А. Омеляненко. – К.: Ін-т фізіології рослин і генетики Нац. акад. наук України, Компанія "Сингента", Швейцарія. – 2010. – 105 с.
8. Кузнецов, В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. – М.: Высшая школа, 2005. – 736 с.
9. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні.– Дніпропетровськ: Арт-прес, 2006. – 318 с.
10. Трофимова М.С. Н⁺-АТФаза плазмалеммы как компонент рН-стата цитозоля изолированных протопластов // Физиология растений. – 1992. – 39, № 1. – С. 5–14.
11. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники: ВИНТИ. – Сер. физиология растений, 1989. – Т. 6. – 167 с.
12. Методы оценки устойчивости растений к неблагоприятным условиям среды / под ред. Г.В. Удовенко. – Л.: Колос, 1976. – 318 с.
13. Моргун В.В., Швартау В.В., Киризий Д.А. Физиологические основы формирования высокой продуктивности зерновых злаков // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 371–393.
14. Николаевский, В.С. Эколого-физиологические основы газоустойчивости растений. – М., 1998. – 64 с.
15. Bolwell, G.P Wojtaszek P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense – a broad perspective // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 1997. – Vol. 51. – P. 347 -366.

GULAEVA A.B., BOGDAN M.M.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str. 31/17, e-mail: pracya_2010@ukr.net

EFFECT OF TREATMENT WITH BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES TO THE ENZYMATIC ACTIVITY OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF PLANTS WINTER WHEAT

Aims. The protection of plants is an integral component of agricultural technologies and may increase crop yields. The article shows the results of a study influence of foliar treatment plant winter wheat biologically active substances – of fungicide amistar extra and a mixture of nutrients on content of antioxidant enzymes. An increase in the content of antioxidant enzymes can be an indicator of increasing wheat plant adaptation and plant resistance of winter wheat. **Methods.** The plants of winter wheat Favoritka were grown in laboratory and small plot experiment conditions. Experimental variation plants with treatment water solution of fungicide Amistar Extra 280 SC and with mix elements (P + Mg + Cu) and potassium monophosphate (3%). The enzyme activity of peroxidase was calculated by the method Boyarkina and catalase – by titrimetric method and expressed in units per mg wet weight of tissue. The ATPase activity by the growth of inorganic phosphate in the samples derived from the tissues of the roots was studied. **Results.** It is shown that activity enzyme of catalase in leaf decreased by 37% (by treatment with mixture fungicide and potassium monophosphate), by 26% (by treatment fungicide with mixture elements P + Mg + Cu) or 63% (by treatment of fungicide) in leaf tissues. It was shown, that the peroxidase activity by 0.082 g-1 s-1 increased after the treatment of 3% potassium monophosphate and fungicide in leaf tissues. It has been established, that treatment leaf winter wheat plants Favoritka in the middle vegetation treatment with the fungicide amistar extra 280 SC and mixture amistar extra 280 SC with mixture elements P + Mg + Cu contributed to increase enzyme activity ATPase in root tissues. **Conclusions.** It is shown, that treatment of plant winter wheat Favoritka fungicide of amistar extra 280 SC or mixture of amistar extra 280 SC with nutrients changes the of activity the individual enzymes of antioxidant systems: catalase and peroxidase, which may be an indication enhance the sustainability of winter wheat plants to adverse environmental factors.

Key words: winter wheat (*Triticum aestivum* L.), fungicide, fertilizer.

ІВАННИКОВ Р.В.

Національний ботанічний сад ім. М.М.Гришка НАН України
Україна, 01014, м. Київ, вул. Тімірязєвська, 1, e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

ХЛОРОЕМБРИОГЕНІЯ ОРХІДНИХ

Насінині орхідних, крім виконання загальних, для всіх покритонасінних функцій (розмноження і розселення) є притаманним здійснення ще однієї, надзвичайно важливої – встановлення партнерських взаємовідносин із грибним партнером.

Всі насінні рослини за ознакою хлорофілоносності тканин зародка ділять на дві групи – хлороембріофіти (рослини, зародки яких містять повноцінні хлоропласти з хлорофілами у своїх клітках) та лейкоембріофіти (клітки зародків яких не містять повноцінних хлоропластів з фотосинтетичними пігментами (хлорофілами)). Значущим, у цьому відношенні, є той факт, що різні види однієї родини (і навіть різні види одного роду) можуть за цією ознакою бути віднесені до різних груп.

Факт наявності зелених пігментів в клітинах ендосперму, зародку та спермодерми насінини, тобто в тканинах, які безпосередньо не піддаються впливу сонячного світла під час свого формування відомий давно. Перша робота в якій звертається на це увага вийшла в Німеччині у 1859 році. Є низка вітчизняних робіт з цього питання [3, 5–7, 11, 12, 17, 19].

Явище хлорофілоносності зародку надзвичайно широко розповсюджене серед групи покритонасінних. В наявності цієї властивості зародка серед *Angiospermae* можна виявити певні закономірності. Виходячи з відомих фактів [19], види одного роду *не відрізняються* за цією ознакою. Більше того, здатність до синтезу хлорофілів, або її відсутність властива цілим групам рослин, які об'єднані у таксони вищого рангу.

Традиційно, орхідні, відносять до групи лейкоембріофітів [1, 19, 20]. Для насіння представників *Orchidaceae* (у своїй більшості) характерним є не диференційований на окремі органи зародок, клітини якого не мають пігментів групи хлорофілів. Перша згадка про те, що деякі види орхідей можуть мати насіння клітини зародків якого містять зелений пігмент, належить Ф. Нетоліцкому [цит. за Яковлев М.С. *и др.*, 1973]. У своїй роботі, яка вийшла у 1926 році він серед інших родин назвав орхідні також. При описі зародків та їх ембріональних структур часто використовуються такі терміни як «критична стадія» або «критичний період» [2], які характеризують зміну структурно – функціональних хара-

ктеристик в розвитку зародку та оточуючих тканин насінини та плода. В основу їх виділення покладені морфо-генетичні та морфо-фізіологічні кореляції в розвитку репродуктивних структур. Однією з найважливіших є стадія «автономності зародку», починаючи з якої відбувається перехід зародку до самостійного розвитку.

Наявність хлорофілів в клітинах на стадії «автономності зародка», з еволюційної точки зору, видається нам, ключовим моментом на який треба звертати увагу при дослідженні даного питання, адже відомо [13], що біохімічні системи синтезу та перетворення вуглеводів функціонують саме у стромі хлоропластів. Для орхідних, як для типових мікотрофів це є принциповим питанням, оскільки постнасінний розвиток зародків представників цієї родин можливий лише за умови консорціуму з грибним партнером.

Орхідні – чисельна родина квіткових, представники якої поширені практично на всіх континентах. Широке розповсюдження цієї групи покритонасінних ґрунтується на специфіці їхньої біології – рослини цієї родини в більшості своїй облігатні мікотрофи. Ступінь мікотрофності орхідних варіює залежно від виду та від етапу їх онтогенетичного розвитку. Однак, загальною для всіх представників цієї групи є залежність початкових процесів проростання насіння від симбіотичних взаємин із грибом. Гіфи гриба проникають під поверхню спермодерми насінини орхідних і вступають у контакт із частиною клітин зародку. Гриб постачає проросток різними органічними сполуками, найважливішими з яких є цукри. Тільки після цього стає можливим повноцінний розвиток зародка.

Таким чином, у зародка орхідних немає необхідності від перших моментів постембріонального розвитку забезпечувати себе вуглеводами за рахунок фотосинтезу. Саме цим, більшість дослідників і пояснює відсутність хлорофілів (а відповідно й повноцінних хлоропластів) в клітинах зародку орхідних. У зв'язку із викладеним вище, сам факт хлорофілоносності зародка окремих видів становить значний інтерес, як з точки зору біології, так і у контексті встановлення векторів філогенетичного розвитку представників цієї родини в цілому, оскільки відомо

[21], що еволюційні перетворення зародків покритонасінних пов'язані з їх екологічною (т.т. адаптивною) «радіацією», а одна із найбільш характерних рис ембріогенезу – закономірний, таксоноспецифічний морфогенез зародків.

Якщо співвіднести відомі факти хлорофілоносності зародка із загальною кількістю таксонів в ранзі виду родини Orchidaceae (19-22 тис. видів) [23] стає зрозумілою винятковість цього явища.

Цей факт ставить перед нами ряд питань еволюційної спрямованості безпосередньо пов'язаних з філогенезом представників даної родини, а саме:

- наскільки поширене це явище, серед яких груп орхідних та як це відображується на їх репродукційній здатності?

- лейкоембріофітизм зародка за своєю природою первинне чи вторинне явище?

- у якому напрямку (лейкоембріофітизм або хлорофітизм) еволюціонує родина *Orchidaceae* в цілому?

У ході наших досліджень насіння тропічних та субтропічних орхідних колекції НБС, вперше виявлено три види орхідних в насінні яких містилися зелені зародки після повного вирівання та розтріскування коробочки (*Coelogyne brachyptera* Rchb.f., *Dendrobium bellatulum* Rolfe та *Dendrobium citrinum* Ridl. (сун. *Cadetia citrina* (Ridl.) Schuit.)). Виходячи із власного практичного досвіду, ми можемо констатувати, що повноцінні фотосистеми епіфітних орхідних *in vitro* формуються набагато раніше ніж у наземних видів цієї родини. У нашій практиці не зафіксовано випадки проростання насіння представників вище зазначених видів орхідних на живильних середовищах без вуглеводної компоненти в умовах асептичної культури [18].

Аналізуючи явище лейкоембріофітизму, його структурно-функціональні та еволюційні наслідки для орхідних в цілому, ми виділяємо ряд ключових моментів, на які треба звернути увагу при розгляді цього питання: розповсюдженість хлороембріофітизму в родині Orchidaceae; час формування повноцінних пластид у рослин взагалі та у орхідних зокрема; механізми формування фотосинтетичних систем в онтогенезі у вищих та нижчих автотрофів.

Особливості будови зародка безпосередньо пов'язані зі специфікою процесів при проростанні насіння. Так, зародки рослин паразитів, на протигагу автотрофним рослинам, іноді складаються з 2-15 клітин (*Allotropia*, *Hypopitius*) [2]. Цей же факт підтверджується і на прикладі представників родини Orchidaceae – типових

алелопаразитів, зародок яких у переважній більшості видів є недиференційованим на органи та складається із декількох десятків або сотень клітин. Відповідно до класифікації насіння квіткових Л.І. Лотової [10] яка базується на локалізації запасних речовин в насінні, насіння більшості орхідних відноситься до 4-го типу як таке, поживні речовини в якому відкладаються безпосередньо в клітинах зародку.

Як було відмічено нашими попередниками [15], серед групи мікотрофних рослин відсутність хлорофілу у вегетативних органах спорофіту може бути обумовлена не тільки ступенем залежності вищої рослини від гриба. Навіть в межах одного роду трапляються види, органи типових представників яких містять хлорофіл або відзначаються його відсутністю. В деяких випадках це можна пояснити потрійним паразитизмом, коли вища рослина паразитує на грибі, який паразитує на іншій вищій рослині.

У ході історичного розвитку взаємин з грибами, в родині Orchidaceae відокремилась окрема група рослин (близько 100 видів), що повністю втратила хлорофіл та перейшла на облігатно-мікотрофний та епіпаразитичний спосіб живлення. Філогенетичний аналіз показує, що втрата здатності до фотосинтезу в родині Orchidaceae відбувалася щонайменше 20 разів. Епіпаразитизм виявлений у таких облігатних мікотрофів, як *Gastrodia* R. Br., *Yuania* Maxim., *Rhizantella* R. S. Rogers та деяких інших родів [8, 22, 24].

Сучасні докази епіпаразитизму мікотрофних та фотосинтетичних орхідей поділяють на дві групи. До першої входять дані молекулярних досліджень, що показують ідентичність ITS повторів грибів, із коренів орхідних, та грибів, що утворюють ектомікоризу на коренях сусідніх дерев [25]. А до другої – однакові частки стабільних ізотопів вуглецю та азоту в орхідеях та ближніх ектомікоризних грибах [22]. За допомогою радіоактивної мітки показано, що рослини – паразити від рослин-господарів в основному засвоюють сахарозу, аспарагінову і глютамінову кислоти та їх аміді [13].

Відповідно до принципів розподілу паразитних рослин, запропонованих у попередніх роботах [4, 16], орхідні належать до алелопаразитів. Для мікотрофних алелопаразитів характерною особливістю є наявність спеціалізованої гаусторіальної тканини, яка приймає в себе гіфи гриба і в клітинах якої в подальшому відбувається їх перетравлювання. Суттєва різниця у формах паразитизму покритонасінних свідчить на користь ідеї про політопне виникнення різних

типів паразитизму. Крім того, різниця у ступені еволюційної досконалості різних типів паразитизму свідчить на користь гетерохронного виникнення цього біологічного явища [14-16]. Алелопаразитизм є наслідком тривалої сумісної еволюції вищої рослини і гриба. У підтримку цієї гіпотези можна навести ряд фактів.

Відомо, що характер взаємовідносин орхідеї та її грибного партнера часто носять непередбачуваний характер – іноді грибні гіфи повністю захоплюють зародки та протокорми орхідних і знищують, використовуючи їх як субстрат для живлення. Це саме відбувається в тому випадку, коли спори грибів потрапляють в ємкості для асептичної культури з ювенільними рослинами орхідних. Середовища для асептичної культури орхідеї достатньо багаті на поживні речовини, на ньому швидко розвивається міцелій гриба, який завжди поводить себе агресивно по відношенню до спорофітів орхідних. У зв'язку з цим, для симбіотичної культури орхідних рекомендують відносно бідні на поживні речовини середовища [9]. В інших випадках ми спостерігаємо зворотні явища – вища рослина поводить себе агресивно повністю перетравлюючи гіфи гриба у спеціальних тканинах свого кореня. Тобто баланс паразитичних взаємовідносин в парі вища рослин – гриб нестійкий і залежить від цілого комплексу факторів зовнішнього середовища.

З практики власних багаторічних спостережень можемо констатувати, що при проведенні процедури постасептичної адаптації ювенільні рослини тропікогенних видів орхідних, безумовно, формують мікоризні консорції з грибами субстрату. Субстрат для адаптації ми підбираємо з місцевих матеріалів, відповідно і види грибів є неспецифічними для ювенільних рослин. Однак, рослини в більшості випадків успішно адаптуються, що говорить про їх здатність утворювати стабільні консортивні системи з місцевими видами грибів [18].

З цього також випливає ще один дуже цікавий висновок, про що можна прочитати в роботах Шале (1900 – цит. по Терехин Е.С., 1979). На його думку, вищі рослини в ґрунті конкурують, перш за все, не за сполуки гумусової природи, а за мінеральні речовини, видобувати які з ґрунтових сумішей їм допомагають мікоризи. Внаслідок цього, *Angiosperme* здатні до формування мікоризних консорцій, отримали істотну перевагу над рештою флори. Наслідком цього було так зване «вторинне» заселення покритона-

сінними бідних на поживні речовини та заболочених ділянок ценозів по всіх континентах.

Це припущення повністю узгоджується з біологією орхідних та характером їх розповсюдження. Відомо, що найбільше різноманіття представників цієї родини можна спостерігати в тропіках та субтропіках: тропічна Америка – 306 родів, 8266 видів; тропічна Азія – 250 родів, 680 видів; Нова Гвінея – 1450 видів; Колумбія – 1300 видів [23]. Серед тропікогенних орхідних значна частина видів є типовими епіфітами, або таким які можуть зростати епіфітно. Епіфіти – рослини які зайняли свою екологічну нішу внаслідок тривалої еволюції та переходу від наземного способу життя до епіфітного. Безумовно, це було б мало ймовірно без здатності орхідних утворювати стійкі консорції з мікоризними грибами.

Аналізуючи сукупність наявних даних, ми приходимо до наступних висновків:

- хлороембріогенія, як явище, для орхідних є винятковим, рудиментарним структурно-функціональним проявом характерним в основному для представників *Epidendroideae* Lindl.;
- нами вперше описано випадки хлороембріогенії для *Coelogyne brachyptera* Rehb.f., *Dendrobium bellatulum* Rolfe і *Dendrobium citrinum* Ridl.;
- орхідні в ході філогенезу втратили ферментні системи, відповідальні за автономний темновий біосинтез хлорофілів;
- для запуску світлозалежних шляхів біосинтезу фотосинтетичних пігментів спорофіту орхідних необхідне зовнішнє джерело вуглеводів (*in vitro* – це цукри живильного середовища, *ex situ* – цукри протоплазми партнера по грибному консорціуму);
- структури фотосинтетичного апарату клітин зародку хлороембріогенних орхідних хоча і містять зелені фотосинтетичні пігменти, однак не здатні самостійно забезпечувати пластичні та енергетичні потреби спорофіту на початкових етапах його розвитку *in vitro*, що свідчить про рудиментарність явища хлороембріогенії орхідних;
- явище хлороембріогенії для орхідних як родини є архаїзмом – вектор адаптивної радіації Orchidaceae, спрямований на поглиблення консорційних зв'язків з нижчими міксотрофами, а, відповідно, лейкоембріофітизм є нормою та пріоритетним напрямком розвитку цієї родини.

Література

1. Банникова В.П., Хведынич О.А. Основы эмбриологии растений. – К, 1982. – 164 с.
2. Батыгина Т.Б. Васильева В.Е. Размножение растений. – С-П.: изд-во: С.-Петербур. ун-та, 2002. – 232 с.
3. Васильченко И.Т. Неотенические изменения у растений. – М.–Л.: Наука, 1965. – 84 с.
4. Голубова Н.П. Микориза *Encephalartos hildebrandtii* Arb. and Banche. И некоторые соображения о взаимоотношениях гриба-эндифита и высшего растения в эндотрофных микоризах // Бюлл. МОИП, отд. биол. – Т. XIII, №2. – С. 123.
5. Жукова Г.Я. Хлорофилоносность зародыша как признак для классификации цветковых растений // Эмбриология цветковых растений [ред. Т.Б. Батыгина]. – С-П.: Мир и семья – 1997. – Т. 95. – С. 461–470.
6. Иоффе М.Д. О наличии хлорофилла в эндосперме Крестоцветных // ДАН СССР. – 1952. – Т. 87. – С. 3.
7. Иоффе М.Д. Развитие зародыша и эндосперма у пшеницы, конских бобов и редиса // Тр. БИН АН СССР, сер. VII, Морфол. и анат. рас. – 1957. – С. 4.
8. Коломейцева Г.Л. Морфолого-экологические особенности адаптации тропических орхидных при интродукции. Автореф. дис. ... доктора биол. наук. спец: 03.00.05 «Ботаника». – М., 2006. – 38 с.
9. Куликов П.В. О методах размножения орхидных умеренной зоны в культуре *in vitro* // Бюл. ГБС М.: Наука. – 1998. – Вып. 176. – С. 125 – 131.
10. Лотова Л.И. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений – М.: КомКнига, 2007. – 512 с.
11. Любименко В.Н. О превращении пигментов пластид в живой ткани растения // Зап. Акад. наук. Сер.VIII. – 1916. – Т. 33. – С. 12.
12. Поддубная-Арнольди В.А. Общая эмбриология покрытосеменных растений. – М.:Наука, 1964. – 481 с.
13. Полевой В.В. Физиология растений: Учеб. для биол. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1989. – 464 с.
14. Терехин Э.С., Камелина О.П. Эндосперм *Orchideaceae* (К вопросу о редукции) // Бот. журнал. – 1969. – Т. 54, №5. – С. 657–666.
15. Терехин Э.С., Никитичева З.И. О принципах создания экологической классификации зародышей покрытосеменных растений. Актуальные вопросы эмбриологии покрытосеменных. – Л.: Наука, 1979. – С. 120–130.
16. Терехин Э.С. Паразитные цветковые растения эволюция онтогенеза и образ жизни. – Л.: Наука, 1977. – 220 с.
17. Худяк М.И. К вопросу о роли неассимилирующих хлоропластов в процессе плодообразования // Журн. общ. биол. – 1964. – Т. 25. – С. 5.
18. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.М., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – К.: Наук. думка, 2008. – 560 с.
19. Яковлев М.С., Жукова Г.Я. Покрытосеменные растения с зелёным и бесцветным зародышем (хлоро- и лейкоэмбриофиты). – Л.: Наука. – 1973. – 116 с.
20. Arditti J. Aspects of the physiology of orchids // Advances Bot. Res. – 1979. – №7. – P. 421 – 655.
21. Batygina T.B., Bragina E.A., Vasilyeva V.E. The reproductive system and germination in orchids / T.B. Batygina // Acta biologia Cracoviensia, ser. Botanica. – 2003. – Vol. 45, №2. – P. 21-34.
22. Dearnaley J.D.W. Further advances in orchid mycorrhizal research // Mycorrhiza. – 2007. – №17, №6. – P. 475–486.
23. Dressler R.L. Phylogeny and classification of the orchids family. – Portland, Oregon: Dioscorides Press, 1993. – 278 p.
24. Richard J. Waterman and Martin I. Bitartondo. Deception above, deception below: linking pollination and mycorrhizal biology of orchids // J. of Exp. Bot. – 2008. – Vol. 59, №5. – P. 1085–1096.
25. Yamato M., Yagame T., Suzuki A. Isolation and identification of mycorrhizal fungi associating with an achlorophyllous plant, *Epipogium roseum* (Orchidaceae) // Mycoscience. – 2005. – Vol. 46. – P. 73–77.

IVANNIKOV R.

Gryshko National Botanical Gardens of the Academy of Science of Ukraine

Ukraine, 01014, Kyiv, Tymiriazevska st. 1, e-mail: ivannikov_roman@rambler.ru

CHLOROEMBRYOGENY OF ORCHIDS

Purpose. Analyze the phenomenon of orchids chloroembryogeny and set its biological significance. **Methods.** Used standard biotechnological methods and techniques of light microscopy. **Results.** For the first time there are three types of orchids for seed embryos are characterized by the presence of chloroplasts. All species belong to a group *Epidendroideae* Lindl. **Conclusion:** Made a number of assumptions about the value of general biological phenomena chloroembryogenii for orchids.

Key words: orchids, chloroembryogeny, preservation, *in vitro*.

ЄЛІСЕЄВА Ю. В., МАТВЄЄВА Н. А.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: eliseevauv@ukr.net

ВИКОРИСТАННЯ *AGROBACTERIUM RHIZOGENES*-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ ПОЛІФРУКТАНІВ У КОРЕНЯХ САЛАТУ *LACTUCA SATIVA* L.

Одним з основних методів генетичної трансформації рослин є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація. *Agrobacterium rhizogenes* містить Rі-плазмиду, яка викликає формування „бородатих” коренів після її інтеграції в геном рослини.

В процесі трансформування відбувається поранення рослин, контактування з бактеріями, культивування рослин в умовах *in vitro* і вбудовування чужорідної Т-ДНК до геному рослини. Тому генетичну трансформацію у вигляді комплексу цих чинників можна розглядати як стресовий фактор, який діє на рослину [1]. Одним з видів прояву стресової відповіді є синтез та накопичення рослиною запасних речовин і вторинних метаболітів [2]. До сполук, які накопичуються в рослинах також і при дії стресових чинників, належать фруктани [3-4]. Фруктани – полісахариди, побудовані із залишків D-фруктози. Фруктани є головними запасними формами вуглеводів багатьох рослин – топінамбура, жоржини, дивосилу, цикорію, кульбаби, лопуха. В медицині, бродильній і харчовій промисловості поліфруктани використовують як сиро-

вину для отримання фруктози [5]. Також фруктани використовують як лікувальний засіб при дисбактеріозах, діабеті, серцево-судинних захворюваннях [6].

Методом генетичної трансформації за допомогою *A. rhizogenes* були трансформовані такі рослини як *Aconitum heterophyllum*, *Atropa belladonna*, *Brugmansia suaveolens*, *Catharanthus roseus*, *Cichorium intybus*, *Datura stramonium*, *Nicotiana tabacum*, *Ophiorrhiza pumila*, *Rauvolfia micrantha*, *Salvia sclarea*, *Tylophora indica*, та інші [2], в тому числі і рослини салату *Lactuca sativa* L. [7-8].

Lactuca sativa L. – лікарська рослина, в клітинах якої накопичується цілий ряд цінних для фармакології біологічно активних речовин, в тому числі і фруктани. Рослини салату різних сортів містять фруктани у кількості від 7 до 15 % сухої маси [9]. Тому цікавим було дослідити зміну синтезу та накопичення цих сполук в трансгенних коренях салату, а також залежність накопичення фруктанів від швидкості приросту маси трансгенних рослин салату.

Матеріали і методи

Вихідний матеріал – асептичні рослини салату *L. sativa* сортів Одеський Кучерявець та Грін Корал – отримували шляхом поверхневої стерилізації насіння. Для цього насіння послідовно витримували в 70% етанолі протягом 30 сек., розчині „Білизни” (1:3) протягом 10 хв., промивали тричі стерильною дистильованою водою. Простерилізоване насіння пророщували на агаризованому середовищі Мурасіге і Скуга (MS) [10] при температурі 24°C, 16-годинному світловому періоді.

Генетичну трансформацію салату здійснювали за допомогою *A. rhizogenes* (вектор *pCB161*, цільовий ген *ifn-a2b*, селективний ген *nptII*). Для трансформації використовували сім’ядольні листки 10-14-денних проростків. На них робили поперечні надрізи і кокультивували з бактеріями протягом 30 хв. Далі культивували на агаризованому середовищі 1/2 MS (середовище MS зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів) протягом двох діб при температурі

24°C, 16-годинному світловому періоді. Після цього експланти переносили послідовно на середовище 1/2 MS з антибіотиком цефотаксимом (600 мг/л) на 7 діб, потім на середовище 1/2 MS з антибіотиками цефотаксимом (600 мг/л) та канаміцином (25 мг/л), пересаджуючи кожний тиждень на нове середовище з антибіотиками (з такими ж концентраціями) до появи „бородатих” коренів.

Геномну ДНК з трансгенних коренів виділяли ЦТАБ-методом [11]. Присутність перенесених генів визначали методом ПЛР з праймерами наведеними у таблиці 1.

Для визначення приросту маси кінцеві ділянки коренів (до 15 мм) відділяли та культивували на середовищі 1/2 MS при 24°C, 16-годинному світловому періоді. Через 30 діб визначали приріст маси отриманих трансгенних коренів.

Вміст поліфруктанів визначали використовуючи метод Мак-Пері і Слаттері (1960) [12]

(спектрофотометр *Eppendorf BioPhotometer plus*, довжина хвилі 550 нм), який базується на здатності кетоцукрів давати забарвлення з резорцином у кислому середовищі. Концентрацію кето-

цукрів визначали за калібрувальним графіком (калібрування здійснювали по фруктозі). Всі експерименти проводили в трьох повторностях.

Таблиця 1. Праймери, використані для підтвердження присутності генів *nptII* та *ifn-α2b*.

Ген	Праймер	Розмір ампліфікованого фрагмента, п. н.
<i>nptII</i>	5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' 5'-gctctagatccagagtcccgcctcagaag-3'	622
<i>ifn-α2b</i>	5'-ctcctgcttgaaggacag-3' 5'-ggagtcctccttcatcag-3'	264

Результати та обговорення

Ріст „бородатих” коренів на експлантах, отриманих після генетичної трансформації *A. rhizogenes*, починався через 10-14 діб. Корені мали характерні для „бородатих” коренів ознаки: гормонезалежний ріст, негативний геотропізм, сильне розгалуження, що зумовлено переносом в генотип T_L фрагменту Т-ДНК рR1 плазмиди. В експерименті визначали частоту утворення трансгенних коренів на експлантах після трансформації, яка складала 85±1 %. ПЛР-

аналіз отриманих ліній показав присутність як селективного гена *nptII*, так і цільового *ifn-α2b*.

Показники приросту маси трансгенних коренів через 30 діб відрізнялись в обох сортах. У коренях сорту Одеський Кучерявець приріст маси становив від 0,06±0,03 до 0,16±0,01 г, сорту Грін Корал – від 0,02±0,003 до 0,12±0,03 г на одну точку росту (один кореневий експлант довжиною до 15 мм) (рис. 1).

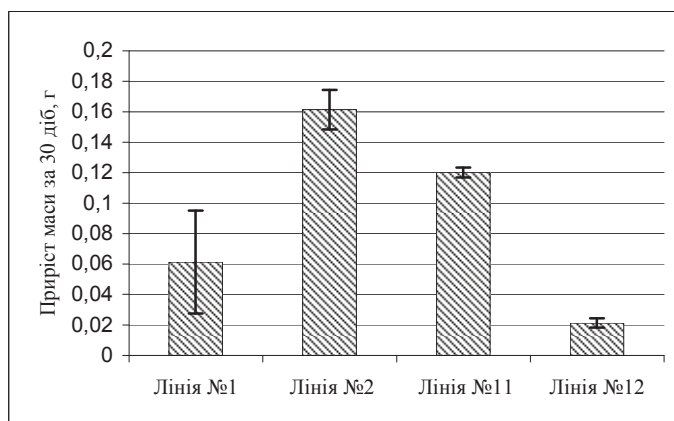


Рис. 1. Приріст маси трансгенних коренів салату *Lactuca sativa* L. сортів Одеський Кучерявець (лінія №1, лінія №2) та Грін Корал (лінія №11, лінія №12)

Отже, усі досліджувані лінії відрізнялися за швидкістю росту, а найбільший приріст маси відмічено для коренів лінії №2 сорту Одеський Кучерявець.

Через 30 діб культивування на агаризованому середовищі 1/2 MS вміст поліфруктанів у „бородатих” коренях салату варіював від 60,3±3,9 до 108,5±2,2 мг/г сухої маси для сорту Одеський Кучерявець та від 117,3±3,7 до 163,3±29,7 для сорту Грін Корал (рис. 2).

За вмістом поліфруктанів корені усіх досліджуваних ліній відрізнялися. Найбільший

вміст поліфруктанів спостерігався у коренях лінії №11 сорту Грін Корал.

Визначали також загальне накопичення поліфруктанів за 30 діб (рис. 3).

За загальним накопиченням поліфруктанів лінії мали значні відмінності. Було виділено дві лінії трансгенних коренів (лінія №2 сорту Одеський Кучерявець – 0,137±0,002 мг та лінія №11 сорту Грін Корал – 0,15±0,01 мг), що характеризуються найбільшою загальною кількістю накопичених поліфруктанів за 30 діб культивування.

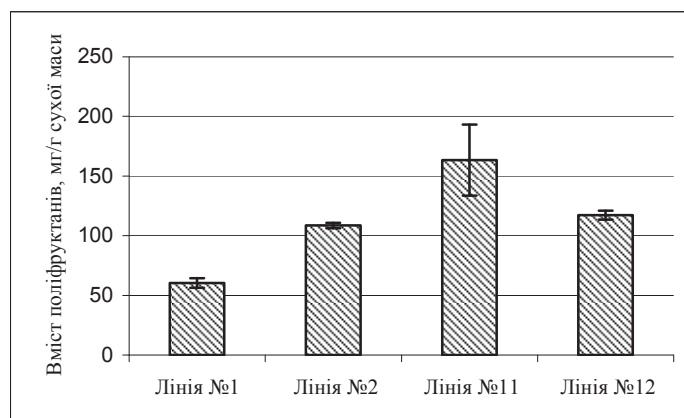


Рис. 2. Вміст поліфруктанів в трансгенних коренях салату *Lactuca sativa* L. сортів Одеський Кучерявець (лінія №1, лінія №2) та Грін Корал (лінія №11, лінія №12)

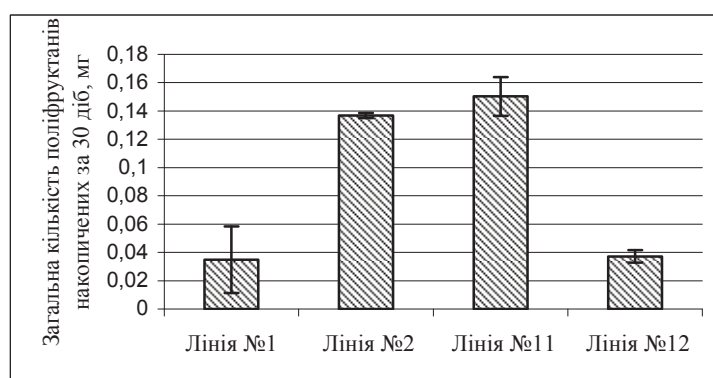


Рис. 3. Загальне накопичення поліфруктанів за 30 діб

Висновки

Отже, генетична трансформація за допомогою *A. rhizogenes* впливає на ріст „бородатих” коренів салату та накопичення в них поліфруктанів. Спостерігаються відмінності як у швидкості росту, так і у накопиченні поліфруктанів в різних лініях коренів салату двох сортів – Одеський Кучерявець та Грін Корал. Швидкість приросту маси у різних ліній відрізнялась у 2,7

та 6 разів відповідно для коренів сортів Одеський Кучерявець та Грін Корал. Загальний вміст поліфруктанів у лініях коренів салату Одеський Кучерявець та Грін Корал відрізнявся у 4 рази для коренів обох сортів. Такі відмінності, вірогідно, пов’язані з тим, що кожна лінія є окремою трансформаційною подією.

Література

1. Еникеев А.Г., Копытина Т.В., Семенова Л.А. и др. Агробактериальная трансформация как комплексный биотический стрессирующий фактор // Журнал стресс-физиологии и биохимии. – 2008. – Т. 4, №1. – С. 11–19.
2. Dipasree Roychowdhury, Anrini Majumder and Sumita Jha. *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation in Medicinal Plants: Prospects and Challenges in: Biotechnology for Medicinal Plants, S. Chandra et. al. – Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. – P. 29-68.
3. De Roover J., Vandenbranden K., Van Laere A., Van den Ende W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.) // Planta. – 2000. – Vol. 210, №5. – P. 808–814.
4. Ebskamp M. J., van der Meer I. M., Spronk B. A., Weisbeek P. J., Smeekens S. C. Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco // Biotechnology (N.Y.). – 1994. – Vol. 12, №3. – P. 272–275.
5. Петрушевский В. В., Бондарь Е. Г., Винокурова Е. В. Производство сахаристых веществ. – К.: Урожай, 1989. – 168 с.
6. Roberfroid M. B. Introducing inulin-type fructans // Br. J. Nutr. – 2005. – Vol. 93, №1. – P. 13–25.
7. Curtis I. S., He C., Power J. B., Mariotti D., de Laat A., Davey M. R. The effects of *Agrobacterium rhizogenes* rolAB genes in lettuce // Plant Science. – 1996. – Vol. 115, № 1. – P. 123–135.

8. Matveeva N. A., Shakhovskii A. M., Kuchuk N. V. Features of lettuce transgenic plants with *ifn-alpha2b* gene regenerated after *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation // Tsitol. Genet. – 2012. – Vol. 46, №3. – P. 27–32.
9. Muir J. G., Shepherd S. J., Rosella O., Rose R., Barrett J. S., Gibson P. R. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55 (16). – P. 6619-6627.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – Vol. 15, №3. – P.473–497.
11. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 242 с.
12. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 143 с.

YELISIEIEVA Y. V., MATVIEIEVA N. A.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnoho str., 148, e-mail: eliseevauv@ukr.net*

AGROBACTERIUM RHIZOGENES-MEDIATED TRANSFORMATION FOR THE INCREASE OF POLYFRUCTANS CONTENT IN ROOTS OF *LACTUCA SATIVA* L.

Aims. The studing of *Lactuca sativa* L. “hairy” roots was the aim of the work. **Methods.** The roots were obtained via cocultivation of leaves with *Agrobacterium rhizogenes* with pCB161 vector (selective *nptII* gene, target *ifn-a2b* gene). Selection of transgenic roots was performed on Murashige and Skoog medium with twice reduced content of macrosalts, 600 mg/l cefatoxime and 25 mg/l kanamycine. **Results.** Transformed “hairy” root lines differed in biomass increase from 0,02±0,003 to 0,16±0,01 g fresh weight during 30 days and polyfructans content from 60,3±3,9 to 163,3±29,7 mg/g dry weight. The maximum total fructan content was found in the one line of Odessky Kucheriavets cv “hairy” roots and one line of Green Coral “hairy” roots cultivated during 30 days (0,137±0,002 mg and 0,15±0,01 mg respectively). **Conclusions.** Differences of biomass increase and polyfructans content was observed in both lines of roots. Probably, such differences connected by that each line is separate transgenic event.

Key words: transformation, *Agrobacterium*, *Lactuca sativa*, fructans.

ЖУК І.В., ДМИТРІСВ О.П.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м.Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: iren_zhuk@mail.ru*

ІНДУКЦІЯ ЗАХИСНИХ РЕАКЦІЙ ПШЕНИЦІ, ІНФІКОВАНОЇ ЗБУДНИКОМ СЕПТОРІОЗУ

Ураження культурних рослин фітопатогенними грибами спричиняє значні втрати врожаю. Одним з найбільш поширених інфекційних хвороб пшениці є септоріоз. Збудник септоріозу гриб *Septoria tritici* вражає переважно листки і зменшує їх асиміляційну поверхню. Внаслідок цього порушується розвиток колоса, зменшується кількість зерен та формуються невивчені зернівки. Втрати врожаю навіть при помірному розвитку хвороби становлять 10-15%, а при епіфітотійному, яке трапляється раз у 2-3 роки – 30-50% [2]. Захист посівів за допомогою фунгіцидів не завжди є ефективним і викликає забруднення навколишнього середовища отрутохімікатами, а нові сорти досить швидко втрачають свою хворобостійкість. Альтернативною застосуванню пестицидів є біологічні мето-

ди захисту рослин, серед яких у першу чергу слід назвати індукування стійкості [1, 5]. Індукована стійкість є тимчасовою фенотиповою стійкістю, що базується на експресії багатьох генів, і тому є неспецифічною.

Речовини фітопатогенів, що викликають таку стійкість, називають біотичними еліситами. Останнім часом увага дослідників зосереджена на пошуку нових еліситорів та вивченні можливості їх поєднання з регуляторами сигнальних систем рослин. До числа останніх належить ендогенний оксид азоту (NO), який задіяний у реакції гіперчутливості. В наших попередніх дослідженнях показано, що обробка рослин донором NO – нітропрусидом натрію (НПН) – індукує неспецифічну стійкість у ярої пшениці в умовах польового досліду [2]. В подальшому

пошук нових ефективних еліситорів був продовжений, зокрема була використана щавлева кислота [3]. Відомо, що ця кислота здатна індукувати програмовану загибель рослинних клітин шляхом посилення утворення активних форм кисню (АФК) [7]. Виявилось, що щавлева кислота індукує підвищення активності пероксидази, яка бере участь у формуванні клітинної стінки, утилізації пероксиду водню та індукції неспецифічної стійкості молодих рослин озимої

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були сорти ярої м'якої пшениці *Triticum aestivum* L. – Недра та Етюд, які вирощували в умовах дрібноділянкових польових дослідів на сірому лісовому ґрунті в Київській області з використанням типової для зони агротехніки.

Обробку рослин водним розчином щавлевої кислоти 0,1 мМ та 0,5 мМ розчином донором оксиду – нітропрусида натрію проводили у фазі виходу в трубку з одночасною інокуляцією збудником септоріозу *Septoria tritici*. Саме ця фаза є найбільш чутливою до дії еліситорів, регуляторів росту і септоріозу. В попередніх дослідженнях нами встановлено, що саме ці концентрації розчинів щавлевої кислоти та НПП є найбільш ефективними. Сорт Етюд (заявник Миронівський інститут пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України) створено шляхом групового та наступних негативних доборів із гібридної популяції ТАМ 200 (США) х Turaco (Мексика). Сорт Недра (заявник – Національний науковий центр „Інститут землеробства НААН України”) похо-

Результати та обговорення

Встановлено, що у чутливого до септоріозу сорту Етюд активність АПО в умовах зараження різко знижується (рис. 1, А).

Обробка щавлевою кислотою та донором NO на фоні штучного ураження незначно підвищує активність АПО, однак дія цих речовин на неуразнені рослини спричиняє значне підвищення активності АПО. В подальшому у фазі колосіння-цвітіння, коли завершується інкубаційний період розвитку хвороби, активність

м'якої пшениці до збудника септоріозу [3]. Реакція проявлялась через добу після штучного ураження і її досліджували протягом 19 діб. Однак подальший розвиток захисних реакцій в оброблених еліситором рослинах не був з'ясований.

Метою роботи було вивчення регуляторної ролі NO та щавлевої кислоти в індукції імунних відповідей рослин пшениці до септоріозу протягом онтогенезу.

дить від сортів вітчизняної селекції, зокрема сорту Дніпрянка. Таким чином, нами в умовах польового дослідів проведено порівняння стійкості до збудника септоріозу сортів різного походження. В якості маркера індукованої стійкості визначали активність цитоплазматичної пероксидази (КФ 1.11.1.7) у листках за методом Сіверс (1971) [9], аскорбатпероксидази (АПО) по Накано і Асада [8].

Відбір зразків проводили через добу після зараження і в подальшому протягом періоду колосіння-цвітіння та дозрівання зерна. Оцінку ураження та ступеню розвитку захворювання проводили у фазу молочно-воскової стиглості зерна з використанням 9-бальної шкали Саарі та Прескотта [4]. У цей же період визначали морфометричні параметри – висоту рослин, довжину колоса та прапорцевого листка. Після дозрівання зерна проводили аналіз структури врожаю. Повторність дослідів триразова. Результати обробляли статистично з використанням програмного пакету Microsoft Excel.

АПО в уражених рослинах значно зростає і перевищує рівень контролю, а в оброблених еліситорами рослинах (контрольних та інфікованих) знижується. У фазі молочної стиглості зерна активність АПО у всіх варіантах зменшується, однак найбільше у варіанті з зараженням рослин септоріозом без обробки, що свідчить про значну деградацію клітин мезофілу листків, деструкцію пігментного комплексу та прискорення старіння уражених рослин.

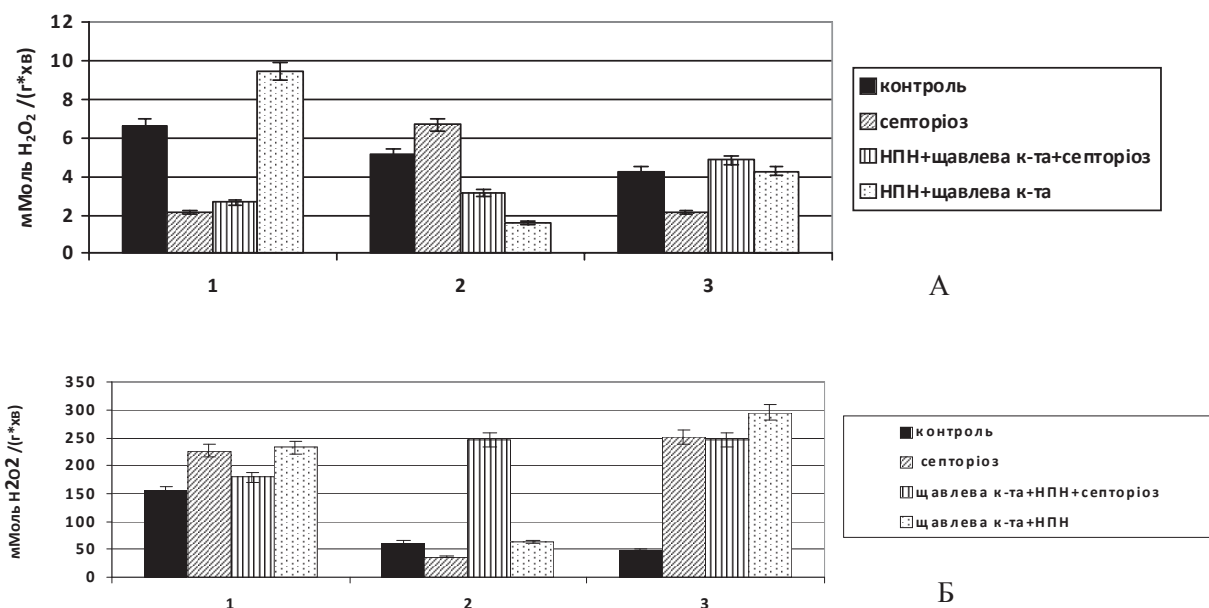


Рис. 1. Вплив обробки донором оксиду азоту – нітропрусидом натрію та щавлевою кислотою на активність аскорбатпероксидази (А) та пероксидази (Б) в листках ярої пшениці сорту Етюд за умов ураження збудником септоріозу (1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – молочної стиглості зерна)

Відомо, що на відміну від АПО, цитоплазматична пероксидаза використовує в якості субстрату фенольні сполуки і задіяна у процесі лігніфікації клітинних стінок [7]. Індукція синтезу лігніну, яка супроводжується посиленням активності цитоплазматичної пероксидази, належить до первинних реакцій рослинної клітини на проникнення некротрофних фітопатогенних грибів. Встановлено, що у рослин пшениці сорту Етюд, попередньо оброблених щавлевою кислотою і донором NO та інфікованих збудником септоріозу активність пероксидази зростає у фазі виходу в трубку (рис. 1Б). Однак у фазі колосіння-цвітіння активність пероксидази зменшується у контролі, заражених рослин сорту Етюд та незаражених рослин за сумісної дії щавлевої кислоти та донору NO. У варіанті з зараженням септоріозом і обробкою донором оксиду азоту і щавлевою кислотою активність цитоплазматичної пероксидази залишається високою. У фазі молочної стиглості зерна відбувається підвищення активності цитоплазматичної пероксидази у всіх варіантах дослідження, крім контролю. Найвища активність пероксидази відмічена у варіанті з незараженими рослинами, обробленими донором оксиду азоту і щавлевою кислотою.

У ярої пшениці сорту Недра найвища активність АПО у фазі виходу в трубку виявлена у варіанті з зараженням септоріозом та обробкою

донором оксиду азоту і щавлевою кислотою (рис.2А). У фазі колосіння-цвітіння активність АПО у цьому варіанті залишається такою ж високою, як і у фазі виходу в трубку. У контролі активність АПО у фазі колосіння-цвітіння зростала, що свідчить про активізацію роботи фотосинтетичного апарату. У фазі молочної стиглості зерна активність АПО у контролі залишається на тому ж рівні, що і у попередній фазі, однак в інших варіантах вирівнюється. Тобто, обробка щавлевою кислотою та NO затримує деструкцію фотосинтетичного апарату у стійкого сорту ярої пшениці Недра у фазах виходу в трубку і колосіння-цвітіння. У фазі виходу в трубку активність цитоплазматичної пероксидази була високою у контролі, у варіанті з зараженням септоріозом рослин та обробкою донором оксиду азоту і щавлевою кислотою (рис.2Б). У фазі колосіння-цвітіння та молочної стиглості зерна активність цитоплазматичної пероксидази у всіх варіантах значно зменшується і залишається на одному рівні, що свідчить про індукцію захисних реакцій в період проникнення патогену у фазі виходу в трубку рослин пшениці. Зменшення активності цитоплазматичної пероксидази у фазах колосіння-цвітіння може бути обумовлене завершенням формування клітинних стінок і процесу лігніфікації та суберинізації.

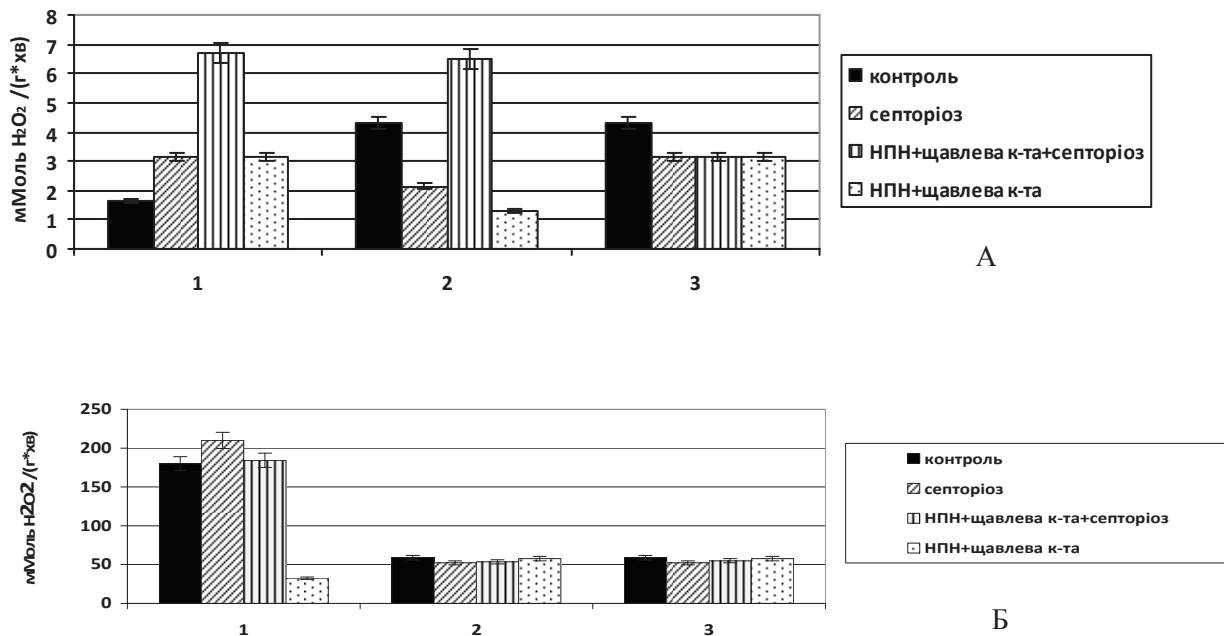


Рис. 2. Вплив обробки щавлевою кислотою та донором оксиду азоту – нітропрусидом натрію (НПН) на активність аскорбатпероксидази (А), пероксидази (Б) в листках ярої пшениці сорту Недра за умов ураження збудником септоріозу (1 – фаза виходу в трубку, 2 – фаза колосіння-цвітіння, 3 – молочної стиглості зерна)

Оцінка за шкалою Саарі та Прескотта показує, що у варіанті з обробкою донором NO і щавлевою кислотою була найнижча ступінь ураження листків у обох вивчених нами сортів пшениці, що дозволило їм сформувати вищий врожай, порівняно з необробленими рослинами. Однак сорт Недра виявляє підвищену стійкість до септоріозу, порівняно з сортом Етюд. Ураження необроблених рослин пшениці септоріозом було на 10-15% вищим, ніж у рослин, попередньо оброблених донором NO і щавлевою кислотою.

Аналіз структури врожаю показав, що в уражених септоріозом рослин зменшується висота, площа листової поверхні та кількість зе-

рен в колосі. Крім того, характерним є значне ураження зернівок, що проявляється у вигляді некротичних плям на поверхні сформованого зрілого зерна. Зернівки нерідко мали неправильну форму, були недостатньо виповненими. Обробка рослин донором NO та щавлевою кислотою затримує розвиток хвороби, що дозволяє рослинам розвинути більшу площу асиміляційної поверхні листків, збільшити висоту стебла порівняно з інфікованими рослинами, які не обробляли елісаторами. Захисна дія вивчених нами елісаторів призводить до зменшення ураження зернівок, що дозволяє сформувати виповнене зерно без некротичних плям, одночасно збільшується кількість зерен в колосі.

Висновки

Дослідження динаміки активності АПО та цитоплазматичної пероксидази дозволило встановити, що формування відповіді на проникнення патогена відбувається у короткий проміжок часу і проявляється у підвищенні активності цитоплазматичної пероксидази, що індукує посилений синтез лігніну для механічного зміцнення

клітинної стінки. Зміни активності АПО відображають функціонування фотосинтетичного метаболізму в клітинах листового мезофілу. Використані нами елісатори індукують захисні реакції, які стримують розвиток септоріозу у рослин пшениці.

Література

1. Дмитриев А.П., Гродзинский Д.М., Полищук В.П. Индуцирование системной устойчивости у растений биогенными индукторами // Вісник Харківського націон. аграрного ун-ту. Серія Біологія. – 2005. – №3. – С. 24-36.
2. Жук І.В., Дмитрієв О.П. Вплив екзогенного оксиду азоту на індукування неспецифічної стійкості ярої пшениці в польових умовах// 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. Т.3: присв. 125-річчю від дня народження М.І. Вавилова – К.: Логос, 2012 – С. 440-445.
3. Жук І.В., Лісова Г.М., Довгаль З.М., Дмитрієв О.П. Індукування щавлевою кислотою стійкості рослин пшениці *Triticum aestivum* L. до ураження септоріозом // Тезиси докладов Научно-практической конференції “Адаптационные стратегии живих систем», 11-16 июня, 2012, Новый Свет, Украина. – Киев: Издатель В.С. Мартынюк, 2012. – С. 251-252.
4. Методи селекції и оцінки стійкості пшениці и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. – Прага, 1988. – 321 с.
5. Озерецковская О.Л. Индуцирование устойчивости растений к вирусам биогенными элиситорами фитопатогенов // Прикл. биохимия и микробиология. – 1994. – Т. 30. – С. 325–339.
6. Hancock J. T., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Neill S. J. Cell signalling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species // Plant Physiol. Biochem. – 2002. – Vol. 40. – 611–617.
7. Kyoung Su Kim, J.-Y. Min, M. B. Dickman. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development //Molecular-plant microbe interactions. – 2008. – Vol. 21, №5. – P. 605–612.
8. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts // Plant Cell Physiol. – 1981. – Vol. 22. – P. 867-880.
9. Seevers P. M., Daly J., Catedral F.F. The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease // Plant Physiol. – 1971 – Vol. 48, №3. – P. 353-360.
10. Takahama U., Oniki T. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in apoplast of spinach leaves by ascorbate // Plant Cell Physiol. – 1992 – Vol. 33, №4 – P. 379-387
11. Xu M.-J., Dong J.-F., Zhu M.-Y. Nitric Oxide Mediates the Fungal Elicitor-Induced Hypericin Production of *Hypericum perforatum* Cell Suspension Cultures through a Jasmonic-Acid-Dependent Signal Pathway // Plant Physiology. – 2005. – Vol. 139. – P. 991–998.

ZHUK I.V., DMITRIEV A.P.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering

Ukraine, 03680, Kyiv, 148 Acad. Zabolotnoho St., e-mail iren_zhuk@mail.ru

INDUCTION OF WHEAT DEFENSE RESPONSES AGAINST *Septoria tritici* AGENT

Aims. The usage of biological elicitors for plant defense responses against plant pathogenic fungi may initiate tolerance of plants and prevent environmental pollution. The aim of research was to investigate the regulator role of NO and oxalic acid in induction of wheat defense responses against *Septoria tritici* agent during ontogenesis. **Methods.** The peroxidase and ascorbateperoxidase were measured in leaves of spring wheat plants varieties Nedra and Etud upon treatment of donor NO – sodium nitroprusside – and oxalic acid and leaf blotch infection during ontogenesis. The morphometric parameters, degree of plant lesion and yield structure were analyzed. **Results.** Results obtained suggest that biotic elicitors - nitric oxide (NO) and oxalic acid induce wheat two cultivars (Nedra and Etud) defense responses against leaf blotch agent *Septoria tritici*. Initiation of defense responses in elicitor-treated plants occurs in a short period of time. Biochemical nature of defense responses elicitation revealed an increase activity of cytoplasmic peroxidase (CP) which induces lignin synthesis for mechanical strengthening of the cell wall. It is also shown that changes in activity of ascorbateperoxidase (APO) reflect the functioning of the photosynthetic metabolism in leaves cells mesophyllous.

Key words: wheat, *Septoria tritici*, NO, oxalic acid, plant defense responses.

ЗАМБРІБОРЩ І.С.¹, ШЕСТОПАЛ О.Л.¹, ДОБРОВА Г.О.¹, ШПАК Д.В.²

¹ Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

² Інститут рису Української академії аграрних наук

Україна, 75705, с. Антонівка, Скадовський р-н, Херсонська обл, e-mail: shpak_dmitry@mail.ru

ОСОБЛИВОСТІ АНДРОГЕНЕЗУ *IN VITRO* МІЖСОРТОВИХ ГІБРИДІВ *ORYZA SATIVA* L. УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Отримання гаплоїдів через культуру ізольованих пиляків представляє альтернативу традиційним селекційним підходам з поліпшення найважливішої сільськогосподарської культури у світі – рису посівного (*Oryza* spp.). Головною перевагою використання гаплоїдів в селекції є створення гомозиготних ліній в короткий термін [1, 2]. Багато сортів та поліпшених селекційних ліній отримано на основі культури пиляків у Китаї, Кореї, Японії та США. У КНР за допомогою культури пиляків отримано понад 100 нових сортів рису [3]. На Філіппінах цим методом виведено сорт PSBRc50 [4]. Гаплоїди також є цінними для виявлення та виправлення небажаних рецесивних ознак, утворених в результаті мутацій [5] або гібридизації [6]. Як показано різни-

Матеріали і методи

В якості рослинного матеріалу застосовували пиляки гібридів F₂: Світлий × УкрНКС 8000 (№112); Янтарь × Серпневий (№114); Престиж × Лідер (№118); Hashiri-moshi × Лідер (№123); Престиж × Віконт (№128), які вирощували в умовах рисових зрошувальних систем Інституту рису НААН (м. Скадовськ). Волоті зрізали, коли мікроспори (вакуолізовані) більшості пиляків знаходились на середньо-пізній стадії розвитку.

Попередньо зрізані волоті, які знаходилися у покривному листку, поміщали у воду, обгортали фольгою листя та поміщали у кліматичну камеру при температурі +8...+10°C на 4 – 8 діб.

Цитологічний контроль стадії розвитку мікроспор у пиляках проводили шляхом приготування тимчасових мікропрепаратів пиляків, забарвлених оцетокарміном [11], під світловим мікроскопом. Волоті звільняли від покривного листка та поміщали у чашки Петрі діаметром 150 мм для стерилізації, яку проводили наступним чином: волоті заливали розчином комерційного препарату «Білізна» протягом 5 хв., злива-

Результати та обговорення

За результатами проведеного дослідження оцінки гаплопродукційної здатності п'яти гібридів F₂ рису, вирощеного у чеках Інституту рису

ми авторами, частота індукції у рису коливатиметься від 10 до 100% в залежності від генотипу [7]. Високий відсоток диплоїдних регенерантів із калусів у культурі пиляків рису – часте явище, яке є результатом спонтанної диплоїдизації гаплоїдів і відіграє важливу роль в одержанні гомозиготних рослин за короткий період. Методи отримання подвоєних гаплоїдів прискорюють цикл розмноження рису мінімум удвічі [8].

В Україні розробок у біотехнологічному напрямку з отримання подвоєних гаплоїдів із використанням культури ізольованих пиляків не проводили, хоча необхідність у цих роботах існує. Тому метою дослідження є вивчення особливостей андрогенезу *in vitro* *Oryza sativa* L. та розробка методів індукції ембріодогенезу.

ли його, додавали 0,05 н. розчин HCl (10 хв.) з наступним п'ятиразовим промиванням стерильною дистильованою водою.

Для індукції новоутворень використали поживне середовище N6 за модифікацією Herath et al. [12] з додаванням регуляторів росту: 1-нафтилоцтова кислота (НОК) – 1 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) – 3 мг/л та кінетин 1 мг/л; і 50 г/л сахарози. Для новоутворень використали 2 варіанти поживних середовищ: середовище I – МС з додаванням 1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) та 0,5 мг/л НОК; середовище II – МС з додаванням 2 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК. Для регенерації використали поживне безгормональне середовище МС з половинним вмістом макро- та мікросолей.

Пиляки експлантували на поживні середовища у чашці Петрі діаметром 60 мм, закривали парафільмом та культивували у темряві при +25°C. Новоутворення пересаджували на відповідні середовища та культивували на світлі при +26°C.

НААН (м. Скадовськ), показана висока чутливість даних форм до створених умов культивування пиляків *in vitro*. Слід наголосити, що зна-

чний рівень, як формування новоутворень, так і регенерації з останніх був характерним для усіх наданих гібридних комбінацій (табл. 1).

Слід зазначити, що на теренах України дослідження в галузі біотехнології з отримання *in vitro* гаплоїдів рису розпочаті лише у 2011 році. Використання в роботі з гаплоїдії оригінальних напрацьованих методик дослідників з так званих «рисових» країн не є доцільним та результативним. Кліматичні відмінності нашого регіону зумовлюють специфічні умови вирощування рису в Україні, і як, наслідок – створення унікальних генотипів, пристосованих до нашого регіону. Отже, наші сорти і гібриди будуть по-іншому реагувати на надані у протоколах китайських

дослідників умови культивування пиляків *in vitro*, тому наші дослідження були спрямовані на модифікацію та адаптування відомих методик до наших умов.

За різними літературними джерелами, попередня обробка видалених з рослини волотей рису триває у воді від 5 до 14 діб за діапазону низьких позитивних температур +4...+10°C у темряві. У зв'язку з цим, з метою визначення оптимального строку попередньої обробки, ми витримували зрізані волоті у воді при +8...+10°C протягом 4 – 8 діб. Кожен день, починаючи з четвертого, висаджували пиляки на поживне середовище N₆ і оцінювали кількість отриманих новоутворень (рис. 1).

Таблиця 1. Ефективність гаплопродукції в культурі пиляків *in vitro* рису

Генотип	Кількість пиляків	середовище	Кількість новоутворень, шт.	Кількість рослин-регенерантів			
				зелених		альбіно	
				шт.	шт./ на 100 новоутворень	шт.	шт./ на 100 новоутворень
112	1790	1	358	96	26,82 ± 2,34	61	17,04 ± 2,58
		2	332	39	11,75 ± 1,77	32	9,64 ± 2,56
114	2427	1	267	74	27,72 ± 2,74	37	13,86 ± 2,95
		2	241	86	35,68 ± 3,09	31	12,86 ± 2,98
118	1489	1	497	103	20,93 ± 1,82	69	13,88 ± 2,07
		2	457	112	24,51 ± 2,01	52	11,38 ± 2,34
123	1367	1	225	59	26,22 ± 2,93	32	14,22 ± 3,11
		2	232	55	24,14 ± 2,81	52	22,41 ± 3,28
128	1344	1	304	81	26,64 ± 2,54	36	11,84 ± 2,75
		2	321	74	23,36 ± 2,36	53	16,51 ± 2,79

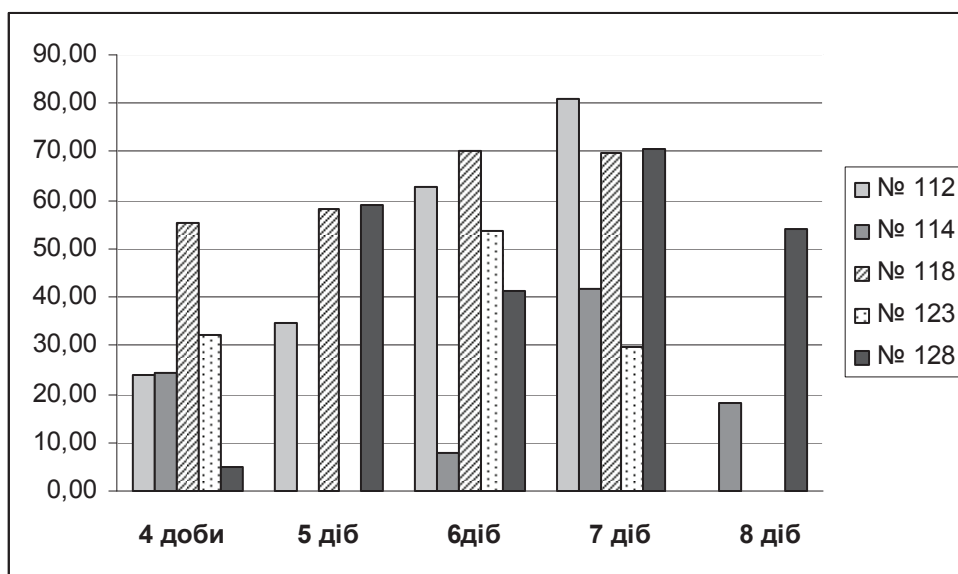


Рис. 1. Формування новоутворень (шт./100 висаджених пиляків) у культурі *in vitro* пиляків рису за різної тривалості попередньої холодової обробки волотей

Для всіх досліджених гібридів найбільший рівень новоутворень виявили у варіанті попередньої обробки волотей на 6 або 7 добу. Таким чином, виявлено, що за умов вирощування рису в Україні (можливо, для даних генотипів) найефективніше проводити 6–7 добу попередню обробку волотей.

Тестування двох запропонованих [13, 14] поживних середовищ для отриманих новоутворень і подальшої регенерації: МС з БАП та МС з кінетином показало, що обидва середовища сприяли регенерації як зелених, так і альбіносних рослин (рис. 2).

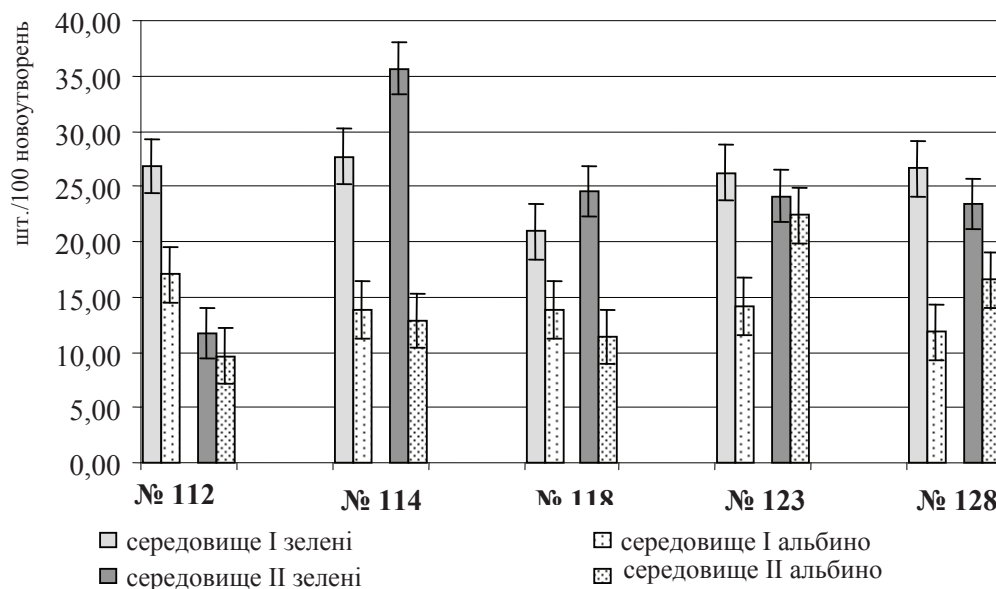


Рис. 2. Вплив поживного середовища на регенерацію рослин (зелених та альбіно) в культурі *in vitro* пиляків рису: середовище I – МС з додаванням 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК; середовище II – МС з додаванням 2 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК

Досить високий рівень регенерації зелених рослин спостерігали у всіх досліджених генотипів (від $11,75 \pm 1,77$ до $35,68 \pm 2,74$ шт. на 100 отриманих новоутворень). Однак, високою була й кількість отриманих альбіносних рослин ($9,64 - 22,41$ шт./100 пиляків) (табл. 1, рис. 2). Надалі зелені рослини-регенеранти пересаджували на безгормональне поживне середовище МС з половинною концентрацією солей.

Аналіз отриманих даних (рис. 2) виявив, що середовище I є найбільш придатним для гібриду № 112, а середовище II – для № 114. Для

трьох інших – різниці між показниками регенерації зелених рослин не виявлено. Цікаво, що співвідношення рослин-регенерантів «зелені/альбіно», які отримані на одному середовищі для трьох гібридів вище для середовища I, а для двох інших – для середовища II (рис. 3).

Таким чином, на етапі культивування новоутворень для формування «точок регенерації» рослин доцільним є використання двох досліджених поживних середовищ з метою отримання максимальної кількості зелених рослин-регенерантів.

Висновки

1. Шляхом андрогенезу *in vitro* із пиляків п'яти генотипів рису отримано 779 зелених рослин-регенерантів, які висаджені у ґрунт та передані для подальшої адаптації до умов *ex vitro* в Інститут рису (м. Скадовск). 2. Показано, що за наших умов вирощування рису для збільшення рівня формування новоутворень в культурі пиляків *in vitro* доцільно проводити 6-7 добу попередню обробку волотей у воді при $+8...+10^{\circ}\text{C}$.

3. Для культивування *in vitro* новоутворень рису з метою формування максимальної кількості зелених рослин-регенерантів від генотипів з невідомою гаплопродукційною здатністю слід одночасно використовувати два поживних середовища: МС з додаванням 1 мг/л БАП та 0,5 мг/л НОК та МС з додаванням 2 мг/л кінетину та 0,5 мг/л НОК.

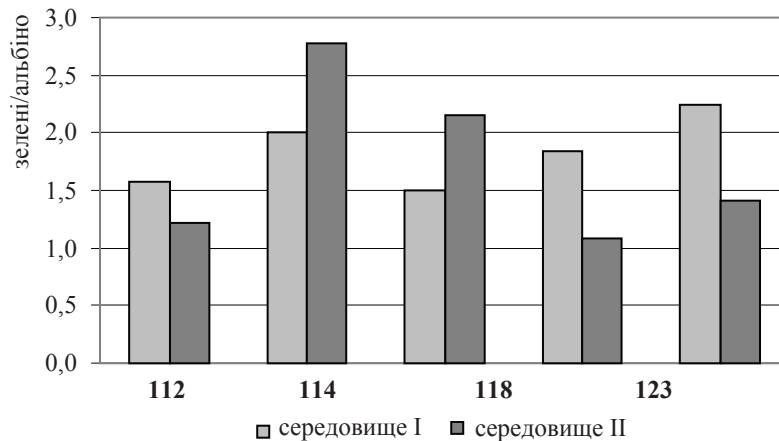


Рис. 3. Вплив складу поживного середовища на співвідношення утворених зелених та альбіносних рослин-регенерантів

Література

1. Khush G.S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice // *Plant Mol. Biol.* – 1977. – Vol. 35. – P. 25-34.
2. Zhu D.Y., Sun Z.X., Pan X.G., et al. Use of anther culture in hybrid rice breeding / *Proceedings of the 3rd International Symposium of Hybrid Rice.* – 1998. – Philippines. – Cap. 21. – P. 268-281.
3. Meifang L.I. Anther culture breeding of rice at the CAAS / 1992 In: K. Zheng and T. Murashige (eds.). – 1992. – P. 75-85.
4. Zhang Z.H., Chu Q.R. Advance in rice anther culture for varietal improvement in China // *J. Agric. China.* – 1986. – 2 Suppl. – P. 10-16.
5. Chen Q.F., Wang C.L., Lu Y.M., Shen M., Afza R., Duren M.V., Brunner H. Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement // *Euphytica.* – 2001. – Vol. 120. – P. 401-408.
6. He T., Yang Y., Tu S.B., Yu M.Q., Li X.F. Selection of Interspecific Hybrids for Anther Culture of Indica Rice // *Plan Cell, Tissue and Organ culture.* – 2006. – Vol. 86. – P. 271-277.
7. Wang C.C., Sun C.S., Chu C.S., Wu S.C. Studies on the albino pollen plantlets of rice // *Proc. Symp. Plant Tissue Cult. Science Press, Peking.* – 1978. – P. 149 – 160.
8. Maria A.M., Adriana S., Ana M.G. Plant regeneration from rice anthers cryopreserved by an encapsulation/deshydration Technique // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2006. – Vol. 42. – P. 31-36.
9. Harushima, Y., Yano, M., Shomura, A., Sato, M., Shimano, T. A high density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population // *Genetics.* – 1998. – Vol. 148. – P. 479-494.
10. Змеева В. Н. Тенденции изменчивости некоторых хозяйственно-полезных признаков в популяциях соматолонов и андрогенных дигаплоидов риса *Oryza sativa* L.: автореф. дисс... канд. биол. наук: спец. 03.00.12 «Биотехнология» / В. Н. Змеева. – Владивосток, 1995. – 27 с.
11. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений: учебник [для студ. высших учеб. заведений] / З. П. Паушева. – М.: Агропромиздат, 1988. – 270 с.
12. Herath H.M.I., Bandara D.C., Samarajeewa P.K. Effect of culture media for another culture of indica rice varieties and hybrids of indica and japonica // *Tropical agricultural research & extension.* – 2007. – Vol. 10. – P. 17-22.11.
13. Tala Gueye and Khadidiatou Ndoeye Ndir *In vitro* production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material // *Scientific Research and Essays.* – 2010. – Vol. 5, №7. – P. 709-713.
14. H.M.I. Herath, D.C. Bandara, P.K. Samarajeewa, D.S. A. Wijesundara Effect of low temperature pre-treatment on anther culture in selected indica, japonica rice varieties and their inter sub-specific hybrids // *Cey. J. Sci. (Bio. Sci.).* – 2009. – Vol. 38, №1. – P. 11-16.

ZAMBRIBORSHCH I.S.¹, SHESTOPAL O.L.¹, DOBROVA H.O.¹, SHPAK D.V.²

¹Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road 3, e-mail: izambriborsh@gmail.com

²Rice Research Institute at Ukrainian Academy of Agrarian Sciences
Ukraine, 75705, Kherson region, Skadovsk district, Antonovka village,
e-mail: shpak_dmitry@mail.ru

THE FEATURES ANDROGENESIS IN VITRO OF INTERVARIETIES HYBRIDS OF ORYZA SATIVA L. FROM UKRAINIAN SELECTION

Aims. Testing morphogenetic potential of microspores in anther culture of F₂ hybrids by cultivation in South of Ukraine. **Methods.** Obtaining of rice double haploid lines by anther culture *in vitro*. The statistical meth-

ods. **Results.** In anther culture of rice the sterilization conditions of explants, the optimal time were tailored. The culture media for callus induction and for subsequent regeneration was tested. The 779 green plants-regenerants were received. **Conclusions.** To increase the formation of embryo like structures in anther culture of rice panicles should be incubated for the pretreatment in water at 8-10°C during 6-7 days. The simultaneous use of two culture media MC: 1) with the addition of 1 mg / l BAP and 0.5 mg / L NOC, 2) with the addition of 2 mg / l kinetin and 0.5 mg / L NAA promotes by formation of maximum number of green plants-regenerants.

Key words: rice hybrids, anther culture *in vitro*, double haploid.

ЗАРДИНОВА Г.Р., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я.

*Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского
Россия, 241036, г. Брянск, ул. Бежицкая, 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru*

ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ ГИПОКОТИЛЯ РАЗНЫХ СОРТОВ УЗКОЛИСТНОГО ЛЮПИНА (*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*)

Разработка системы регенерации и трансформации люпина, как одной из важных кормовых культур, в настоящее время является актуальной проблемой. Получение трансгенных форм люпина позволит в дальнейшем создать новые сорта, устойчивые к антракнозу – широко распространенному грибному заболеванию, которое значительно снижает урожайность люпина [1]. При этом успешная трансформация невозможна без разработки приемов культивирования *in vitro* и получения растений-регенерантов [2].

Решением проблемы регенерации люпина *in vitro* занимались российские и зарубежные ученые [2-11]. Исследовалось влияние различных гормонов и состава питательных сред на регенерацию люпина *in vitro*, изучался регенерационный потенциал различных типов эксплантов. Так, Daza & Chamber получили регенерацию жизнеспособных растений на эксплантах из гипокотилей люпина желтого [4]. В 1997 году Molvig с сотрудниками получили прямой стеблевой морфогенез из меристематических тканей незрелых зародышей люпина на модифицированной среде MS [5]. В работе Костюченко Д.А. (Брянская государственная инженерно-технологическая академия) показано положительное влияние гибберелловой кислоты на раз-

витие побегов и дальнейшее укоренение регенерантов люпина, предложены схемы введения в культуру *in vitro* незрелых зародышей, верхушечных и пазушных почек трех видов люпина [6, 7]. В лаборатории молекулярной биологии Института проблем химической физики РАН был разработан метод клонального микроразмножения из пазушных почек проростков люпина узколистного на среде MS с концентрацией БАП 0,5 мг/л. Показано, что добавление ИМК в питательную среду на этапе размножения повышает эффективность ризогенеза микропобегов люпина после 3-6 пассажей [8].

Как и у многих бобовых, у люпина способность к регенерации *in vitro* во многом определяется генотипом, что является одной из причин низкой воспроизводимости разрабатываемых систем регенерации и трансформации. Наличие сортовой специфичности люпина при культивировании *in vitro* делает необходимым выявление сортов с наибольшим морфогенным потенциалом и объясняет актуальность оптимизации условий регенерации применительно к конкретным видам и сортам люпина.

В данной работе на сортах люпина узколистного селекции ВНИИ люпина нами изучено влияние экзогенных фитогормонов на регенерацию *in vitro* растений из ткани гипокотилей.

Материалы и методы

Работу проводили на 5 сортах люпина узколистного (*Lupinus angustifolius*): Белозерный 110, Кристалл, Снежень, Витязь, Смена. Семенной материал предоставлен ВНИИ люпина.

Для введения в культуру *in vitro* были использованы экспланты, изолированные из гипокотилей проростков люпина 3-4-дневного воз-

раста. Стерилизация исходного материала проводилась по следующей схеме: семена промывали проточной водой, затем их выдерживали 10 мин в концентрированной серной кислоте, что способствовало снятию твердокаменности семян и индукции прорастания, после чего семена промывали пятикратно стерильной дистиллиро-

ванной водой. Затем семена проращивали в асептических условиях на влажном фильтре при 22°C. Из полученных 3-4-дневных проростков выделяли экспланты – отрезки гипокотилей (поперечно и продольно срезанные) длиной около 2-3 мм, которые помещали на агаризованную питательную среду. Первые 10 дней проводили темновую преинкубацию эксплантов, затем их культивировали на свету при 22°C и 16-часовом

фотопериоде. Продолжительность пассажа составляла 3 недели.

Были использованы питательные среды, содержащие половинные концентрации минеральных компонентов по прописи Мурасига-Скуга ($\frac{1}{2}$ MS) и витамины по прописи Гамборга (B₅) (концентрация аскорбата 25 мг/л). Концентрация сахарозы составляла 30 г/л, концентрация агара – 0,7%.

Результаты и обсуждение

В индукции регенерации растений *in vitro* ключевую роль играют фитогормоны и их синтетические аналоги, а именно цитокинины в сочетании с ауксинами. В данной работе сравнивали действие различных регуляторов роста: цитокининов – тидиазурона (ТДЗ) и 6-бензиламинопурина (БАП), ауксинов – β -

индолилуксусной кислоты (ИУК) и 1-нафтилуксусной кислоты (НУК). В 3-х вариантах был использован гормон стресса – абсцизовая кислота (АБК) в сочетании с БАП и ИУК. Концентрации фитогормонов и их сочетания приведены в таблице 1.

Таблица 1. Варианты гормонального состава питательных сред для регенерации *in vitro* люпина узколистного

Номер варианта	Питательная среда	Фитогормоны (мг/л)				
		БАП	ИУК	ТДЗ	НУК	АБК
1	$\frac{1}{2}$ MS	0,5	1	-	-	-
2	$\frac{1}{2}$ MS	1	1	-	-	-
3	$\frac{1}{2}$ MS	2	1	-	-	-
4	$\frac{1}{2}$ MS	4	1	-	-	-
5	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	0,3	0,2	-
6	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	0,5	0,2	-
7	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	1	0,2	-
8	$\frac{1}{2}$ MS	-	-	1,5	0,2	-
9	$\frac{1}{2}$ MS	1	1	-	-	0,5
10	$\frac{1}{2}$ MS	1	1	-	-	1,5
11	$\frac{1}{2}$ MS	1	1	-	-	3

Полученные результаты показали, что на среде $\frac{1}{2}$ MS, содержащей ТДЗ в диапазоне концентраций 0,3-1,5 мг/л, наблюдался активный каллусогенез без морфогенеза. На поверхности экспланта образовался бледно-желтый каллус средней плотности, по краям и в середине экспланта – каллус зеленого цвета. Сортовые различия не наблюдались.

На среде с АБК также получен только каллусогенез, причем при концентрации 3 мг/л замечено меньше очагов каллусообразования, чем при 0,5 мг/л АБК. Каллус большей частью белого цвета, в середине экспланта – светло-зеленого. На некоторых эксплантах был отмечен ризогенез.

На среде $\frac{1}{2}$ MS с БАП и ИУК по краям эксплантов наблюдалось образование рыхлого белого каллуса, в середине эксплантов – более

плотного, светло-зеленого. Было замечено, что процессы каллусогенеза у всех сортов люпина шли более интенсивно на среде с 0,5-1 мг/л БАП.

Кроме того, у 3-х сортов люпина в этом варианте опыта было получено стеблеобразование. При концентрации БАП 0,5 мг/л наблюдался первичный стеблевой морфогенез только у сорта Снежень с частотой 16,7 %. У этого же сорта развитие побегов было отмечено и на среде с 2 мг/л и 4 мг/л БАП (рис. 1, А). У сортов Кристалл и Витязь регенерация побегов наблюдалась при концентрации БАП 2 и 4 мг/л (табл. 2). Следует отметить, что побеги на среде с БАП 2-4 мг/л слабо развивались, были укороченные, быстро витрифицировались. Возможно, высокие концентрации БАП оказывают негативное влияние на морфологию побегов.

А



Б

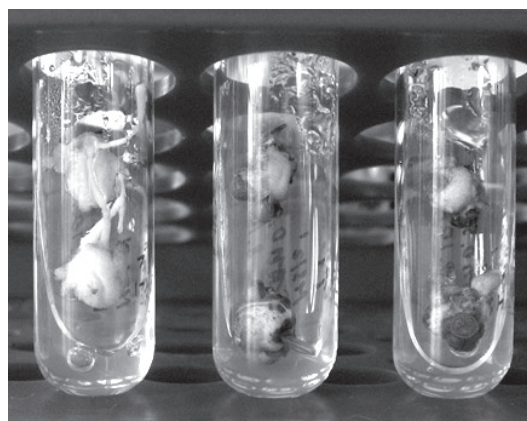


Рис. 1. Экспланты из гипокотилей люпина узколистного: А – сорт Снежень, стеблевой морфогенез на среде с 2 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК; Б – сорт Белозерный 110, корневой морфогенез на среде с 0,5 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК

Таблица 2. Влияние концентрации БАП в питательной среде на процент побегообразования на эксплантах из ткани гипокотилей люпина узколистного

Сорта люпина	Концентрация фитогормонов, мг/л			
	0,5 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК	1 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК	2 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК	4 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК
Белозерный 110	0	0	0	0
Кристалл	0	0	16,7	8,3
Снежень	16,7	0	16,7	8,3
Витязь	0	0	8,3	0
Смена	0	0	0	0

На питательных средах с низкими концентрациями БАП (0,5-1 мг/л) на эксплантах был отмечен ризогенез (рис 1, Б). Наибольшей способностью к корнеобразованию обладали экспланты сорта Белозерный 110 (рис. 2). На среде

с 4 мг/л БАП корней не было. Полученные результаты свидетельствуют о том, что высокие концентрации БАП в среде культивирования подавляют корнеобразование.

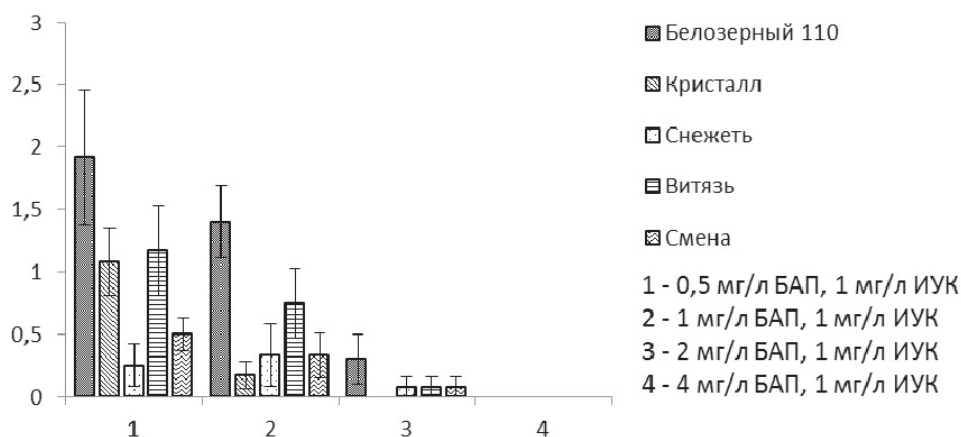


Рис. 2. Влияние концентрации БАП в культуральной среде на ризогенез эксплантов из гипокотилей люпина узколистного

При дальнейшем культивировании калусной ткани вторичный морфогенез не был получен ни в одном варианте опыта, что подтверждает от-

меченную другими авторами сложность получения непрямого органогенеза в культуре ткани большинства бобовых, и в частности люпина [12].

Выводы

Таким образом, можно сделать вывод о том, что среди исследованных сортов люпина узколистного наибольшую способность к морфогенезу в культуре *in vitro* проявили сорта Кристалл и Снежеть. Наиболее подходящей для

регенерации побегов на эксплантах гипокотыля оказалась питательная среда с 2 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК. Полученные результаты могут являться основой для дальнейшей разработки системы регенерации люпина узколистного.

Литература

1. Такунов И. П. Люпин – настоящее и будущее // 20 лет Всероссийскому научно-исследовательскому институту люпина: сб. науч. трудов. – Брянск. – 2007. – С. 15-41.
2. Фоменко Т.И., Малюш М.К. Особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* люпина узколистного // Физиология и биохимия культ. растений. – Киев. – 2010. – Т. 42, №4. – С. 306-314.
3. Фоменко Т.И., Малюш М.К., Заякин В.В., Нам И.Я. Морфогенетический потенциал тканей люпина узколистного в культуре *in vitro* // Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные проекты и бионанотехнология: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых. – Брянск. – 2010. – С. 129-135.
4. Daza A. & Chamber M.A. Plant regeneration from hypocotyl segments of *Lupinus luteus* cv. L. Aurea // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1993. – Vol. 34. – P. 303-305.
5. Molvig L., Tabe L.M., Eggum B.O. et al. Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius*L.) expressing a sunflower seed albumin gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94. – P. 8393-8398.
6. Костюченко Д. А. Биотехнологические приемы расширения исходного материала для селекции люпина // Автореф. диссерт. на соискание ученой степени канд. сел.-хоз. наук. – Брянск. – 2004.
7. Костюченко В.И., Костюченко Д.А., Пигарева С.А., Яговенко Т.В. Развитие незрелых зародышей трех видов люпина на различных питательных средах // Биологический и экономический потенциал зернобобовых и крупяных культур и пути его реализации. – Орел. – 1999. – С. 136-142.
8. Балакина А.А. Влияние условий культивирования *in vitro* на морфогенные процессы и активность ферментов антиоксидантной системы в растениях люпина узколистного// Автореф. диссерт. на соискание ученой степени канд. биол. наук. – Москва. – 2012.
9. Добровольский С.А., Кубарев В.С., Шишлов М.П. Получение регенерантов люпина в культуре *in vitro* // Генетика и биотехнология 21 века. Фундаментальные и прикладные аспекты: Материалы Международной научной конференции. – Минск. – 2008. – С. 71-73.
10. Полякова М.Н., Балакина А.А., Мартиросян Ю.Ц., Диловарова Т.А., Кособрюхова А.А. Морфогенез растений рода *Lupinus in vitro* и изучение влияния света различного спектрального состава на рост, развитие и регенерационный потенциал растений // Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых. – Брянск. – 2009. – С. 205-208.
11. Pniewski T., Kapusta J., Legocki A.B. *In vitro* micropropagation of four lupin species // Acta Physiol. Plant. – 2002. – Vol. 24, № 4. – P. 417-424.
12. Somers D.A., Samac D.A., Olhoft P.M. Recent Advances in Legume Transformation // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 131. – P. 892-899.

ZARDINOVA G.R., ZAYAKIN V.V., NAM I.YA.

Bryansk State University named after academician I.G. Petrovsky
Russia, 241036, Bryansk, Bezhitskaya str., 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru

THE INFLUENCE OF PLANT HORMONES ON MORPHOGENESIS OF *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* HYPOCOTYLS EXPLANTS

Aim. Lupin, like many legume crops, shows high sensitivity to conditions *in vitro*. Therefore, we studied the effects of different plant hormones on the shoot regeneration from tissues of lupine hypocotyls. **Methods.** Explants of aseptic lupine seedlings cultivated on a ½ Murashige and Skoog basal medium with different hormonal composition. **Results.** Direct morphogenesis was obtained in 3 out of 5 varieties of lupine explants on MS basal medium with 6-benzilaminopurine. **Conclusions.** Lupine hypocotyl tissue can be used for development of system for lupin regeneration.

Key words: *Lupinus angustifolius*, hypocotyls, callus, direct morphogenesis, rhizogenesis.

ЗЕЛЕНИНА Е.А.^{1,2}, МАШКИНА О.С.^{1,2}

¹ Воронежский государственный университет

Россия, 394006, г. Воронеж, ул. Университетская площадь, 1,
e-mail: katy-green2009@yandex.ru

² ФГУП НИИ лесной генетики и селекции

Россия, 394087, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛЛЕКЦИИ КЛОНОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ (*BETULA PENDULA* Roth var. *carelica* Merkl.) В ДЛИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Одним из современных подходов сохранения *ex situ* ценных и уникальных генотипов древесных растений является создание живых коллекций в условиях *in vitro* и их длительное культивирование (долгосрочное хранение). Важным при этом является сохранение генетической и хозяйственной ценности исходных экземпляров. Карельская береза, имеющая большую хозяйственную ценность благодаря декоративной узорчатой текстуре древесины, является сложным объектом для биотехнологических исследований из-за высокого полиморфизма, выявляемого на всех изучаемых уровнях организации: клеточном, хромосомном, тканевом, организменном. В силу ограниченности генетических ресурсов и низкого уровня естественного возобновления карельская береза оказалась в

Материалы и методы

Объектами исследования послужили 5 клонов карельской березы и клон березы повислой из коллекции ФГУП “НИИ лесной генетики и селекции” (г. Воронеж), поддерживаемые в длительной (14-20 лет) культуре. Экспланты взрослых (20-40-летних) деревьев были однократно введены в культуру *in vitro*, из них регенерированы растения, которые затем подвергались многолетнему субкультивированию с интервалом раз в 4-6 месяцев на безгормональной питательной среде по методике [2].

Три исходных дерева были отобраны С.В. Щетинкиным (дерево Ia высокоствольной формы) и Ю.Н. Исаковым (деревья Ш-3 высокоствольной формы и ПК-2 полукустовидной формы) на плантации карельской березы, созданной проф. М.М. Вересиным из семян финского происхождения. Исходное дерево 7319 полукустовидной формы отобрано Ю.Н. Исаковым в потомстве от свободного опыления дерева ПК-2. Данный генотип относится к “трудным” для микроклонального размножения. Жизнеспособный клон Л (мутантный неукореняющийся, формирующий каллусоподобное образование вместо корней) удалось получить только через

последние годы под угрозой исчезновения [1], поэтому сохранение ее ценного генофонда особенно актуально.

Ранее нами был предложен подход [2], уменьшающий вероятность возникновения соматоклональной изменчивости при многолетнем культивировании (полное исключение фитогормонов из состава питательных сред), что может обеспечить генетическую стабильность коллекции и способствовать сохранению ценных признаков исходных генотипов. Коллекция ценных генотипов карельской березы поддерживается нами таким способом свыше 14-20 лет [3].

Целью настоящих исследований явилось изучение цитогенетической стабильности коллекции клонов карельской березы, длительно культивируемой в условиях *in vitro*.

каллусные культуры. Триплоидное дерево карельской березы (1/39) отобрано А.В. Козьминым [4] в созданных им культурах из семян карельского происхождения. Часть этих ценных высокоузорчатых деревьев к настоящему времени погибла, поэтому проведение их цитогенетической оценки не представлялось возможным.

В коллекции представлены как нормальные по фенотипу клоны, так и аномальный (клон Л, формирующий каллусоподобное образование вместо корней). Клоны ПК-2, Ш-3 и 1/39 получены через меристемные, а клоны Ia и Л - через стеблевые каллусные культуры. Длительность культивирования клона Ia – 20 лет, остальных клонов (ПК-2, Ш-3, Л, 1/39) – 14 лет. Клон местной березы повислой, используемый в качестве контроля, культивируется также на протяжении 14 лет.

Цитогенетическую стабильность оценивали по частоте патологий митоза в корневой меристеме (или каллусе для клона Л) и уровню миксплоидии (процент клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модалного диплоидного набора хромосом). Частота патологий митоза (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 патологических митозов представлен как процентное от-

ношение каждого вида патологий к общему числу патологических митозов. Учитывали количество клеток с разным числом ядрышек и вычисляли их долю (в %).

Результаты и обсуждения

Показано, что клоны карельской березы из коллекции в длительной культуре (14-20 лет) на питательных средах без гормонов сохраняют свои цитогенетические (таблица) и фенотипиче-

ские особенности: нормальный (клоны Ia, Ш-3, ПК-2, 1/39) или мутантный (клон Л с комплексом измененных признаков) фенотип.

Таблица. Цитогенетическая характеристика клонов карельской березы и березы повислой, длительно культивируемых в условиях *in vitro*

Объект	Длительность культивирования, лет	% клеток с числом хромосом				Уровень миксоплоидии, %
		диплоидных, 2n = 28	триплоидных, 2n = 42	тетраплоидных, 2n = 56	анеуплоидных	
Карельская береза						
Клон Ia	1	74,5	–	–	25,5	25,5±2,6
	14	90,6	–	–	9,4	9,4±0,7* ¹
	20	90,4	–	–	9,6	9,6±1,1*
Клон Ш-3	14	83,0	–	–	17,0	17,0±2,4 ¹
Клон Л	14	64,4	0,2	–	35,4	35,6±3,0
Клон ПК-2	14	7,4	7,4	63,0	22,2	37,0±3,0
Исходное дерево 1/39	0	21,7	60,9	–	17,4	39,1±2,3
Клон 1/39	14	28,6	54,3	–	17,1	45,7±3,1
Береза повислая						
Клон П	14	91,8	–	–	8,2	8,2±1,2 ¹

Примечания: * различия с исходным клоном (1 год культивирования *in vitro*) достоверны при P < 0,01; ¹ различия с клоном Л достоверны при P < 0,01.

Все изученные клоны являются миксоплоидами, что в целом характерно для карельской березы [5]. Уровень миксоплоидии (процент клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модалного набора хромосом) зависел от генотипических особенностей клонов, способа их получения и длительности культивирования. Наиболее высокой геномной нестабильностью по числу хромосом отличались полиплоидные клоны 1/39 и ПК-2. Уровень миксоплоидии у них составил соответственно 45,7% и 37,0% (таблица). Тем не менее, клон 1/39 в целом сохранил уровень плоидности и миксоплоидии, присущие исходному дереву. В корневой меристеме микрорастений преобладали клетки с триплоидным набором хромосом (2n=3x=42) – 54,3%. На долю диплоидных клеток (2n=2x=28) приходится 28,6%, а анеуплоидных (гипердиплоидных с 30-34 хромосомами) и гипотриплоидных (с 36-40 хромосомами) – 17,1%. Клон ПК-2 оказался тетраплоидным с преобладанием в корневой меристеме (63,0%) клеток с 56 хромосомами. Остальные клетки приходились на

долю диплоидных (2n=28-7,4%), триплоидных (2n=42-7,4%) и анеуплоидных (22,2%). Возможно, полиплоидной природой анализируемого клона объясняется повышение у него количества ядрышек в интерфазных клетках (1-5 ядрышек против 1-2 – у остальных клонов). Можно предположить, что и исходное дерево было также полиплоидным, поскольку в мейозе при микроспорогенезе у него обнаружены нередуцированные микроспоры [6].

Среди диплоидных клонов карельской березы наименьший уровень миксоплоидии отмечен у клона Ш-3 (17%), тем не менее, он оказался в 2 раза выше по сравнению с клоном березы повислой (8,2%) аналогичной длительности культивирования *in vitro* (14 лет).

Цитогенетическое изучение рамет одного и того же клона Ia в процессе длительного культивирования *in vitro* (через год, 14 и 20 лет) показало, что с увеличением срока культивирования клон становился более однородным: наблюдалось существенное уменьшение (в 2,7 раза) уровня миксоплоидии, частоты ПМ (в 3 раза) и

спектра ПМ. Это может быть связано с клеточной и тканевой селекцией исходного миксоплоидного клона каллусного происхождения, характеризующегося в первые годы культивирования повышенной цитогенетической изменчивостью. Известно, что перепрограммирование генома (смена генетических и эпигенетических программ развития) при переходе клеток из дифференцированного к дедифференцированному состоянию и каллусообразованию сопровождается высоким уровнем геномной изменчивости [7]. Как показали наши исследования [8], снижение уровня миксоплоидии соматической ткани у клона Ia коррелировало с более поздним (начиная с 6-7 лет по сравнению с 4-5-летним возрастом у исходного клона) и менее выраженным в этом возрасте проявлением внешних признаков узорчатости древесины (вздутий на стволах). Тем не менее, у растений, полученных из культуры меристем или выращенных по обычной технологии (семенным путем) признаки узорчатости проявляются еще позже – в 10 – 12 лет, а иногда и в 20 лет.

При изучении диплоидных клонов разной длительности культивирования *in vitro* (Ia – 14 и 20 лет; Ш-3 и ПК-2 – 9 и 14 лет) различий в частоте патологий митоза не выявлено, это также свидетельствует об их цитогенетической стабильности.

Из трех проанализированных диплоидных

клонов наиболее высокой цитогенетической нестабильностью (а, следовательно, и генетической гетерогенностью соматических клеток) отличался фенотипически аномальный диплоидный клон Л, полученный через каллусные культуры. У него выявлены наибольшие (среди диплоидов) уровень миксоплоидии соматической ткани (35,6%), частота (8,7%) и спектр ПМ, рисунок 1.

Кроме того, у клона Л в соматических клетках каллуса была выявлена маркерная хромосома, фенотипически отличающаяся от всех остальных хромосом набора, которую мы условно назвали “рекомбинантная” или “ломкая” с сильно суженным районом плеча одной из 28-ми хромосом (рисунок 2). По-видимому, наблюдаемый сбой генетической программы развития, блокирующий нормальный ризогенез и приводящий к развитию аномального фенотипа, обусловлен комплексом генетических, эпигенетических и физиолого-биохимических факторов, в том числе достаточно высоким уровнем гетероплоидии соматической ткани (наблюдаемой на протяжении всего периода культивирования) и структурными нарушениями одной из хромосом. Известно, что перестройки хромосом вызывают существенные изменения экспрессии генов [9]. Подобный мутант представляет большой интерес для изучения генетики морфогенеза растений.

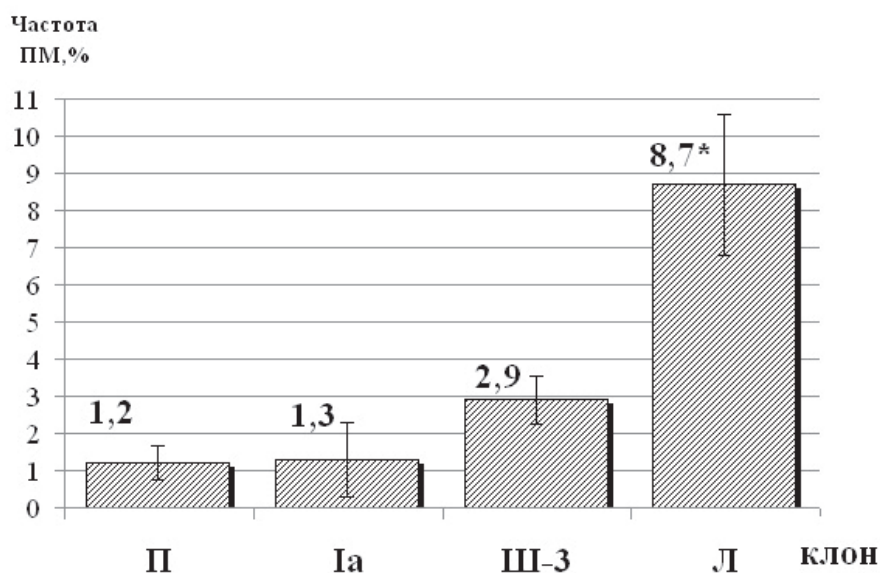


Рис. 1. Частота патологий митоза у растений диплоидных клонов березы после 14 лет культивирования *in vitro*.

* различия с другими клонами достоверны при $P < 0,01$

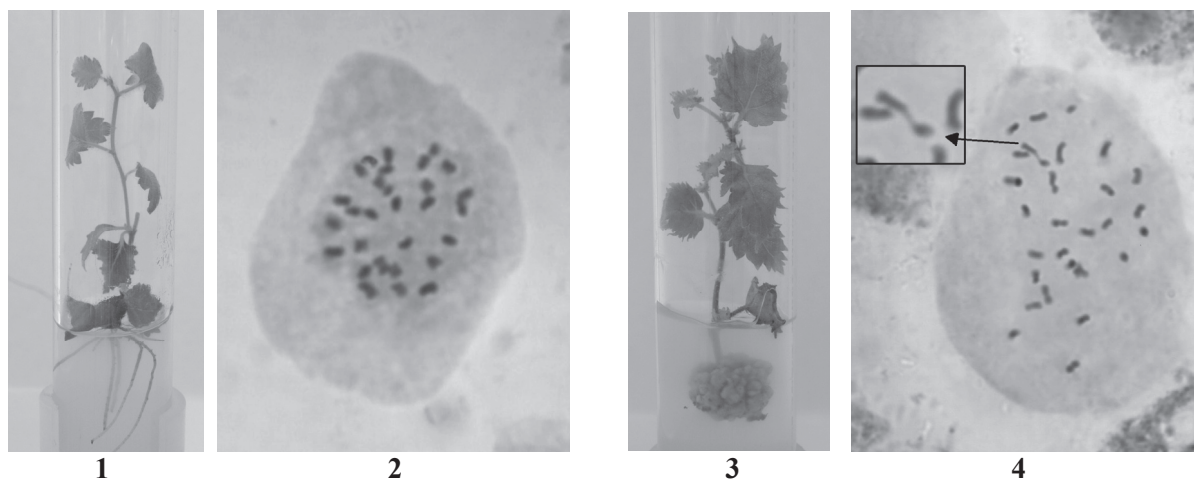


Рис. 2. Общий вид микрорастений и метафазные пластинки $2n=2x=28$ нормального клона Ш-3 (1, 2) и мутантного клона Л (3, 4). Указана морфологически измененная хромосома мутантного клона (4)

Выводы

Клоны узорчатых форм карельской березы, длительно культивируемые в условиях *in vitro*, характеризуются миксоплоидией. Уровень миксоплоидии соматической ткани (положительно коррелирующий с узорчатостью древесины) зависит от генотипических особенностей клонов, способа их получения и длительности культивирования. Наиболее высоким он был у полиплоидных клонов и диплоидных клонов, полученных через каллусные (а не меристемные) культуры.

Показано, что клоны карельской березы из коллекции в длительной культуре (14-20 лет) на питательных средах без гормонов сохраняют свои цитогенетические и фенотипические особенности: нормальный (клоны Ia, Ш-3, ПК-2, 1/39) или мутантный (клон Л с комплексом измененных признаков) фенотип. Поэтому предложенный нами подход длительного культивирования в условиях *in vitro* является эффективным методом для сохранения ценного генофонда карельской березы.

Литература

1. Ветчинникова Л.В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. – М.: Наука, 2005. – 269 с.
2. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Стародубцева Л.М. Длительное микрочеренкование для массового клонального размножения карельской березы и тополя // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, №6. – С. 950-953.
3. Машкина О.С., Табацкая Т.М. Стратегия долгосрочного хранения *in vitro* коллекции ценных генотипов карельской березы // Факторы экспериментальной эволюции организмов. Сб. научн. тр. Т. 11. – К.: ЛОГОС, 2011. – С. 349-354.
4. Козьмин А.В., Буторина А.К. Спонтанный триплоид березы карельской // Лесоведение. – 1985. – №6. – С. 71-75.
5. Буторина А.К. О природе узорчатости древесины у карельской березы // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов. – Воронеж: НИИЛГиС, 1993. – С. 40-47.
6. Соустова Н.М., Исаков Ю.Н. Особенности мейоза при микроспорогенезе у разных форм карельской березы // Проблемы лесоведения и лесоводства. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2005 – Вып. 63 – С. 179-181.
7. Кунах В.А. Онтогенетическая пластичность генома как основа адаптивности растений // Жебраковские чтения III: преобразование геномов. – Минск, 2011. – С. 1-53.
8. Машкина О.С., Буторина А.К., Табацкая Т.М. Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.) как модель для изучения генетической и эпигенетической изменчивости при формировании узорчатой древесины // Генетика. – 2011. – Т. 47, №8. – С. 1073-1080.
9. Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Хоцкина Е.А., Артемова Е.В. и др. Главное действие хромосомной перестройки – изменение работы регуляторных генов // Генетика. – 2004. – Т. 40, №7. – С.893-902.

ZELENINA E.A.^{1,2}, MASHKINA O.S.^{1,2}

¹Research Institute of Forest Genetics and Breeding

Russia, 394087, Voronezh, 105, Lomonosova str, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

²Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University

Russia, 394006, Voronezh, 1, Universitetskaya square, e-mail: katy-green2009@yandex.ru

CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF COLLECTION OF CURLY BIRCH CLONES LONG-TERM CULTIVATED *IN VITRO*

Aims. Studying of cytogenetic stability of long-term cultivated curly birch clones. **Methods.** Cytogenetic characteristic have included frequency of mitotic abnormalities and mixoploidy level. **Results.** Clones cultivated on hormone-free medium for over 14-20 years conserved their cytogenetic and morphological characteristics both in normal clones and in mutants. **Conclusions.** Long-term cultivation on hormone-free medium is an effective method for conservation of valuable genofond of curly birch.

Key words: Curly birch, cytogenetic stability, long-term cultivation, mixoploidy.

ЗІНЧЕНКО М. О., БАВОЛ А. В., ДУБРОВНА О. В

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

ГЕНОМНА МІНЛИВІСТЬ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО МЕТАБОЛІТІВ ЗБУДНИКА ОФІОБОЛЬОЗУ, ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ

Вивчення закономірностей і особливостей структурно-функціональної мінливості геному рослин за дії стресових чинників в умовах *in vitro* вносить суттєвий вклад у встановлення механізмів їх стійкості до несприятливих факторів довкілля. Встановлено, що абіотичні стресори індуюють мінливість та нестабільність геному в культурі *in vitro*, яка виявляється на різних рівнях досліджень [1, 2]. На цитологічному рівні показано, що за присутності осмотичних речовин в середовищі культивування спостерігається зниження мітотичної активності клітин, що супроводжується значними морфологічними та цитохімічними змінами ядер та ядерця [3]. Крім того, гіперосмолярність також створює вторинний окислювальний стрес, спричинений надмірною кількістю активних форм кисню. Такі активні форми кисню можуть викликати пошкодження клітинних структур і макромолекул, в тім числі ДНК, індуюючи утворення мутацій, зокрема делецій а також інші генетичні ефекти [4].

Одним із найбільш доступних і швидких способів виявити варіабельність, а потім з'ясувати природу соматональної мінливості є за-

стосування молекулярних маркерів, що ґрунтуються на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) [5]. IRAP-аналіз (inter retrotransposon amplified polymorphism) – метод ампліфікації геномної ДНК між близько розташованими послідовностями ретротранспозонів. Однією з переваг цього методу є можливість одночасного аналізу багатьох локусів, локалізованих в різних ділянках геному, що особливо важливо при культивуванні *in vitro*. Поліморфізм в цьому випадку обумовлюється або мутацією в ділянці зв'язування праймера, або безпосередньо транспозицією через вбудовування ретротранспозону в іншу ділянку ДНК.

У процесі добору стійких форм за клітинної селекції може виникати генетична мінливість, пов'язана як з умовами культивування, так і дією стресового чинника [6]. У зв'язку з цим, метою роботи було вивчення геномної мінливості клітинних ліній пшениці, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (*G. graminis* var. *tritici*), за дії осмотичного стресу та регенерантів з них за використання цитологічного та IRAP-методу.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень були калюсні лінії, отримані із експлантатів верхівки пагона 3-добових стерильних проростків рослин м'якої пшениці сорту Зимоярка та рослин R₂ соматона-

нальних ліній цього ж сорту, стійких до збудника офіобольозної кореневої гнилі. Індукцію калюсогенезу та культивування калюсів проводили по розробленій нами методиці [7]. Для мо-

делювання водного дефіциту, як селективний агент застосовували маніт у концентраціях 0,4, 0,8 та 1,0 М, який додавали до модифікованого середовища МС. Умови проведення експериментів та схеми прямої та ступінчастої клітинної селекції наведено у роботі [8].

Цитогенетичне дослідження калюсів проводились в період найбільшої мітотичної активності на 6-7 добу пасажу. Забарвлювали калюси 2% розчином ацеторсеїну за стандартною методикою [9]. Зміни співвідношення клітин різного рівня плоідності, частоти структурних перебудов хромосом і аномалій мітозу були основними критеріями оцінки цитогенетичного ефекту дії маніту на калюсні культури. Достовірність отриманих даних визначали за критерієм Ст'юдента.

Для IRAP – аналізу відбирали: 1) рослини R₂ соматоклональних ліній, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі (10 індивідуальних рослин: P1 – P10) – вихідний матеріал; 2) первинний калюс, отриманий з рослин R₂ соматоклональних ліній (10 зразків); 3) калюси, отримані на ранніх (1 пасаж) та пізніх етапах (6 пасаж) ступінчастої клітинної селекції (10 зразків); 4) калюси 1-4 пасажів прямої клітинної селекції (10 зразків); 5) калюси, що культивувалися протягом такого ж періоду як і стійкі клітинні лінії, однак не зазнавали дії селективного чинника (10 зразків: C1-C10); 6) рослини-регенеранти, індуковані із стійких калюсів R₀ (5

Результати та обговорення

Клітинні популяції вихідних калюсів (контроль) характеризуються стабільно-гетерогенною структурою, де понад 70% складають гексаплоїдні клітини, при наявності певного пулу (~ 10-17 %) поліплоїдних, (~ 7-15%) анеуплоїдних клітин та незначної кількості клітин іншого рівня плоідності. Кількість хромосом у клітинах варіює від 7 до понад 84. При перенесенні калюсів на живильні середовища з низькою концентрацією осмотика – 0,4 М – достовірних відмінностей за числом наборів хромосом та частотою їх аберацій в клітинах контрольних та дослідних калюсних ліній не виявлено, що 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 статистично достовірного збільшення кількості анеуплоїдних клітин (30%) в контролі, в той час як у ліній, стійких до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі, достовірне збільшення числа таких клітин відбулося лише за концент-

зразків: R1-R5).

Екстракцію ДНК проводили за допомогою СТАВ-методу [10] із проростків, листків рослин-регенерантів або безпосередньо калюсної тканини. Ампліфікацію проводили на приладі «Терцик» фірми «ДНК-Технологія». Кінцевий об'єм реакційної суміші складав 25 мкл: 10mM TRIS-HCl, 50 mM KCl, 1,5 - 2,0 mM хлориду магнію, 2 mM dNTP, 0,2 мкл праймера, 1 од. акт. Таq ДНК полімерази та 100-120 нг досліджуваної ДНК. Для уникнення випаровування до реакційної суміші додавали по 20 мкл мінеральної олії. Ампліфікація проводилась за наступною програмою: 95°C – 5 хв; 37× (95°C – 30 с; 55°C – 1 хв; 72°C – 1 хв. 30 сек), 72° С – 7 хв. В дослідженнях застосовували IRAP-праймери 5'-GGTGTGTCCGGGGCGTTACA-3' та 5'-CCGGGAGCCCATTCGAAC-3' [11] комплементарні до послідовностей двох поруч розташованих LTR ретротранспозону Cassandra. Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу в 1,6% агарозному гелі з додаванням бромистого етидію. Розділення проводилось при напрузі 50 в/см в трис-ацетатному буфері. Електрофоретичні спектри візуалізували під УФ променями. Для оцінки розмірів продуктів ампліфікації використовували маркер Step Ladder DNA S7025 (SIGMA). Приблизний розмір продуктів ПЛР визначали за допомогою пакету прикладних програм TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics).

рації 1M (18%).

При культивуванні калюсів на селективних середовищах з сублетальною концентрацією маніту (0,8 М) у стійких та нестійких форм вже в першому пасажі спостерігаються достовірне збільшення клітин з порушеннями мітозу. В умовах осмотичного стресу виявлено: конденсацію та фрагментацію ядер, хромосомні аберації у вигляді хроматидних мостів, злипання окремих хромосом та їх клампінг, а також порушення веретена поділу у вигляді багатополосних мітозів, відставання хромосом, утворення мікроядер.

Більшість хромосомних аберацій представлена у вигляді хроматидних мостів (55,7%), що свідчить про збереження в клітинних поколіннях дицентричних хромосом. За дії сублетальної дози маніту у нестійких ліній частота аберацій збільшується майже у 4 рази (від 4 до 15%), тоді як у стійких ліній лише у 2 рази – (від 4 до 9%). Слід зазначити, що найбільш вираженим цитогенетичним ефектом дії маніту був клампінг

хромосом – тобто множинне їх злипання у вигляді комків, що унеможлиблює нормальний цитокінез, і призводить до апоптозу. Ця хромосомна аберация зустрічалася в контролі з частотою не більше 1%, в той час, як на середовищах з сублетальною концентрацією маніту кількість таких клітин достовірно зростала до 5% у стійкої лінії та 7% – у нестійкої.

На селективних середовищах з сублетальною концентрацією маніту (0,8 М) лостовірно зростала частота аномалій мітозу, пов'язана з порушеннями веретена поділу, від 4-5 % – у контролі до 8-11% – у досліді. В ході дослідження виявлено відставання хромосом, багатополюсні мітози, також спостерігали клітини з лопатеви-ми ядрами, мікроядрами, дво- та багатоядерні клітини. Слід відзначити, що серед турбагенних порушень мітозу більшість складала багатополюсні мітози (55%). На середовищах з високою концентрацією осмотика спостерігалось достовірно збільшення їх числа у нестійких ліній (від 1% – у контролі до 6 % – у досліді), у той час як у стійких форм суттєвих відмінностей не виявлено. Крім того, за сублетальної концентрації стресора в першому пасажі зростає кількість клітин з мікроядрами (до 25-30% від загального числа клітин з турбагенними порушеннями), що також є ознакою апоптозу, нестабільності геному та показником значної генотоксичної дії маніту на клітини. У нестійкої форми виявляється порівняно більше таких клітин, проте достовірних відмінностей не встановлено. Слід зазначити, що частка клітин з іншими патологіями мітозу, зокрема полікаріоцитами, була незначною – їх кількість не перевищувала 10 % від загальної кількості клітин з аномаліями поділу.

Таким чином, встановлено, що високі концентрації осмотика спричиняють кластогенний ефект та викликають турбагенні порушення в клітинах калюсних культур пшениці. Стійкі до метаболітів збудника офіобольозу калюсні лінії характеризуються достовірно нижчою частотою цитологічних порушень, що може бути результатом того, що клітини, стійкі до одного стресового чинника, проявляють резистентність і до іншого стресора.

Наступним етапом дослідження був IRAP-аналіз отриманих форм. Перш за все важливо було переконатися у генетичній гомогенності контрольних рослин за досліджуваними локусами. Для цього аналізували зразки ДНК 10 довільних рослин R_2 соматональних ліній, стійких до метаболітів збудника офіобольозної

кореневої гнилі, (зразки P1-P10) та первинний калюс отриманий з них. В цілому, для кожного з проаналізованих зразків отримано ідентичні спектри продуктів ПЛР та виявлено 11 ампліконів розміром від 154 до 581 п.н. Типові зразки наведено на рис. 1 (доріжка 2 та 3) та рис. 2 (доріжка 2 та 3). Отримані дані свідчать, що у вихідного матеріалу відсутній природний та/або спонтанний поліморфізм за досліджуваними локусами.

Для виявлення поліморфізму ДНК за ступінчастої клітинної селекції, відбирали зразки калюсів на ранніх та пізніх етапах ступінчастої клітинної селекції. Контролем слугував первинний калюс (0 пасаж) та калюс 6-го пасажу, що паралельно культивувався на середовищі без селективного чинника. Отримані результати (рис. 1) свідчать, що за ступінчастої клітинної селекції в спектрах продуктів ампліфікації ДНК калюсів спостерігається втрата окремих ампліконів. Зокрема, на середовищі з 0,4 М маніту у однієї з ліній (№ 2) відмічено відсутність амплікону довжиною близько 581 п.н. На пізніх етапах клітинної селекції (6 пасаж на середовищі з 0,8 М маніту) відмічено ще більші зміни. Так у лінії №4 відмічено втрату ампліконів довжиною близько 154, 334, 347 та 362 п.н. (рис. 1., доріжка 7). Відсутність певних ампліконів була відмічена і у рослин-регенерантів. Так, виявлено рослину, у якої також були відсутні амплікони розміром приблизно 334 та 347 п. н. (рис. 1, доріжка 1). Крім того, за ступінчастої клітинної селекції у всіх досліджуваних зразків, а також у контрольних калюсах 6-го пасажу та отриманих рослин-регенерантів відмічено появу нового відносно високомолекулярного амплікона розміром 638 п.н.

Наступним етапом досліджень було виявлення поліморфізму ДНК за прямої клітинної селекції. Для цього аналізували зразки ДНК калюсів на ранніх (1 пасаж) та пізніх (4 пасаж) етапах прямої клітинної селекції.

Показано, що при такому підході у спектрах продуктів ампліфікації (рис. 2), можуть відбуватися як втрати ампліконів, зокрема довжиною близько 221, 552 та 571 п.н., так і поява нового унікального амплікону розміром близько 455 п.н. Слід відмітити, що даний амплікон виявлено тільки у калюсних лініях, отриманих при застосуванні прямої клітинної селекції. Також за прямої клітинної селекції у всіх досліджуваних зразків виявлено появу нового відносно високомолекулярного амплікона розміром 638 п.н.

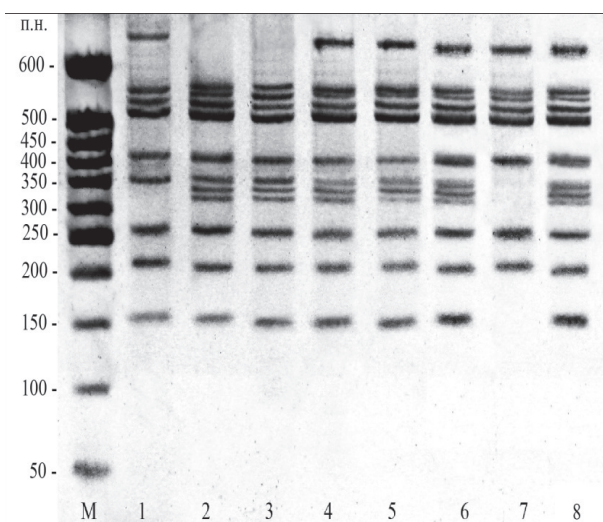


Рис. 1. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за ступінчастої клітинної селекції: М – маркер молекулярних мас (Step Ladder DNA S7025); 1 – рослина-регенерант; 2 – рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі; 3 – первинний калюс; 4- калюс 1-го пасажу на середовищі з 0,4 М маніту; 5 – калюс 3-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту; 6 – калюс 4-го пасажу на середовищі без селективного чинника; 7-калюс 6-го пасажу на середовищі з 0,8 М маніту; 8 – калюс 6-го пасажу, що культивувався на середовищі без селективного чинника

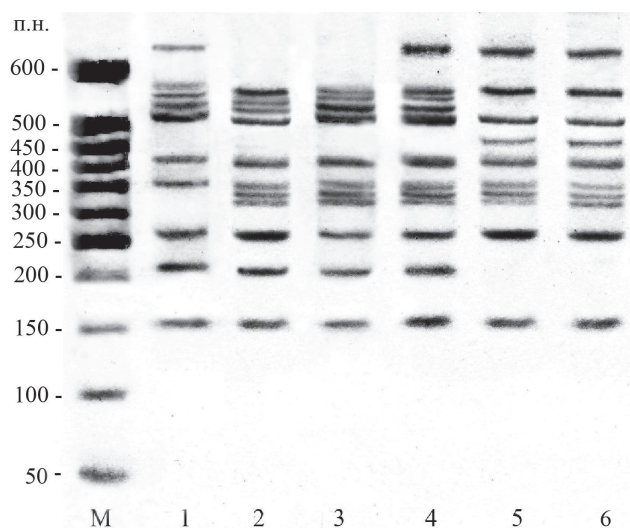


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за прямої клітинної селекції: М – маркер молекулярних мас (Step Ladder DNA S7025); 1 – рослина-регенерант; 2 – рослина R₂ соматоклональної лінії, стійкої до метаболітів збудника офіобольозної кореневої гнилі; 3 – первинний калюс; 4- контрольний калюс 4-го пасажу, що культивувався на середовищі без селективного чинника; 5 – калюс 1-го пасажу на середовищі з концентрацією маніту 0,8 М; 6 – калюс 4-го пасажу на середовищі з концентрацією маніту 0,8М

Таким чином, крім специфічних змін в спектрах продуктів ампліфікації ДНК, які відбуваються за прямої та ступінчастої клітинної селекції, звертає на себе увагу той факт, що при культивуванні *in vitro* (як в дослідних зразках на селективних середовищах, так і в контрольному калюсі, а також отриманих рослинах-регенерантах) у всіх досліджуваних об'єктах відмічено появу відносно високомолекулярного аплікону довжиною близько 638 п.н. (рис. 1, рис. 2). Даний аплікон співрозмірний з повною довжиною ретротранспозону Cassandra. Виявлені відмінності свідчать про складність процесу виникнення генетичної мінливості при калюсоутворенні (як на середовищах з селективним

агентом так і без нього), морфогенезі та регенерації рослин, а також при отриманні нових форм в процесі клітинної селекції. З огляду на отримані дані, можна висунути припущення, що культивування *in vitro* може викликати транспозицію ретронспозону Cassandra, що можна ідентифікувати в спектрах продуктів ампліфікації досліджуваних зразків як появу аплікону розміром близько 638 п.н. Також показано, що за клітинної селекції очевидно можуть відбуватися множинні точкові мутації або делеції, зокрема в сайтах зв'язування з праймерами до даного ретротранспозону, які приводять до зникнення окремих апліконів в спектрах продуктів ПЛР.

Література

1. Тищенко Е.Н. Михальская С.И., Сергеева Л.Е. Нестабильность RAPD-ампликонов сои при клеточной селекции на устойчивость к оксианионам вольфрама и ванадия // 36. наук. праць "Фактори експериментальної еволюції організмів". – К.: Логос., 2008. – Т. 4. – С. 205-210.

2. 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. – Vol. 29. – P. 95-102.
3. Gawande N.D., Mahurkar D.G., Rathod T.H., Jahagidar S.W., Shinde S.M. *In vitro* screening of wheat genotypes for drought tolerance // *Annals Plant Physiol*. – 2005. – Vol. 19. – P. 162-168.
4. Hassanein A. M. A. Establishment of efficient *in vitro* method for drought tolerance evaluation in *Pelargonium* // *A. Journal of horticultural science and ornamental plants*. – 2010. – Vol. 2, №1. – P. 8-15
5. Хапилина О.Н., Новаковская А.П., Райзер О.Б., Созинова Л.Ф. Генетическая дифференциация линий регенерантов мягкой пшеницы с помощью молекулярно-генетических маркеров // *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. Серия сельскохозяйственных, ветеринарных и биологических наук*. – 2011. – №1. – С. 37-45.
6. Созинова Л.Ф., Цветков И.Л., Сейтбатталова А.И. и др. Генетическая дифференциация растений-регенерантов мягкой пшеницы с помощью IRAP-маркеров // *Сельскохозяйственная биология*. – 2008. – №5. – С. 18-21.
7. 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.
8. Зінченко М.О., Дубровна О. В., Бавол А. В. Селекція *in vitro* м'якої пшениці на комплексну стійкість до метаболітів збудник офіобольозу та водного дефіциту // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів* – 2012. – Т. 10, №1. – С. 28-36.
9. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. –М.: Колос, 1988. – С. 168 – 170
10. Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S. et al. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome // *Theor. and Appl. Genet*. – 1993. – Vol. 86. – P. 705-712.
11. Kalendar, R., J. Tanskanen, W. Chang, K. et al. Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – P. 5833-5838.

ZINCENKO M. O. BAVOL A. V., DUBROVNA O. V.

Institute of Plant Physiology and Genetics, NAS of Ukraine

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str 31/17, e-mail: dubrovny@ukr.net

VARIABILITY OF GENOME OF WHEAT CELLULAR LINES RESISTANT TO METABOLITES OF OPHIOBOLUS ROOT ROT UNDER OSMOTIC STRESS

Aims. Determination of cytogenetic and molecular – genetic polymorphism of resistant/nonresistant to the pathogen metabolites of *G. graminis var. tritici* cellular lines of bread wheat under osmotic stress and plant-regenerants from them. **Methods** cytogenetic analysis and IRAP – method. **Results.** It was found that the effect of mannitol appears with high concentrations and result in increased frequency of aneuploidy and spindle failures. While callus and regenerated plants were cultured *in vitro*, in the spectra of the DNA amplification products noted the appearance of amplicon approximately 638 bp. length, which is absent in original form. **Conclusions.** We found that, depending on the scheme used cell selection (direct or step) can identify the different changes in the genome.

Key words: *Triticum aestivum* L., cellular lines, cytogenetic effect, IRAP-method.

КАСІЯНЧУК Р.М., ВОЛКОВ А.Р., ПАНЧУК І.І.

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського 2, e-mail: irina.panchuk@gmail.com

ВПЛИВ САХАРОЗИ НА РІВЕНЬ мРНК АРХ ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Рослини постійно піддаються впливам стресових факторів абіотичної природи. Різні форми абіотичного стресу – світловий стрес, надмірна інсоляція, сольовий та високотемпературний стреси – призводять до зростання продукції активних форм кисню (АФК) в рослинних

клітинах [9, 11]. Шкідливі наслідки має також і підвищення концентрації іонів важких металів (ВМ), які негативно впливають на перебіг багатьох метаболічних процесів 6, 7, зокрема порушується окисно-відновна рівновага у клітині та втрачається активність багатьох ензимів [7, 8,

15]. Особливо небезпечними є іони таких металів, як мідь та залізо, які здатні змінювати валентність у клітині, каталізуючи перетворення пероксиду водню у гідроксил радикали згідно до реакції Фентона [8, 10, 11, 15]. Це, в свою чергу, викликає оксидативний стрес, який полягає в пошкодженні ДНК і білків [1] та в активації процесів перекисного окислення ліпідів у мембранах. За високих концентрацій іонів цих ВМ спостерігаються сповільнення росту рослин та хлороз, порушуються процеси фотосинтезу і дихання [7, 8, 15].

Зменшення продукції гідроксил радикалів у клітині може бути досягнуто шляхом зниження концентрації пероксиду водню завдяки збільшенню активності ензимів, які здатні його розщеплювати [12]. До таких ензимів належать, зокрема, пероксидази та каталази, які у рослин кодується мультигенними родинками [2, 12]. Зокрема у *A. thaliana* виявлено 8 генів, які кодують три цитозольні (*Apx1*, *Apx2*, *Apx6*), три мікросо-

Матеріали і методи

Для дослідження використовували рослини *A. thaliana* екотипу Columbia 0 віком 4,5-5 тижнів, що росли у ґрунті. Рослини вирощували в культивативній кімнаті за температури 20°C в умовах 16-годинного світлового дня. Інтенсивність освітлення становила 2000 люкс. Для проведення стресової обробки надземну частину рослин відокремлювали від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке поживне середовище Мурасіге-Скуга (0,5x MS), що додатково містило 0,5 мМ хлорид міді або 0,1 мМ Fe-EDTA. Для того, щоб врахувати можливий вплив EDTA на експресію, паралельно проводили обробку рослин 0,1 мМ Na-EDTA. Крім того, в якості контролю використовували рослини, які інкубували на середовищі 0,5x MS без солей міді та заліза. Як додатковий контроль використо-

Результати та обговорення

У попередніх дослідженнях із застосуванням інкубаційного буферу, який містив 1% (30 мМ) сахарозу, нами було визначено, як підвищені концентрації іонами ВМ впливають на рівень експресії генів *Apx* у листках арабідопсису [5, 6]. Для того, щоб зрозуміти, наскільки індукція генів *Apx* залежить від присутності сахарози, у подальших експериментах було визначено рівень мРНК восьми генів *Apx* у листках арабідопсису, які протягом 12 годин оброблялись солями заліза та міді з використанням інкубаційного буферу без сахарози (рисунок). Для порівняння було також ви-

мальні (*Apx3*, *Apx4*, *Apx5*) та дві хлоропластні (*sApx*, *tApx*) ізоформи аскорбат пероксидази (APX) [12].

Активація антиоксидантних ензимів може потребувати збільшення експресії відповідних генів. Так раніше нами було встановлено, що експресія генів *Apx* у модельної рослини *Arabidopsis thaliana* залежить від концентрації пероксиду водню у клітині та диференційно індукється в умовах теплового стресу та за дії підвищених концентрацій ВМ [5, 6, 12].

Забезпечення синтезу нових молекул захисних білків в умовах стресу може вимагати додаткових енергетичних затрат, а отже – залежати від енергетичних можливостей клітини. Для перевірки цього припущення, ми визначили як експресія восьми генів *Apx* у листках *A. thaliana* за дії підвищених концентрацій іонів заліза та міді залежить від присутності у інкубаційному буфері такого джерела енергії, як сахароза.

вували інтактні рослини, які заморожували безпосередньо після зрізання. Враховуючи, що за дії токсиканта може змінюватись кількість H_2O_2 , що генерується під час транспорту електронів у хлоропластах та при фотодиханні, стресову обробку проводили у темряві за температури 20°C протягом 12 годин.

Виділення поліА⁺-мРНК, її конвертування у кДНК за допомогою зворотної транскриптази та умови проведення кількісної ПЛР у реальному часі (real time RT-PCR) на ампліфікаторі іCycler (Bio-Rad, США) з використанням генспецифічних праймерів були описані раніше [12]. Результати піддавали статистичній обробці із застосуванням двовибіркового t-критерію для незалежних вибірок.

значено рівень мРНК актину *Act2*, рівень експресії якого у тканинах листа вважається відносно стабільним [13]. Було встановлено, що у багатьох випадках рівень мРНК *Apx* за відсутності сахарози виявився нижчим, а у решта випадків – несуттєво відрізнявся від рівнів, зафіксованих нами раніше у присутності сахарози [5, 6]. В жодному випадку за відсутності сахарози не було зафіксовано достовірно вищий рівень мРНК *Apx*. При цьому рівень мРНК *Act2* за відсутності сахарози або не змінювався, або навіть зростав (контрольні рослини).

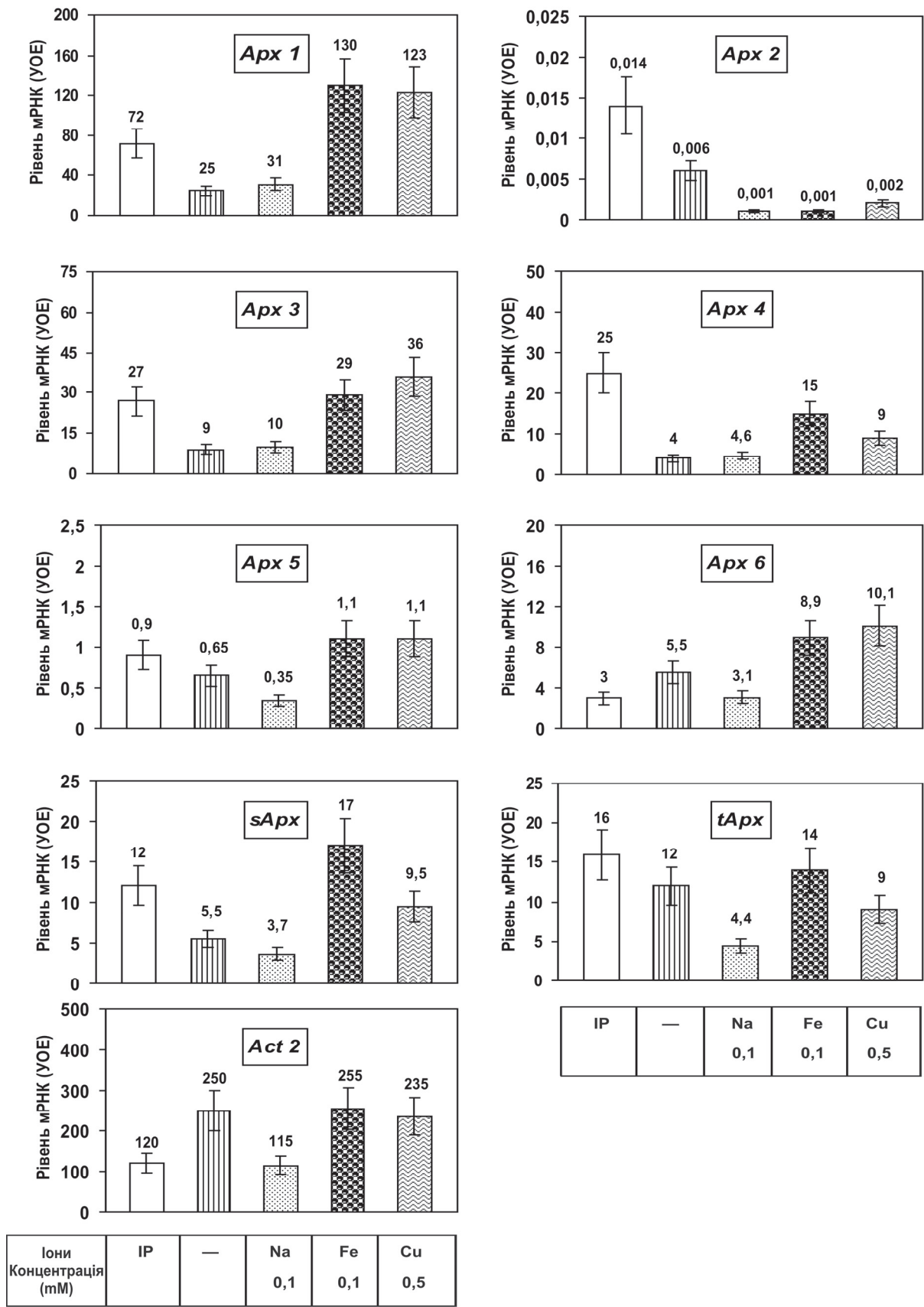


Рис. Рівні мРНК генів, що кодують різні ізоформи АРХ у листках *Arabidopsis thaliana* після обробки Fe-EDTA, Na-EDTA та CuCl₂ протягом 12 годин за відсутності сахарози в інкубаційному буфері. Рівні експресії представлено у порівнянні з рівнем мРНК для актину-2 у необробленому листі, який прийнято за 100 умовних одиниць експресії (УОЕ). IP – інтактні рослини

Якщо ж порівняти характер індукції генів *Arx* за дії іонів ВМ, то картина виявляється неоднозначною. Так, за дії 0,1 мМ Fe-EDTA зростання рівню мРНК *Arx1* та *sArx* по відношенню до контрольних зразків за відсутності сахарози становило 5,1 та 3,1 рази, що є менше, ніж у присутності сахарози [6]. В той же час, за відсутності сахарози спостерігається індукція мРНК *Arx1* та *Arx3* за дії 0,5 мМ хлориду міді – у 4,9 та 3,7 рази, відповідно, хоча у присутності сахарози індукція цих генів була практично відсутня. Проте, виявлена за відсутності сахарози індукція обох генів пов'язана не із зростанням рівня мРНК в присутності ВМ, а із падінням цього рівня у контрольних зразках. Отже, в цілому отримані результати показують, що присутність сахарози в інкубаційному буфері позитивно впливає на експресію більшості генів *Arx*.

Можна припустити, що цей ефект пов'язаний із тим, що у проведених дослідах (інкубація у темряві) сахароза виступала важливим зовнішнім джерелом енергії для клітин листка. За відсутності сахарози клітини були обмежені у своїх енергетичних можливостях і під-

тримували транскрипцію генів та синтез лише тих білків, які були найбільш необхідні для виживання. Із такою точкою зору узгоджується відносна стабільність рівня мРНК *Act2* (важливого білка «домашнього господарства») незалежно від присутності сахарози в інкубаційному буфері. З іншого боку, на користь запропонованої інтерпретації говорить також те, що найбільше зниження рівня мРНК *Arx* відносно *Act2* за відсутності сахарози спостерігалось (за виключенням *Arx5* та, можливо, *sArx*) у контрольних зразках (тобто за відсутності оксидативного стресу), а найменше (за виключенням *sArx*) – за дії 0,5 мМ хлориду міді. Як показують наші дослідження, за такої стресової обробки має місце суттєвий оксидативний стрес, який проявляє себе у різкому підвищенні рівня перекисного окислення ліпідів [4] та інактивації ферментів [3]. Тобто, за використаної нами жорсткої стресової обробки забезпечення синтезу антиоксидантних білків має набувати найвищого пріоритету, про що і свідчать отримані нами результати.

Висновки

Надмірне підвищення концентрації іонів міді та заліза у клітинах листка арабідопсису викликає зростання рівня мРНК генів, що кодують різні ізоформи АРХ, що імовірно пов'язано із посиленням транскрипції цих генів. Проте різні ізоформи АРХ мають грати різну роль у захисті клітини, оскільки рівень транскриптів різ-

них *Arx* зростає по-різному. Транскрипція генів *Arx* за дії підвищених концентрації іонів міді та заліза є важливою для клітини і відбувається навіть за обмежених енергетичних ресурсів. Присутність сахарози в інкубаційному буфері позитивно впливає на експресію більшості генів *Arx*.

Література

1. Бреслоу Е. Комплексы металлов с белками // Неорганическая биохимия. – М.: Мир, 1978. – Т. 1. – С. 274-299.
2. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303-322.
3. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на активність каталази та аскорбатпероксидази в *Arabidopsis thaliana* // Физиол. биохим. культурных растений. – 2012. – Т. 44, №2. – С. 153-161.
4. Долиба І.М., Волков Р.А., Панчук І.І. Вплив іонів міді на перекисне окислення ліпідів у *Cat2* нокаутного мутанта *Arabidopsis thaliana* // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2012. – Т. 10, №1. – С. 13-19
5. Панчук І.І., Касіянчук Р.М., Волков Р.А. Диференційна транскрипція генів *Arx* арабідопсису за дії іонів кадмію та міді // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – Т. 11. – С. 150-154.
6. Панчук І.І., Касіянчук Р.М., Волков Р.А. Вплив іонів заліза на транскрипцію генів *Arx* арабідопсису // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: збірник наукових праць. – Т. 4 – К.: Логос, 2012 – С. 311-3146.
7. Топчій Н.М. Вплив важких металів на фотосинтез // Физиол. биохим. культурных растений. – 2010. – Т. 42, №2. – С. 95-103.
8. Connolly M.L., Guerinet M.L. Iron stress in plants // Genome Biol. – 2002. – Vol. 3, №8. – P. 1024.1-1024.4.
9. Foyer C., Noctor G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses // Plant Cell. – 2005. – Vol. 17. – P. 1866–1875.
10. Hall J.L., Williams L.E. Transition metal transporter in plants // J. Exp. Bot. – 2003. – Vol. 54, №393. – P. 2601-2613.

11. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – Vol. 9, №10. – P. 490–498.
12. 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.
13. Volkov R.A., Panchuk I.I., Mullineaux F.M., Schöffl F. Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis* // Plant. Mol. Biol. – 2006. – Vol. 61, №4–5. – P. 733–74610.
14. Volkov R.A., Panchuk I.I., 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, №391. – P. 2343-9.
15. Yruela I. Copper in plant // Braz. J. Plant Physiol. – 2005. – Vol. 17. – P. 145-156.

KASIJANCHUK R.M., VOLKOV A.R., PANCHUK I.I.

Yuri Fedkovych National University of Chernivtsi

Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsubynski str. 2, e-mail: irina.panchuk@gmail.com

EFFECT OF SUCROSE ON APX mRNA LEVELS UPON HEAVY METAL STRESS

Aim. In order to clarify molecular mechanisms of heavy metal stress response in plants expression of eight genes coding for ascorbate peroxidase (APX) isoenzymes induced by iron and copper ions in leaf tissues of *Arabidopsis thaliana* was evaluated. **Methods.** Changes of mRNA levels were estimated using quantitative real-time RT-PCR. **Results.** It was found that mRNA levels of several genes (especially that of *Apx1* and *sApx*) were increased after 12 hours of treatment. Comparison of our novel and recently obtained results showed that after incubation of leaves in the buffer, which contains sucrose, the mRNA levels were the same or higher than after application of buffer without sucrose. **Conclusions.** The data indicate that the presence of sucrose in incubation buffer enhances *Apx* mRNA levels. We speculate that sucrose may serve as a source of energy required for effective transcription of *Apx* genes upon stressful conditions.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, copper, iron, sucrose, abiotic stress, *Apx*, gene expression.

КИРПА Т.Н.¹, РУДАС В.А.¹, ОВЧАРЕНКО О.А.¹, КЛЕБАНОВИЧ А.А.¹, ГЕРАСИМЕНКО И.М.¹, ИВАННИКОВ Р.В.², ОСТАПЧУК А.Н.³, ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.⁴, ШЕЛУДЬКО Ю.В.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины*

Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного 148, e-mail: ysheludko@ukr.net

²*Национальный ботанический сад им. Н. Н. Гришко НАН Украины*

Украина, 01014, г. Киев, ул. Тимирязевская 1

³*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины*

Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного 152

⁴*Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН*

РФ, 127276, Москва, ул. Ботаническая 35

ГЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ Δ9-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ В ОРХИДЕЕ *DENDROBIUM LINGUELLA* RCHB. F

Создание растений, устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды, является одной из наиболее актуальных задач, стоящих перед современной биотехнологией. Это обусловлено растущими рисками климатических изменений, загрязнением окружающей среды и эрозией пахотных земель. Важным фактором, определяющим толерантность растительной клетки к температурному и осмотическому стрессам, является жирнокислотный состав клеточной мембраны. Это обусловлено тем, что при переходе липидного бислоя из жидкокристаллического состояния в фазу геля наруша-

ется функционирование мембранных ферментных комплексов. Увеличение степени ненасыщенности остатков жирных кислот в липидах клеточных мембран у растений увеличивает их текучесть и приводит к понижению температуры фазового перехода, что коррелирует с холодостойкостью растений [1].

Ферментами, отвечающими за введение двойных связей в углеводородные цепочки жирных кислот, являются десатуразы. Гетерологическая экспрессия генов десатураз позволяет изменить спектр жирных кислот мембранных липидов [2]. У высших растений синтез нена-

сыщенных С-16 и С-18 жирных кислот начинается с введения двойной связи в позиции Δ9 и локализуется в пластидах, хотя существуют сообщения о клонировании генов ацил-липидных Δ9-десатураз предположительно непластидной локализации [3 и литература, цитируемая в 3]. Последующие реакции десатурации могут происходить или в пластидах, или в эндоплазматическом ретикулуме [3]. Поскольку именно биосинтез мононенасыщенных жирных кислот играет ключевую роль в изменении спектра мембранных липидов, обеспечивая субстрат для дальнейшей десатурации, можно предположить, что данная реакция определяет и адаптацию клеток к холодному стрессу. С целью изучения механизмов биосинтеза жирных кислот и получения холодостойких растений нами была проведена генетическая трансформация *Dendrobium*

Материалы и методы

Гибридный ген *desC::licBM3* был размещён под контролем 35S промотора ВМЦК в бинарном векторе для агробактериальной трансформации, созданном на основе pBin19 и содержащем селективный ген *bar*, обеспечивающий устойчивость к фосфинотрицину. Присоединение последовательности транзитного пептида малой субъединицы РУБИСКО *Arabidopsis thaliana* (*ats1A*) к гибриднему гену *desC::licBM3* обеспечивало пластидную локализацию продукта. В качестве исходного материала для генетической трансформации использовали асептические вторичные протокормы *D. linguella* линии 534 (13) из коллекции Национального ботанического сада им. Н. Н. Гришко НАН Украины. Для генетической трансформации использовали методику Horsch et al. [5] с некоторыми модификациями: вторичные протокормы *D. linguella* переносили в пустые чашки Петри, разрезали их на сегменты 0,3-0,5 см и оставляли на свету. Через 7-10 суток сегменты смачивали разбавленной в 3 раза 10 mM MgSO₄ суспензией *A. tumefaciens* GV3101 pNPB14, активированной ацетосирингоном (200 мкМ). Сегменты вместе с агробактериальной суспензией помещали в вакуумную камеру (0,2 атм). Через 10-15 мин. сегменты подсушивали и оставляли на 7-10 суток в условиях рассеянного освещения. Всего было обработано около 4000 сегментов. Потом сегменты переносили на модифицированную питательную среду OrcR, содержащую макросоли ST [6], микросоли и Fe-хелат MS [7], витамины по Гамборгу [8], 20 г/л сахарозы, 50 мг/л гумата натрия, 200 мг/л гидролизата казеина, 500 мг/л

linguella – популярного для оранжерейного и комнатного выращивания вида, относящегося к семейству орхидных (Orchidaceae), геном ацил-липидной десатуразы *desC* (Δ9) цианобактерии *Synechococcus vulcanus*. Использование экспрессионно-репортерной системы, обеспечивающей слияние гена десатуразы в одной рамке считывания с репортерным геном термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum* (*licBM3*) [4], позволило отобрать линии, в которых происходит экспрессия целевого гена. Анализ спектра жирных кислот мембранных липидов в отобранных линиях показал уменьшение доли насыщенной пальмитиновой кислоты и увеличение доли С18:3 линоленовой кислоты, что свидетельствует о физиологической активности гетерологичной десатуразы в клетках орхидеи.

морфолиноэтансульфоновой кислоты, 1 мг/л бензиламинопурина, 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты и дополненную 500-600 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий. Через 2-3 недели культивирования растительные ткани переносили на питательную среду того же состава, дополненную 5 мг/л фосфинотрицина для селекции трансгенных линий. В процессе культивирования постоянно отбирали зеленые трансгенные линии.

Для проведения генетического анализа был использован метод мультиплексной ПЦР с четырьмя парами праймеров, позволяющий в ходе одной реакции определить присутствие целевых генов (десатуразы и термостабильной лихеназы), подтвердить качество изолированной для анализа ДНК и отсутствие агробактериальной контаминации [9].

Качественное определение активности термостабильной лихеназы проводили по протоколу [10]. Количественное определение активности фермента осуществляли по модифицированному методу [11], измеряя количество свободных восстанавливающих сахаров после реакции суммарных белковых экстрактов листовой ткани с лихенаном. Оптическую плотность растворов измеряли при 510 нм. Концентрацию восстанавливающих сахаров определяли по калибровочному графику, построенному для глюкозы. За единицу активности принимали активность фермента, образующего 1 мкмоль восстанавливающих сахаров за 1 с. Удельную активность рассчитывали на количество белка.

Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для хроматографического анализа проводили по методике [12] с незначительными модификациями. Определение метиловых эфиров жирных кислот проводили на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert с капиллярной колонкой DB-FFAP (30м×0,25мм×0,25мкм)

(J&W Scientific). Температурная программа от 150°C до 220°C с градиентом 2°C/мин, температура испарителя - 250°C. В качестве газоносителя использовали гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Идентификацию проводили при помощи библиотеки масс-спектров NIST 02 и стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco).

Результаты и обсуждение

После генетической трансформации *D. linguella* через 6-7 месяцев культивирования было отобрано около 500 потенциально трансгенных клонов. Присутствие продукта экспрессии

гибридного трангена в клетках 18 из 28 исследованных линий было доказано методом качественного и количественного анализа активности термостабильной лихеназы (рис.1).

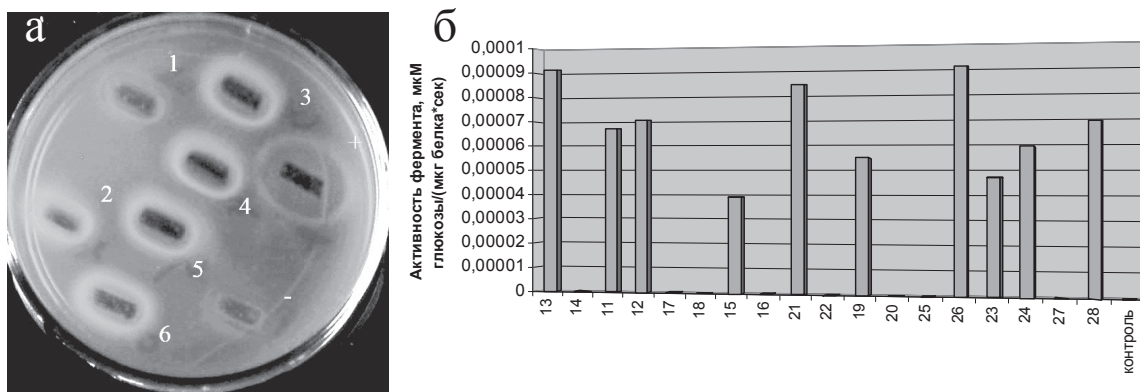


Рис. 1. Результаты качественного (а) и количественного (б) анализа активности термостабильной лихеназы в отселектированных линиях растений. а) 1 – экстракт контрольного (не-трансгенного) растения *D. linguella*; 2-6) линии отселектированных после трансформации растений; "+" – *N. tabacum*, экспрессирующий ген термостабильной лихеназы; "-" – буфер для экстракции. Светлые участки вокруг лунок на чашке свидетельствуют о гидролизе лихенана. б) На графике показана активность термостабильной лихеназы в трансгенных линиях *D. linguella*, определяемая по количеству освобождённой из субстрата (лихенан) глюкозы на 1 мг суммарных растворимых белков за 1 секунду. "Контроль" – экстракт контрольного (не трансгенного) растения *D. linguella*

Для линий, в которых была показана активность термостабильной лихеназы, проведен генетический анализ присутствия трангена в геноме растений методом МПЦР (Рис 2). Трансген был обнаружен во всех линиях орхидей, у которых была обнаружена лихеназная активность, что свидетельствует о высокой эффективности используемой экспрессионно-репортерной системы.

Таким образом, нами были отобраны линии трансгенных растений *D. linguella*, несущие гибридный ген *desC::licBM3* и демонстрировав-

шие активность термостабильной лихеназы. Дальнейшая работа включала исследование спектра жирных кислот мембранных липидов трансгенных линий. Методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии анализировали соотношение жирных кислот в экстрактах липидов клеточных мембран трансгенных растений. Было проанализировано 6 линий орхидей, из которых четыре показывали высокую активность термостабильной лихеназы (линии 12, 13, 21 и 26), а в двух (линии 8 и 10) активность не была задетектирована методом чашечного теста. Наи-

большие отличия от контроля наблюдали у растений с высоким уровнем активности трансгена (линии 12, 13 и 26). Соотношение ненасыщенных жирных кислот в клеточных мембранах растений данных линий было смещено в сторону накопления триненасыщенной линоленовой кислоты (Рис. 3), которая, считается, обуславли-

вает устойчивость клеток к воздействию холода [1, 3]. Также наблюдалось уменьшение доли содержания насыщенной олеиновой кислоты. Индекс ненасыщенности увеличивался в трансгенных линиях, достигая $1,59 \pm 0,13$ в линии 26 по сравнению с $1,21 \pm 0,13$ в контрольных растениях.

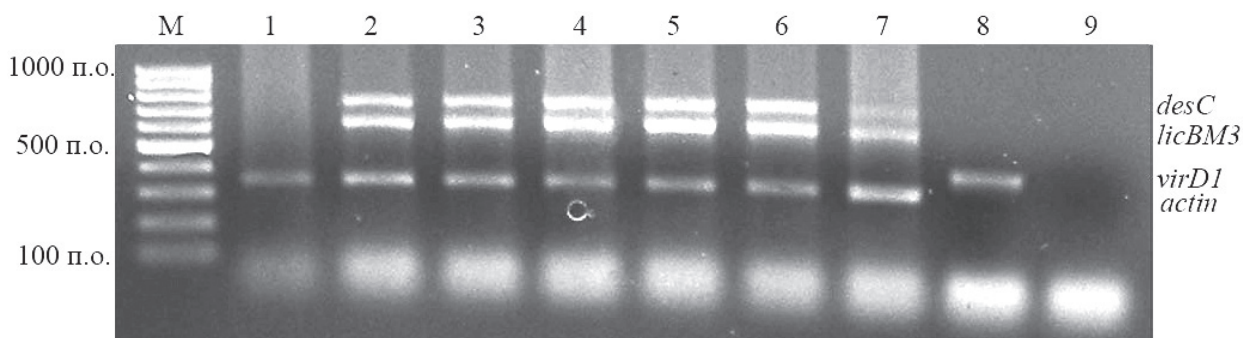


Рис. 2. Результаты МПЦР с ДНК орхидей DL534(13), трансформированных pNPB14, с использованием четырех пар праймеров (к генам *desC*, *licBM3*, *virD1* и актина). 1 – ДНК нетрансформированной орхидеи; 2-6 - ДНК орхидей, трансформированных pNPB14; 7 - ДНК *Nicotiana tabacum*, трансформированной pNPB14; 8 – ДНК *Agrobacterium tumefaciens* GV3101; 9 - негативный контроль без ДНК; М – 100 bp ДНК маркер

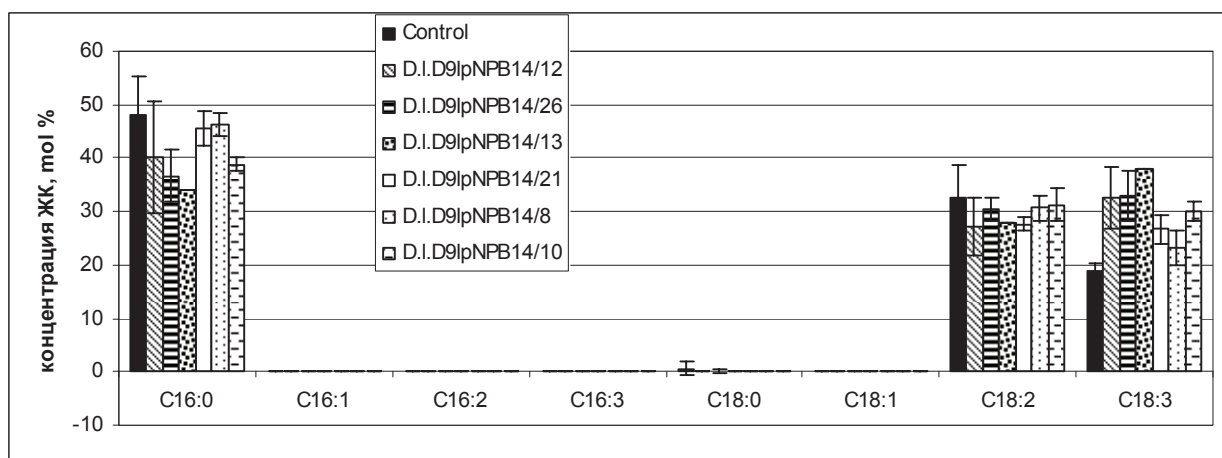


Рис. 3. Соотношение жирных кислот в мембранах трансгенных линий *D. linguella*. В качестве контроля использованы нетрансгенные растения. На графике отмечено значение стандартного отклонения

Анализируя полученные результаты, следует отметить в первую очередь увеличение содержания C18:3 жирной кислоты в результате экспрессии десатуразы, отвечающей за введение первой двойной связи в позиции $\Delta 9$ и образование мононенасыщенных жирных кислот. Очевидно, что именно их количество является лимитирующим для дальнейших реакций, ведущих к формированию линоленовой кислоты. Уменьшение доли пальмитиновой кислоты, которая

является одним из субстратов для $\Delta 9$ -десатураз, на фоне отсутствия детектируемого количества других C16 жирных кислот позволяет предположить возможность участия её мононенасыщенного производного в биосинтезе линоленовой кислоты. Дальнейшая работа предполагает проведение физиолого-биохимического анализа полученных трансгенных растений с целью оценки их холодостойкости.

Выводы

Разработана методика культивирования *in vitro*, генетической трансформации, селекции и регенерации вторичных протокормов *D. linguella*. Получены линии трансгенных растений *D. linguella*, экспрессирующих гибридный ген $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы *desC::licBM3* цианобактерии *Synechococcus vulcanus* с сигналом хлоропластного транспорта.

Доказаны присутствие и экспрессия трансгена в полученных растениях, выделены линии с максимальным уровнем экспрессии гибридного гена. Для ряда полученных линий трансгенных растений показаны изменения спектра жирных кислот мембранных липидов в сторону накопления триненасыщенной линоленовой кислоты.

Работа выполняется при поддержке гранта НАНУ УкрИНТЭИ № 0110U006062.

Литература

1. Guschina I.A., Harwood J.L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms // FEBS Letters. – 2006. – Vol. 580. – P. 5477–5483.
2. Thelen J.J., Ohlrogge J.B. Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants // Metabolic Engineering – 2002. – Vol. 4. – P. 12–21.
3. Лось Д.А. Структура, регуляция экспрессии и функционирование десатураз жирных кислот // Успехи биологической химии – 2001. – Т. 41. – С. 163–198.
4. 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. – С. 868–876.
5. Horsch R.B., Fry J., Hoffmann N., Eicholtz D., Rogers S., Fraley R. A simple and general method for transferring genes into plants // Science. – 1985. – Vol. 227. – P. 1229–1231.
6. Shepard J.F., Totten R.E. Mesophyll cell protoplasts of potato: isolation, proliferation, and plant regeneration // Plant Physiol. – 1977. – Vol. 60. – P. 313–116.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
8. Gamborg O.L., Miller L.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. – 1968. – Vol. 50. – P. 151–158.
9. I. N. Berdichevets, H. R. Shimshilashvili, I. M. Gerasymenko, Y. R. Sindarovska, Y. V. Sheludko and I. V. Goldenkova-Pavlova Multiplex PCR assay for detection of recombinant genes encoding fatty acid desaturases fused with lichenase reporter protein in GM plants // Anal. Bioanal. Chem. – 2010. – Vol. 397. – P. 2289–2293.
10. Герасименко И. М., Сахно Л. А., Головач И. С., Кищенко Е. М., Синдаровская Я. Р., Шимшилашвили Х. Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. Получение растений, несущих гены ацил-липидных десатураз цианобактерий // Вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14, №1. – С. 127–133.
11. Wood T. M., Bhat K. M. Methods for measuring cellulase activities // Methods Enzymol. – 1988. – Vol. 160. – P. 87–112.
12. Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // Anal. Biochem. – 1993. – Vol. 211. – P. 139–143.

KYRPA T.N.¹, RUDAS V.A.¹, OVCHARENKO O.A.¹, KLEBANOVICH A.A.¹, GERASYMENKO I.M.¹, IVANNIKOV R.V.², OSTAPCHUK A.N.³, GOLDENKOVA-PAVLOVA I.V.⁴, SHELUDKO Y.V.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NASU*

Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str. 148, e-mail: ysheludko@ukr.net

²*Grishko Central Botanical Garden NASU*

Ukraine, 01014, Kiev, Timiryazevska str. 1

³*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NASU*

Ukraine, 03680, Kiev, Zabolotnogo str. 152

⁴*Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS*

Russia, 127276, Moscow, Botanicheskaya str. 35

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF $\Delta 9$ -ACYL-LIPID DESATURASE OF CYANOBACTERIA IN ORCHID *DENDROBIUM LINGUELLA* RCHB. F.

Aims. Heterologous expression of desaturases in plants may cause change in fatty acid spectrum and improve their cold resistance. **Methods.** Transgenic plants were selected and analyzed after *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. **Results.** Protocols of *D. linguella in vitro* cultivation, genetic transforma-

tion and plant regeneration were developed. Transgenic plants of *D. linguella* carrying *desC::licBM3* hybrid gene were selected and analyzed. **Conclusions.** *D. linguella* plants with high level of transgene expression showed change in fatty acid spectrum toward linolenic acid accumulation.

Key words: desaturase, transgenic plants, *Dendrobium linguella*.

КОМИСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСКАЯ С.И., АДАМЕНКО Н.И., ТИЩЕНКО Е.Н.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ *AGROBACTERIUM*-ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА (*HELIANTHUS ANNUUS L.*) *IN PLANTA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА *LBA4404*, НЕСУЩЕГО ПЛАЗМИДУ *pVi2E* С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ РНК-СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Перспективной методологией для повышения устойчивости растений к абиотическим стрессам является генетическая инженерия, в рамках которой важен анализ целесообразности использования конкретных генов, связанных с этим процессом. В частности, представляет интерес ключевой ген катаболизма пролина – пролиндегидрогеназа (ProDH). Супрессия этого гена может приводить к увеличению содержания пролина и повышению уровня стресс-устойчивости растений [1-3].

Подсолнечник (*Helianthus annuus L.*) – одна из основных и наиболее рентабельных масличных культур в мире и в Украине. Поэтому получение растений подсолнечника устойчивых к различным неблагоприятным условиям среды является важной экономической задачей. При разработке системы методов генетической трансформации подсолнечника внимание исследователей главным образом сконцентрировано на *Agrobacterium*-опосредованной трансформации как направлении молекулярной биотехнологии, при котором наиболее часто наблюдается стабильная экспрессия трансгенов [4-6].

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96А/3, 16А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института), VK-121 (селекции Института масличных культур НААН Украины, Запорожская обл., п. Солнечный).

Agrobacterium-опосредованную трансформацию проводили штаммом *LBA4404*, содержащим бинарный вектор *pVi2E* с двухцепочечным РНК-супрессором гена пролиндегидрогеназы, полученным на основе гена арабидопсиса ProDH1, а также селективный ген неомицинофосфотрансферазы (*npt II*) *E. coli* (рис.1). Век-

Результаты исследований генетической трансформации ряда видов однодольных и двудольных растений показали, что трудоёмкие и экономически затратные процедуры культивирования *in vitro* можно заменять применяя метод *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений *in planta* [7-12]. В связи с возможностью интеграции Т-ДНК в геном растений при опылении, представляет интерес метод Чумакова М.И. и соавт. [10], с использованием которого нами получены инбредные линии кукурузы, содержащие двухцепочечный РНК-супрессор (дцРНК-супрессор) гена пролиндегидрогеназы и их семенное поколение [12].

Частота генетической трансформации зависит от многих факторов, в том числе генотипа растений, штамма *Agrobacterium tumefaciens*, плазмидного вектора, условий инокуляции и культивирования. Цель данной работы состояла в анализе эффективности интеграции в геном подсолнечника дцРНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*.

торная конструкция любезно предоставлена к.б.н. Кочетовым А.В. (Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск). Агробактерию наращивали в течение суток в жидкой LB-среде при 200 об/мин, 26-28 °С, центрифугировали при 1700 g 10 мин [13]. Затем ресуспендировали в среде IM, которая содержала 12,5 mM MES (2-(N-морфолино) этансульфоновую кислоту), 4 mM NH₄Cl, 5,5 mM MgSO₄, pH 5,7 [14, 15].

Agrobacterium-опосредованную трансформацию инбредных линий 96А/3, 16А/3, VK-121 *in planta* проводили в условиях вегетацион-

ного опыта. До начала цветения корзинки изолировали пергаментными изоляторами. После нанесения суспензии агробактериальных клеток (оптическая плотность 0,2–1,0 О.Е.) на рыльце пестика трубчатых цветков 1–7 рядов корзинки вновь изолировали. При этом опыление осуществлялось естественно пылью того же растения. Для инокуляции использовали среду IM,

дополненную 0,01% (по объёму) Silwet L-77 („Lehle Seed”, США). Для оценки *Km*-устойчивых побегов стерильные зрелые семечки культивировали *in vitro* при селективной концентрации антибиотика в течение 3-х пассажей. Интеграцию рекомбинантной молекулы ДНК оценивали по наличию экзона гена *pro1* арабидопсиса.

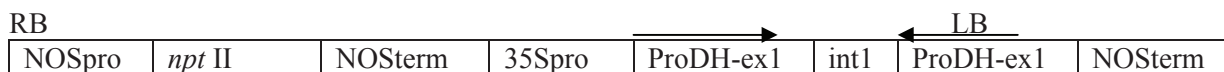


Рис. 1. Блок-схема Т-ДНК области pBi2E:

NOSpro и 35Spro – соответственно промоторы гена нопалинсинтазы и 35S вируса мозаики цветной капусты; ProDH-ex1 – фрагмент первого экзона гена ProDH1 арабидопсиса; *int1* – фрагмент первого интрона гена *pro1* арабидопсиса; NOSterm – сигнал полиаденилирования гена нопалинсинтазы; *npt II* – ген неомицинофосфотрансферазы *E. coli*, RB, LB – повторы, ограничивающие Т-область

ДНК выделяли из листьев *Km*-устойчивых и контрольных побегов, используя комплекс реактивов «ДНК-сорб-С» («Amplisens», Россия). Наличие целевого гена в ДНК подсолнечника определяли ПЦР-методом. Применяли следующие праймеры для фрагмента первого экзона ProDH арабидопсиса: 5'-AACAA-ACTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC (F) и 5'-GAGAT-GTTGG-TCTAG-ATTTG-GCAGC (R), размер ампликона составлял 545 п.о. Реакционная смесь включала буфер для ПЦР Dream Green Buffer TM (Fermentas), по 0,25 мМ каждого дАТФ, дГТФ, дТТФ, дСТФ и 1 ед. полимеразы DreamTaq® (Fermentas), 30 нг ДНК, деионизированную воду до конечного объёма 20 мкл. Наличие агробактериальной примеси контролировали по гену *virC*, используя праймеры 5'-ATCAT-

TTGTA-GCGAC-T (F) и AGCTC-AAACC-TGCTT-C (R), размер ампликона составлял 730 п.о. [16].

ПЦР-анализ проводили в амплификаторе Mastercycler^R personal 5332 Eppendorf, используя для определения фрагментов ProDH-ex1 следующую программу: денатурация 94°C 4 мин и 35 циклов: – денатурация 94°C 30 с, реассоциация 54°C 30 с, элонгация 72°C 35 с, конечная элонгация 72°C 10 мин; а для *virC* отличия были только в температуре реассоциации - 59 °C 30 с. Электрофорез ДНК проводили в 1,2 %-ном агарозном геле в буфере 0,5x TBE, содержащем 0,5 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

Для генетического улучшения подсолнечника исследовали эффективность использования *Agrobacterium*-опосредованной трансформации растений инбредных линий *in planta*. При этом анализировали влияние концентрации суспензии клеток агробактерии в инокуляционной среде IM при разных способах нанесения на завязь в период опыления. Наиболее оптимальной была инъекция на рыльце пестика 20–30 мкл суспензии клеток агробактерий в диапазоне оптической плотности 0,4–0,6 О.Е. При этом зрелые зерновки формировались в диапазоне с частотой ~ 50 ÷ 80% независимо от генотипа и по морфологическим показателям не отличались от контроля. Для повышения эффективности интродукции Т-ДНК в инокуляционную среду добавляли Silwet L-77 – поверхностно-активное вещество низкой токсичности, часто используемое

при трансформации *in planta* [8]. Для генетической трансформации подсолнечника достаточная концентрация этого детергента составила 0,01%.

Проверка на устойчивость к селективному агенту показала, что процент 6-недельных *Km*-устойчивых проростков, полученных после проращивания семян трансформированных растений инбредных линий 96А/3, 16А/3 и VK-121 составил 27,2%, 40,0%, 25,0% соответственно. ПЦР-анализ подтвердил наличие фрагмента гена *pro-ex1* в ДНК инбредных линий 96А/3 и VK-121, у которых составлял 12% и 25% (при случайной выборке из 25 и 4 семян) соответственно. Что касается инбредной линии 16А/3, то, несмотря на относительно высокий уровень устойчивости к селективному агенту (40%), в выборке из 6-ти *Km*-устойчивых проростков не зафиксировано

наличие фрагмента целевого гена.

Дальнейшее исследование семенного T1-поколения T0-растения инбредной линии VK-121 подтвердило наличие фрагмента гена ProDH-ex1 в ДНК *Km*-устойчивых проростков (рис. 2). Согласно результатам молекулярно-генетического анализа по гену *virC* штамма

LBA4404, агробактериальная примесь в растениях подсолнечника, трансформированных *in planta*, отсутствовала (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют о возможности стабильной интеграции рекомбинантных молекул ДНК в геном подсолнечника при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta*.

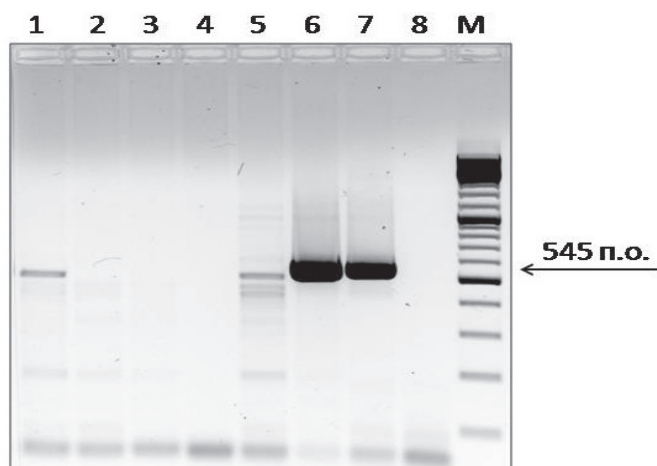


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК инбредных линий подсолнечника с использованием праймеров к первому экзону гена ProDH1 арабидопсиса:

1 – листья *Km*-устойчивого и 2 – *Km*-неустойчивого проростков T1-поколения растений инбредной линии VK-121, трансформированных *in planta*; 3-4 – регенеранты подсолнечника инбредной линии 96A/3 и 16A/3, неустойчивые к селективному агенту; 5-6 – *Km*-устойчивые побеги инбредной линии 96-A/3, трансформированной *in vitro*; 7 – положительный контроль - ДНК *Arabidopsis thaliana*; 8 – негативный контроль (без ДНК); М – маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

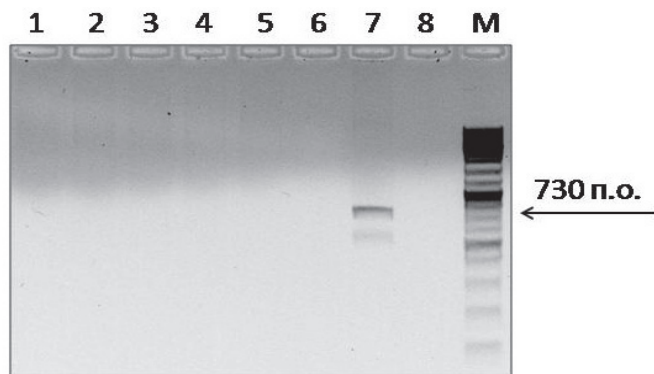


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК инбредных линий подсолнечника с использованием праймеров к гену *virC*:

1 – листья *Km*-устойчивого проростка T1-поколения растения инбредной линии VK-121, трансформированного *in planta*; 2-4 – регенеранты подсолнечника, неустойчивые к селективному агенту; 5, 6 – регенеранты подсолнечника инбредной линии 96-A/3; 7 – положительный контроль - ДНК штамма *LBA4404*; 8 – негативный контроль (без ДНК); М – маркер молекулярной массы GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas

Выводы

Оптимизированы условия *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* в пе-

риод цветения инбредных линий с использованием среды IM, содержащей Silwet L-77. С час-

тотой 50 – 80% получены семена инбредных линий, которые по морфологическим показателям не отличались от контроля. С использованием экзона гена пролиндегидрогеназы показана возможность стабильной интеграции трансгена в

растения подсолнечника, трансформированные *in planta*. Установлена генотипическая зависимость интеграции Т-ДНК при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации подсолнечника *in planta*.

Литература

1. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифонова 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.
2. Ибрагимова Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Роль генапролиндегидрогеназы в поддержании стрессоустойчивости у растений // Физиология растений. – 2012. – 59. – Р. 99-107.
3. Szabados LO., Savoure A. Proline: a multifunctional amino acid // Trends in Plant Science. – 2009. – Vol. 15, №2. – Р. 89–97.
4. Muller A., Iser M., Hess D. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.), using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker // Transgenic Research. – 2001. – Vol. 10. – Р. 435-444.
5. Knittel N., Hahne G., Lenee P. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A reliable protocol // Plant Cell Rept. – 1994. – Vol. 14. – Р. 81-86.
6. Malone-Schoneberg JB., Scelonge C.J., Burrus M., Bidney D.L. Stable transformation of sunflower using *Agrobacterium* and split embryonic axis explants // Plant Sci. – 1994. – Vol. 103. – Р. 199-207.
7. Steven J. Clough and Andrew F. Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* – mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // The Plant Journal. – 1998. – Vol. 16, №6 – Р. 735-743.
8. Andrew F. Bent. Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species // Plant Physiology. – 2000. – Vol. 124. – Р. 1540-1547.
9. Wang W.C., Menon G., Hansen G. Development of novel *Agrobacterium* – mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants // Plant Cell Rept. – 2003. – Vol. 22 – Р. 274-281.
10. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., Волохина И.В. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* // Генетика. – 2006. – Т. 42, №8. – С. 1083-1088.
11. Keshamma E., Rohini S., Rao K. S., Madhusudhan B., Kumar M. U. Tissue culture-independent *in planta* transformation strategy: an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer method to overcome recalcitrance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // The J. of Cotton Science. – 2008. – Vol. 12 – Р. 264-272.
12. Матвеева А.Ю. Метаболизм сахарози за *Agrobacterium*-опосредкованой трансформации кукурудзи: автореф. на здобуття наук. ступ. канд. біол. наук. – К., 2012. – 19 с.
13. 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.
14. Grimsley N., Hohn B., Ramos B., Kado C., Ragowsky P. DNA transfer from *Agrobacterium* to *Zea mays* or *Brassica* by agroinfection is dependent on bacterial virulence functions // Mol. Gene Genet. – 1989. – Vol. 217 (2-3). – 309-316.
15. Albert B., Lucas O., Gall V.L., Albert G. Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression // Physiol. Plantarum. – 1999. – Vol. 106. – Р. 232-237.
16. 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 – Р. 828-831.

KOMISARENKO A.G., MYCKHALSKAYA S.I., ADAMENKO N.I., TISCHENKO E.N.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska St., 31/17, e-mail: oltyko@gmail.com*

THE ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF THE SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.) *AGROBACTERIUM*-MEDIATED TRANSFORMATION *IN PLANTA* USING STRAIN LBA4404 HARBORING PLASMID pBi2E WITH DOUBLE-STRANDED PROLINE DEHYDROGENASE GENE RNA-SUPPRESSOR

Aims. The effectiveness of (*Helianthus annuus* L.) transformation *in planta* using strain LBA4404 harboring plasmid pBi2E with dsRNA-suppressor (double sequence RNA-suppressor) of proline dehydrogenase gene and selective neomycin phosphotransferase II gene (*nptII*) was analyzed. **Methods.** *Agrobacterium*-mediated

genes transfer *in planta* during sunflower's pollination. **Results.** Seeds, RCR-analysis of which confirmed availability *pro1* gene exon, of T0- and T1- sunflower's plants have been obtained. **Conclusions.** It has been shown the possibility of stable integration of the transgene at the sunflower's genome under *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.

Key words: *Helianthus annuus* L., *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*.

КОСТЮКОВА Е.Е., НАМ И.Я., ЗАЯКИН В.В.

Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского

Россия, 241036, г. Брянск, ул. Бежицкая, 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru, wild.biologist@mail.ru

РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ЛУКОВИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ РЕДКОГО ОХРАНЯЕМОГО РАСТЕНИЯ *LILIUM MARTAGON* L.

В связи с ускоряющимися темпами исчезновения многих видов растений появляется необходимость разработки методов их размножения и сохранения. Особенно это касается редких декоративных и лекарственных растений, для которых реинтродукция является одним из возможных способов восстановления природных популяций.

Лилия кудреватая (*Lilium martagon* L.) во

многих областях нашей страны считается чрезвычайно редким растением и подлежит охране [1, 2, 3, 4, 5]. Это многолетнее травянистое растение относится к семейству Liliaceae [6]. Чувствительность к малейшим изменениям условий увлажнения и освещения, неконтролируемый сбор местным населением приводят к истощению природных популяций [7].

Материалы и методы

Целью нашей работы было получение однородного посадочного материала *L. martagon* с помощью применения метода микроклонального размножения. Для опыта по регенерации были использованы растения *L. martagon* найденные на территории Брянской области и ранее введенные в культуру *in vitro* [8].

В качестве эксплантов для размножения *in vitro* использовались луковичные чешуйки пробирочных растений. Целые луковичные чешуйки размером 0,5 см длиной помещали на питательные среды с различными регуляторами роста: 1) 0,12 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,25 мг/л индолил-3-уксусной кислоты (ИУК);

2) 0,25 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК;

3) 0,5 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК;

4) 1 мг/л БАП, 2 мг/л ИУК.

Питательные среды готовили по прописи MS [9], с добавлением 30 г/л и 60г/л сахарозы, pH 5.8. Стерилизацию питательных сред проводили при температуре 120°C в течение 25±3 минут.

Измерение длины и количества побегов с листьями, а также подсчет количества корней на 1 эксплант велись с интервалом в 10 дней.

Первые 10 дней экспланты находились в темноте, после чего были перенесены на искусственное освещение с фотопериодом: 16/8 ч свет/темнота.

Результаты и обсуждение

Начало морфогенеза было отмечено на 10 день на всех вариантах питательных сред с содержанием сахарозы 30 г/л и на 15 день на средах с содержанием сахарозы 60 г/л. Лишь в одном варианте с 1 мг/л БАП и 2 мг/л ИУК и концентрацией сахарозы 60 г/л, образование регенератов началось только на 25 день опыта (рис.1, 2). Образование побегов преимущественно наблюдалось на базальной части чешуек.

В результате проведенного опыта нам удалось подобрать условия, при которых регенерация растений идет без образования каллусной ткани.

К концу опыта максимальное количество точек регенерации образовалось на среде с 0,25 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК и концентрацией сахарозы 60г/л, однако первые точки регенерации появились на среде с концентрацией сахарозы 30г/л (рис.2, 3).

К 45 дню интенсивное развитие регенерантов наблюдалось на всех вариантах сред (рис.1, 2). К концу опыта максимальная высота побегов отмечена на среде с 0,25 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК и концентрацией сахарозы 30г/л, незначительно отстают по этому показателю остальные варианты сред (рис. 4).

На 10 день проведения опыта на средах с 0,21 мг/л БАП и 0,25 мг/л ИУК и концентрацией сахарозы 30г/л началось формирование корневой системы в местах образования регенерантов. К 20 дню формирование корневой системы было отмечено на среде с 0,25 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК и к 28 дню на среде с 1 мг/л БАП и 2 мг/л ИУК (рис.2). На среде с концентрацией сахарозы 60г/л формирование корневой системы началось лишь к 25 дню на вариантах сред 0,21 мг/л БАП, 0,25 мг/л ИУК; 0,25 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК и 1 мг/л БАП, 2 мг/л ИУК. На среде с 0,5 мг/л БАП, 1 мг/л

ИУК образование корней началось только к 35 дню проведения опыта (рис.1).

При сравнении рисунков 1 и 2 видно, что начиная с 45 дня на средах с 0,21 мг/л БАП, 0,25 мг/л ИУК и 0,25 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК замечено самое интенсивное корнеобразование. По образованию корней заметно отстают варианты с 0,5 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК и 1 мг/л БАП, 2 мг/л ИУК. На вариантах сред с концентрацией сахарозы 60г/л количество корней больше, но при этом их размеры меньше, чем в варианте с концентрацией сахарозы 30г/л (рис.1-4).

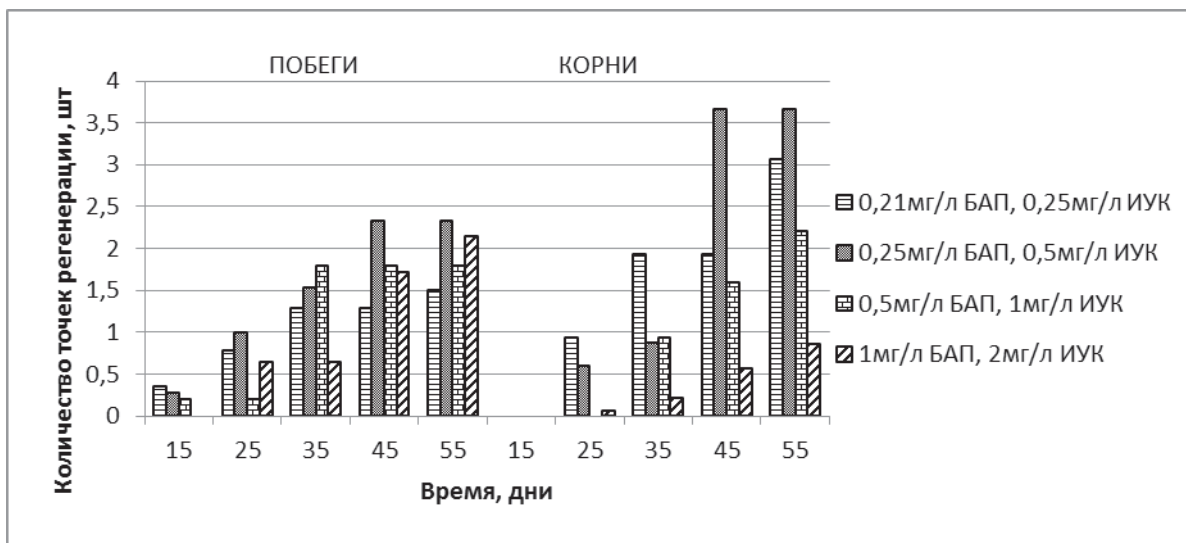


Рис. 1. Влияние фитогормонов на частоту регенерации в динамике (сахароза 60 г/л)

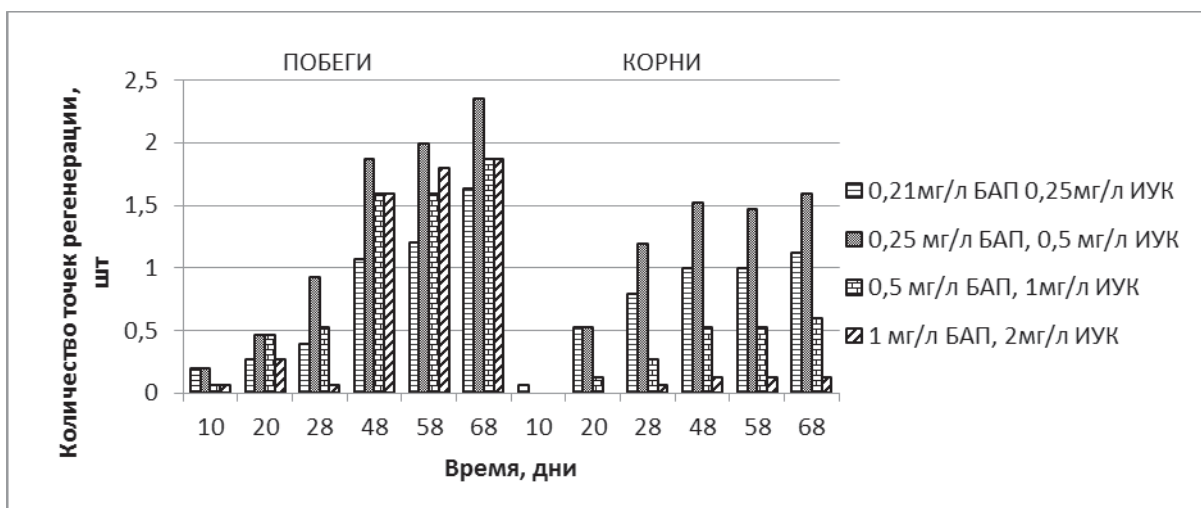


Рис. 2. Влияние фитогормонов на частоту регенерации в динамике (сахароза 30 г/л)

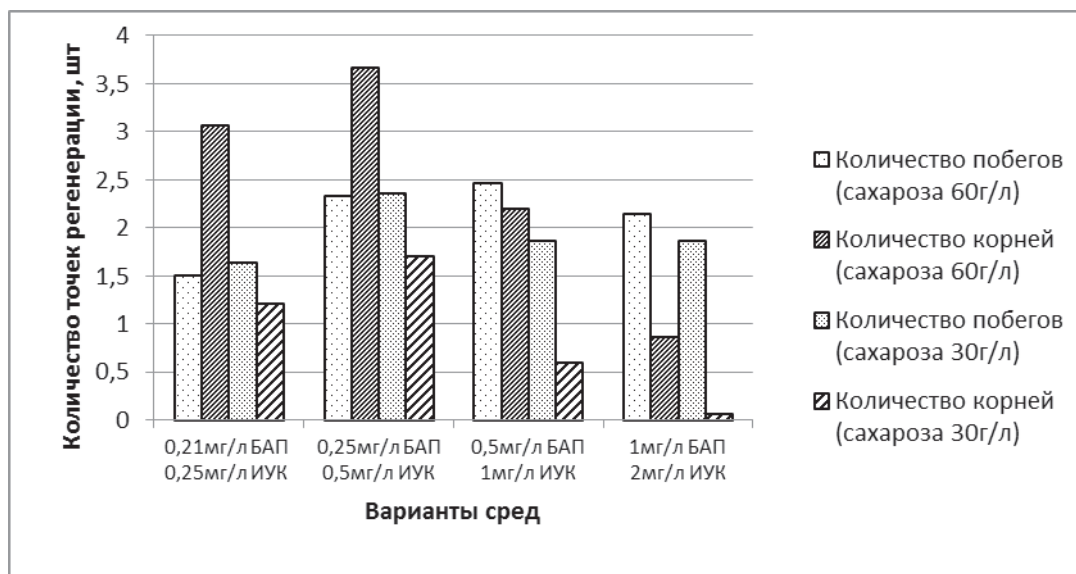


Рис. 3. Влияние фитогормонов на образование точек регенерации (через 55 и 68 дней)

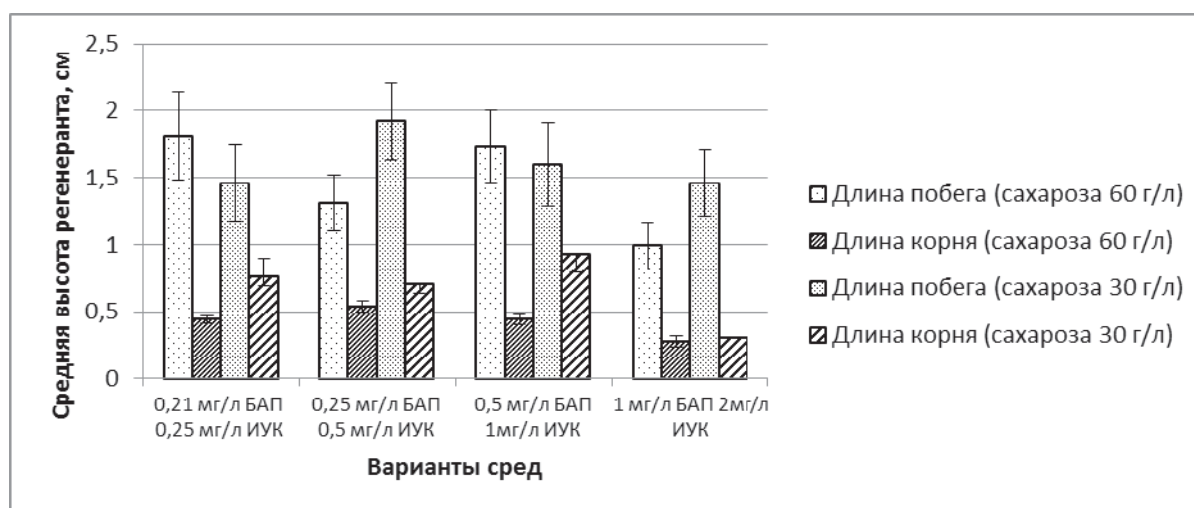


Рис. 4. Влияние фитогормонов на величину регенерантов (через 55 и 68 дней)

Спустя 2 месяца побеги переносили на среду MS для дальнейшего роста и размножения.

Процесс ризогенеза проводили на среде MS/2 с содержанием 0,5 мг/л ИУК, что способствовало образованию развитой корневой системы

Выводы

Нами были выявлены сочетания концентраций фитогормонов БАП и ИУК, наиболее активные при регенерации растений *L. martagon* из луковичных эксплантов. Самый высокий уровень регенерации был получен на среде с 0,25 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК и концентрацией сахарозы 60 г/л. Несколько ниже по количеству регенерантов были остальные варианты опыта. На

темы и формированию растений готовых к пересадке в почву.

В настоящее время растения перенесены в мини-парник и адаптированы к нестерильным условиям.

средах с концентрацией сахарозы 30г/л побеги были более развитые.

Таким образом можно сделать вывод, что наиболее подходящей средой для регенерации растений из луковичных чешуек является вариант среды с 0,25 мг/л БАП, 0,5 мг/л ИУК с концентрацией сахарозы 60 г/л или 30 г/л.

Литература

1. Красная книга Брянской области. Растения / Сост. О.И. Евстигнеев, Ю.П. Федотов, Н.Н. Панасенко и др. – Брянск, 2004. – 272 с.
2. Красная книга Пензенской области. Т.1: Грибы и сосудистые растения / Сост. А.И. Иванов, Л.А. Новиков, А.А. Чистякова и др. – Пенза, 2002. – 160 с.
3. Красная книга Республики Мордовия. Т.1. Редкие виды растений, лишайников и грибов / Сост. Т.Б. Силаева. – Саранск, 2003. – 288 с.
4. <http://xn--80aaalyjcwczm4o.xn--c1aj2a.xn--p1ai/plant/62/>
5. <http://www.plantarium.ru/page/view/item/22760.html>
6. Губанов И. А. и др. *Lilium martagon* L. [*L. pilosiusculum* (Freyn) Miscz.] — Лилия саранка // Иллюстрированный определитель растений Средней России. В 3 т. – М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл., 2002. — Т. 1. – С. 466.
7. Костюкова Е.Е., Заякин В.В., Нам И.Я. Клональное микроразмножение *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов растений, занесенных в Красную книгу Брянской области // Сб. матер. международной научно-практической конференции молодых ученых «Современная биотехнология: фундаментальные проблемы, инновационные проекты и бионанотехнология», Брянск, 2010. – С. 71-75
8. Му-За-Чин В.В., Нам И.Я. Клональное микроразмножение лилии саранки в культуре *in vitro* // Теоретические основы применения биотехнологии, генетики и физиологии растений в современной селекции растений и растениеводстве / Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых. Брянск, 2009. – С. 193-186.
9. Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plantarum*. – №15. – P. 473-497.

KOSTYUKOVA E.E., NAM I.Y., ZAYAKIN V.V.

Bryansk State University named after academician I.G. Petrovsky

Russia, 241036, Bryansk, Bezhitskaya str., 14, e-mail: iyanam1@yandex.ru, wild.biologist@mail.ru

COMPETENCE FOR REGENERATION ON BULBLET EXPLANTS OF RARE AND ENDANGERED PLANT OF LILIUM MARTAGON L.

Purpose. In this study organogenic capacity of bulblet of *Lilium martagon* L. was examined. **Methods.** The effect of different plant growth regulators on regeneration of *L. martagon* was studied on Murashige and Skoog's (MS) medium. For regeneration different plant growth regulators added to MS basal medium were used. **Results.** Our results indicate that indole acetic acid and 6- benzilaminopurine promoted shoot regeneration and root formation from bulblet explants. Plantlets were acclimatized well in a greenhouse conditions. **Conclusions.** Best results was obtained on MS basal medium with 0.25mg/l 6- benzilaminopurine and 0.5mg/l indole acetic acid.

Key words: *Lilium martagon* L., plant growth regulators, regeneration, bulblet explants.

КРУГЛОВА А.Е., КРУГЛОВА Н.Н.

Институт биологии Уфимского научного центра РАН

Россия, 450054, г. Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: aneta@ufaras.ru

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ *OXYTROPIS BASCHKIRENSIS* KNJASEV В ЭМБРИОКУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Сохранение редких и находящихся под угрозой исчезновения растений как составная часть сохранения биологического разнообразия – важнейшая научная проблема. Одним из эффективных приемов сохранения, размножения и увеличения численности особей редких и исчезающих видов является их интродукция в питомники ботанических садов [1]. Коллекции интродуцированных редких видов служат базой для их реинтродукции (репатриации) в естест-

венные местообитания и тем самым – сохранения и восстановления природных популяций [2]. В то же время, для проведения реинтродукционных работ требуется значительное количество качественных проростков интродуцированных растений. Перспективные современные способы массового получения и тиражирования редких и исчезающих растений состоят в разработке различных биотехнологий получения их проростков-регенерантов в культуре *in vitro*. Одно из

направлений таких разработок – использование метода эмбриокультуры *in vitro*, основанного на детальном знании по формированию и развитию зародыша.

Род *Oxytropis* (Остролодочник), сем. *Fabaceae* Lindl. (Бобовые), включает многие редкие эндемичные и реликтовые виды, внесенные в «Красные книги» ряда регионов России. Один из представителей этого рода остролодочник башкирский *Oxytropis baschkirensis* Knjasev (выделен из вида остролодочник сходный *Oxytropis ambigua* (Pall.) DC.) относится к группе редких

Материалы и методы

Использовали средневозрастные генеративные растения *O. baschkirensis*, произрастающие в питомнике редких и исчезающих видов растений Института биологии Уфимского научного центра РАН (г. Уфа). Происхождение образца: Республика Башкортостан, Учалинский район, гора Микагир.

Применили следующие методы исследований:

1) метод фенологических наблюдений [4]; 2) методы цитологических (светооптических) исследований [5], при этом постоянные препараты окрашивали согласно методике тройного окрашивания, просматривали и фотографировали

Результаты и обсуждение

Формирование и развитие зародыша *O. baschkirensis* приходится на такие фенологические фазы, как конец цветения и начало плодоношения (с учетом частичного перекрывания этих фаз).

Согласно результатам цитогистологического исследования, зрелый четырёхклеточный пятиядерный зародышевый мешок (женский гаметофит) представлен развитой яйцеклеткой, двумя клетками-синергидами и центральной клеткой с двумя неслившимися полярными ядрами. Антиподы полностью дегенерированы. Перед оплодотворением яйцеклетки отмечено слияние полярных ядер центральной клетки. В клетках-синергидах большое развитие получают крючкообразные выросты, служащие для лучшего привлечения пыльцевой трубки.

Развитие зародыша начинается с формирования зиготы. Синергиды постепенно дегенерируют. Зигота после некоторого периода созревания делится поперечной перегородкой, формируя равные по размерам клетки двуклеточного зародыша. Клетки двуклеточного зародыша претерпевают поочередно деление с формированием сначала трёхклеточного, затем Т-

исчезающих эндемиков Южного Урала, включенных в «Красную книгу Республики Башкортостан» [3]. В Институте биологии Уфимского научного центра РАН ведутся интродукционные исследования этого вида, начаты работы по его реинтродукции в естественные условия местобитания.

Цель данного исследования состояла в разработке основных этапов биотехнологии получения регенерантов *Oxytropis baschkirensis* Knjasev в эмбриокультуре *in vitro*.

ли с применением светового микроскопа Axio Imager 1 (Carl Zeiss, Jena), а также с помощью цифрового микроскопа проходящего света Микровизор mVizo-103 (ООО «ЛЮМО ФОТОНИКА», Санкт-Петербург), измерения проводили при помощи шкалы окуляр-микрометра; 3) метод эмбриокультуры *in vitro* в разработке сотрудников лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского научного центра РАН [6]. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Microsoft Office Excel 2003.

образного четырёхклеточного зародыша. В целом, по признакам слияния полярных ядер перед оплодотворением, поперечного деления зиготы и Т-образного расположения четырёхклеточного зародыша, ранний эмбриогенез *O. baschkirensis* проходит согласно Onagrad-типу, характерному для большинства представителей сем. *Fabaceae* [7].

Продольные и поперечные деления клеток четырёхклеточного зародыша ведут к формированию восьмиклеточного зародыша. На этой стадии из центральной клетки зародышевого мешка формируется эндосперм, который быстро и целиком поглощается развивающимся зародышем уже на следующей глобулярной стадии. Глобулярная стадия зародыша весьма длительна, и зародыш дифференцируется достаточно поздно. По мере дальнейшего развития зародыш вытягивается в форму торпеды, а затем принимает сердцевидную форму. Постепенно формируется зрелый зародыш с зачаточными корнями (один основной и два адвентивных) и почечкой.

В целом, эмбриогенез *O. baschkirensis* происходит без отклонений от нормы и типично

для представителей сем. *Fabaceae* (обзор [8]).

При разработке этапов биотехнологии использовали зародыши, изолированные на следующих стадиях эмбриогенеза: глобулярный (длиной 0,1–0,2 мм), торпедовидный (длиной 0,8–1,3 мм), сердечковидный (1,5–2,0 мм), зрелый (длиной 2,3–2,5 мм) зародыши. Зародыши на более ранних стадиях эмбриогенеза в экспериментах не использовали в силу их значительной миниатюрности, что представляло определенную методическую трудность.

Культивируемые зародыши инокулировали на питательную среду, составленную по прописи Murashige, Skoog [9]. Подобранный нами эмпирически фитогормональный состав питательной среды был постоянным (know how Института биологии Уфимского научного центра РАН, № 0015-2012). Культивирование *in vitro* зародышей проводили в темноте при температуре +22°C.

Установлено, что способность культивируемых *in vitro* зародышей к формированию регенерантов в условиях выполненных экспериментов полностью зависела от стадии их развития в момент инокуляции.

Так, культивирование *in vitro* глобулярных и торпедовидных зародышей приводило к формированию обводненных каллусов желтоватого цвета, неопределенной формы, рыхлой мягкой консистенции. По данным цитогистологического анализа, такой каллус пред-

ставлен рыхло расположенными крупными клетками с большими межклетниками. Немногочисленные ядра обнаружены только в клетках центральной зоны каллуса. В ходе дальнейшего культивирования каллус постепенно дегенерировал. Согласно литературным данным [6; и др.], каллусы такой морфологии и структуры относятся к неморфогенным.

В результате культивирования *in vitro* сердечковидных зародышей наблюдали формирование каллусов плотной компактной консистенции, матового белого цвета, узловатой формы. Цито-гистологический анализ показал, что клетки таких каллусов достаточно однородны, плотно прилегают друг к другу, вакуолизированы незначительно, имеют крупные ядра, занимающие центральное положение, и плотную клеточную стенку, в основном правильную изодиаметрическую форму, а в целом – меристематичны. Согласно литературным данным [6; и др.], каллусы такой морфологии и структуры следует отнести к морфогенным, способным дать начало множеству растений-регенерантов. Однако для получения регенерантов *O. baschkirensis* из сердечковидных зародышей через этап морфогенного каллуса необходимо дополнительно провести серию специальных экспериментов.

Культивирование *in vitro* зрелых зародышей приводило к прямой регенерации проростков с хорошо развитой корневой системой (рис.).

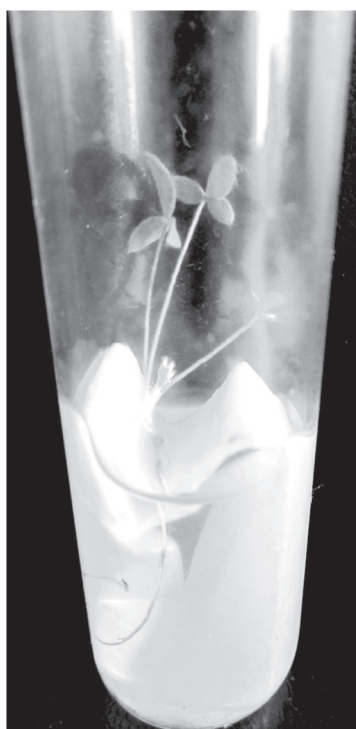


Рис. Регенерант *O. baschkirensis*, полученный в эмбриокультуре *in vitro* из зрелого зародыша. Ув. 1.8

Такой результат неудивителен, поскольку в зрелом зародыше, по-видимому, имеется определенный уровень эндогенных регуляторов роста, обеспечивающих в сочетании с другими веществами его дальнейшую нормальную дифференциацию и прорастание.

Проростки с развитой корневой системой

Выводы

Впервые разработана биотехнология получения регенерантов *O. baschkirensis* в условиях эмбриокультуры *in vitro*.

Технология включает следующие принципиальные этапы: I. Отбор экспланта (зрелый зародыш определенной длины). II. Подготовка питательной среды определенного состава. III. Инокуляция экспланта на питательную среду *in vitro*. IV. Культивирование экспланта *in vitro* в темноте при температуре +22°C. V. Получение укоренившихся регенерантов, их перенос в лабораторные почвенные условия и выращивание в режиме, имитирующем летний световой день. VI. Перенос регенерантов в почвенные условия

переносили из пробирок в условия *ex vitro* в стаканчики с почвенным субстратом и выращивали на лабораторной площадке в режиме, имитирующем летний световой день. Хорошо укоренившиеся проростки переносили в почвенные условия открытого грунта интродукционного питомника.

открытого грунта.

Такая технология позволяет стабильно и надежно получать регенеранты *O. baschkirensis* по схеме «один зародыш – один регенерант». В то же время для массового тиражирования растений по схеме «один зародыш – много регенерантов» следует разрабатывать технологию получения регенерантов через этап формирования морфогенного каллуса из сердечковидного зародыша.

Исследование поддержано грантом по Государственной научно-технической программе Академии наук республики Башкортостан на 2013-2015 гг.

Литература

1. Стратегия ботанических садов по охране растений. – М., 1993. – 62 с.
2. Мулдашев А.А., Абрамова Л.М., Галеева А.Х., Маслова Н.В. Опыт реинтродукции редких видов растений в Республике Башкортостан // IV междунар. конф. «Биоразнообразии и биоресурсы Урала и сопредельных территорий». – Оренбург, 2008. – С. 321-324.
3. Красная книга Республики Башкортостан: в 2 т. Т. 1: Растения и грибы. – Уфа: МедиаПринт, 2011. – 384 с.
4. Бейдеман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. – Новосибирск: Наука, 1974. – 155 с.
5. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
6. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*: цито-гистологические аспекты. – Уфа: АН РБ, Гилем, 2011. – 124 с.
7. Анисимова Г.М. Опagrad-тип эмбриогенеза // Эмбриология цветковых растений. Т. 2. – СПб., 1997. – С. 510-512.
8. Чубирко М.М., Кострикова Л.Н. Семейство *Fabaceae* // Сравнительная эмбриология цветковых растений. Т.3. *Brumellinaceae-Tremandraceae*. – Л.: Наука, 1985. – С. 67-77.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, №3. – P. 473-497.

KRUGLOVA A.E., KRUGLOVA N.N.

Institute of Biology, Ufa Scientific Center of RAS

Russia, 450054, Ufa, pr. Oktyabrya, 69, e-mail: aneta@ufaras.ru

BIOTECHNOLOGY FOR OBTAINING *IN VITRO* OF REGENERATES OF *OXYTROPIS* RARE PLANTS ON THE BASIS OF EMBRYOLOGICAL DATES

Aims. *Oxytropis baschkirensis* is one of the rare plants at the South Ural flora. The aim of investigation is the elaboration of main biotechnological stages to obtain the regenerants by the embryo culture *in vitro*. **Methods.** Cyto-histological investigation of development of embryo. Discovery of the optimal embryogenesis stage for the inoculation to the medium *in vitro*. Choosing the optimal ingredients of the medium and the cultural conditions *in vitro* to the stably obtaining of regenerants with developed roots. Choosing the conditions

for the growing of regenerants on the soil substrate. Obtaining the plantlets. **Results.** The main stages of biotechnology for obtaining of regenerates by the embryo culture *in vitro* have developed. The success of culture *in vitro* is completely determined by the stage of embryogenesis of the inoculated embryo. **Conclusions.** The biotechnology of obtaining of regenerants by the embryo culture *in vitro* has made at the first time. Such biotechnology should stably and valid obtaining the regenerants following the outline: one embryo – one regenerant.

Key words: *Oxytropis baschkirensis*, biotechnology, embryo culture *in vitro*.

КУЗОВКОВА А.А.¹, МАЗУР Т.В.¹, АЗИЗБЕКЯН С.Г.², РЕШЕТНИКОВ В.Н.¹

¹ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: fioraia@nm.ru

²ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 13, e-mail: mechanochem@ifoch.bas-net.by

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА И СЕЛЕНИТА НАТРИЯ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО

Биологически активный микроэлемент селен (Se) эссенциален для одних организмов (бактерии, животные, люди) и благотворно влияет на другие (растения). В организме человека Se наряду с витаминами А, Е, и С считается одним из главных компонентов неферментативного пути антиоксидантно-антирадикальной защитной системы. Недостаточная обеспеченность организма селеном связана с этиологией многих, в том числе сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. Другая важная роль Se заключается в антагонизме с тяжелыми металлами, и в ряде работ показано протекторное значение Se при накоплении в организме кадмия и ртути [1]. Во многих географических регионах (и в Беларуси) регистрируются дефицитные обеспеченности йодом и селеном, сочетающиеся друг с другом. Дефицит Se усугубляет проявления йодной недостаточности, вызывая не только тиреоидную дисфункцию, но и индуцирует некротические, фиброзные изменения в щитовидной железе, стимулирует клеточную пролиферацию [2]. В ближайшие годы содержание Se в почве будет неуклонно падать, что связано с повсеместным уменьшением содержания гумуса, закислением и загрязнением тяжёлыми металлами. Для регионов с недостатком Se в окружающей среде ВОЗ установил норму физиологического потребления от 50 до 200 мкг Se в сутки [3], для достижения которой необходима коррекция питания. В источниках питания Se находится в двухвалентной органической форме, причем в животных продуктах преобладает селеноцистеин, а в растительных — селенометионин. Одним из способов коррекции уровня

Se в продуктах питания является использование селенообогащенной кормовой базы для скота и птиц [4], а также повседневный лечебно-профилактический прием биологически активных добавок (БАД) к пище. БАД с Se могут использоваться как нутрицевтики (для восполнения Se в организме) и парафармацевтики (с фармакологической активностью для регуляции отдельных функций организма и вспомогательной терапии заболеваний). Некоторые лекарственные растения-металлофиты накапливают Se и могут использоваться как БАД. В частности, фитопрепарат Setarud, состоящий из экстрактов Se-богатых растений пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), шиповника собачьего (*Rosa canina* L.) и крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), применяют как иммуномодулятор в комплексной терапии вирусных болезней, в том числе и ВИЧ [5,6].

В составе удобрений, добавок в корма и в ветеринарных препаратах, как правило, используют высокотоксичный (1 класс опасности) селенит (Se^{4+}) [7]. В последнее время в странах СНГ и за рубежом ведется поиск заменяющих селениты веществ, и поэтому проявляется повышенный интерес к медико-биологическим свойствам наночастиц нульвалентного Se (наноSe). Показано [8], что стабилизированные белком наночастицы Se с размерами 20–60 нм полностью сохраняют спектр биологической активности ионного Se, в частности, стимулируют синтез Se-содержащих ферментов, но при этом в несколько раз менее токсичны, чем селенит натрия. Применение препарата наноSe активировало систему антиоксидантной защиты ла-

бораторных мышей через повышение активностей каталазы и пероксидазы, способствовало уменьшению образования продуктов перекисного окисления липидов, а также положительно влияло на прирост массы в животноводстве [9].

Нами исследовалось влияние препарата наноSe и селенита натрия на физиолого-биохимические показатели клеточных культур (калусов) лекарственного растения многоко-

Материалы и методы

Каллусы инициировали в темноте из листьев и стеблей асептических растений *A. rugosa* на твердой 1/2 среде Мурасига-Скууга (МС) с 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0,1 мг/л – 6-бензиламинопурина (БАП). Каждые 15-16 дней каллусы пассировали на новую среду. Перед последним пассажем в среду МС добавляли 10 или 50 мг/л препарата наноSe или селенита натрия. Для анализов использовали листовую и стеблевую каллусы 14-го пассажа. Каллусы данного возраста относятся к длительнопассируемым, состоящим из полностью дедифференцированных клеток, образующих рыхлую массу. Экстракцию белков вели по [10] с

Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах по определению среднесмертельной дозы (ЛД50) на лабораторных мышах установлено, что острая токсичность наноSe на порядок ниже, чем у препарата в виде раствора селенита натрия (рисунок 1). По результатам анализа крови мышей

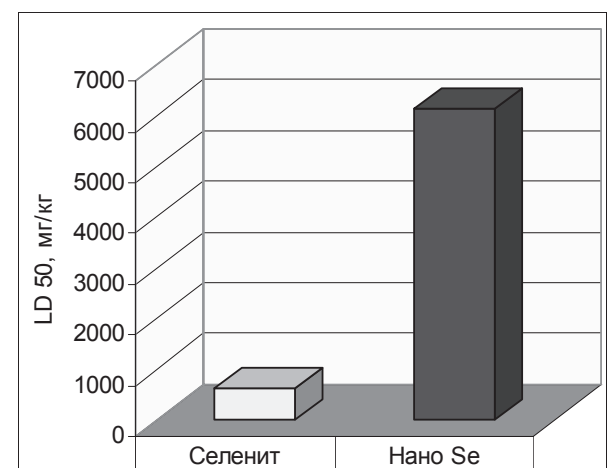


Рис. 1. Острая токсичность (ЛД50) селенита натрия и наноSe

лосник морщинистый (*Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze): на способность поглощать Se из культуральной среды, содержание белка и активность пероксидазы. В перспективе на основе данных каллусов планируется получить суспензионные культуры, способные синтезировать ценные биологически активные вещества, или, возможно, использовать препарат клеток как самостоятельный БАД.

нашими модификациями, используя 37,5 мМ трис-НСl буфер (рН 7,6), содержащий 5мМ аскорбата. Во всех экспериментах соотношение «навеска:буфер» было 1:3. Содержание белка определяли, используя набор реагентов «DC Protein Assay» (Bio-Rad, США). Активность пероксидаз оценивали по [11] и выражали в условных единицах на миллиграмм белка.

Препарат наноSe в виде стабилизированного коллоидного раствора наночастиц (35-60 нм) аморфного Se синтезирован в ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси».

показано, что использование наноSe обеспечивает существенно большую активность селенсодержащего антиокислительного фермента глутатионпероксидазы в длительном интервале измерений (15 суток) после инъекций (рис. 2).

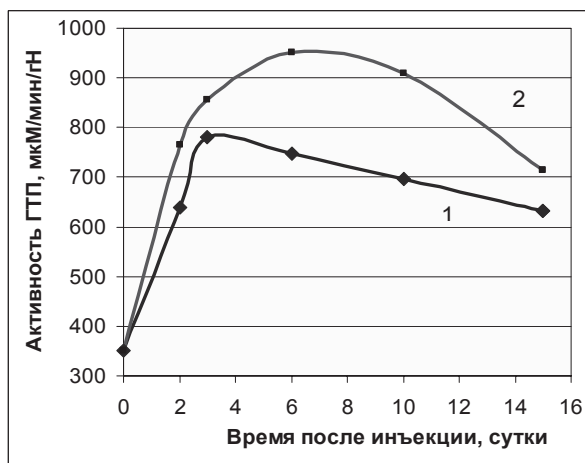


Рис. 2. Изменение активности глутатионпероксидазы при инъекции Se в виде Na_2SeO_3 (кривая 1) и наноSe (кривая 2)

В экспериментах с каллусами была подтверждена существенная разница в токсичности двух препаратов: листовые и стеблевые каллусы на средах и с 10, и 50 мг/л селенита натрия побурели и погибли, в то время как при использовании наноSe сохранили жизнеспособность.

Методом атомно-эмиссионной спектро-

метрии обнаружено (таблица 1), что используемые клетки стеблевого каллуса *A. rugosa* содержат довольно большое количество Se (36,5 ppm) — в 4 раза выше, чем в клетках листового каллуса и в 5 раз больше, чем, например, в растениях расторопши пятнистой [12].

Таблица 1. Поглощение наноSe и селенита натрия каллусами *A. rugosa*

Среда культивирования	Содержание Se, ppm (мкг/г сырой ткани)	
	Листовой каллус	Стеблевой каллус
Среда МС (контроль)	9,4	36,5
Среда МС с 10 мг/л наноSe	163,1	117,2
Среда МС с 50 мг/л наноSe	702,7	368,3
Среда МС с 10 мг/л селенита натрия	13656,7	22604,7
Среда МС с 50 мг/л селенита натрия	36748,3	40861,2

Степень поглощения наноSe, как листовым, так и стеблевым каллусом хоть и оказалась на два порядка ниже, чем для селенита натрия, но привела к заметному увеличению активности пероксидазы по сравнению с контролем для листового каллуса и меньшему подавлению активности фермента для стеблевого (таблица 2). Селенит натрия в исследуемых концентрациях

ингибировал активность пероксидазы на ~68–82% и в листовом, и в стеблевом каллусах. В исследованиях Храмцова и др. [9] также отмечается, что применение препарата наноSe активировало систему антиоксидантной защиты лабораторных мышей через повышение активностей каталазы на 15,2 и пероксидазы на 26,6 %.

Таблица 2. Влияние наноSe и селенита натрия на активность пероксидазы в каллусах *A. rugosa*

Среда культивирования	Листовой каллус		Стеблевой каллус	
	активность, у.е./ мг белка	%	активность, у.е./ мг белка	%
Среда МС (контроль)	23405,870 ±1234,574	100	11982,460 ±764,276	100
Среда МС с 10 мг/л наноSe	29151,110 ±2355,119	124,55	8978,786 ±335,355	74,93
Среда МС с 50 мг/л наноSe	27752,180 ±2717,647	118,57	9395,478 ±689,674	78,41
Среда МС с 10 мг/л селенита натрия	7409,591 ±619,240	31,66	3618,295 ±419,227	31,00
Среда МС 50 мг/л с селенита натрия	5226,586 ±549,151	22,33	2184,874 ±288,515	18,23

Se, накопленный каллусными клетками *A. rugosa*, стимулировал в них биосинтез белка. Как видно из таблицы 3, присутствие наноSe в культуральной среде в количестве 10 или 50 мг/л увеличило содержание белка в клетках листового каллуса на ~ 26 и 23%, а стеблевого — на ~ 33 и 43%, соответствен-

но. Селенит натрия, лучше поглощаемый клеточными культурами *A. rugosa*, в свою очередь сильнее индуцировал в них биосинтез белка, но, возможно, интенсивность данного процесса была чрезмерной, что могло явиться одной из причин гибели каллусных культур.

Таблица 3. Влияние наноSe и селенита натрия на содержание белка в каллусах *A. rugosa*

Среда культивирования	Листовой каллус		Стеблевой каллус	
	Содержание белка, мг/мл	%	Содержание белка, мг/мл	%
Среда МС (контроль)	1,057±0,119	100	1,520±0,088	100
Среда МС с 10 мг/л наноSe	1,339±0,144	126,68	2,027±0,035	133,36
Среда МС с 50 мг/л наноSe	1,302±0,073	123,18	2,167±0,029	142,57
Среда МС с 10 мг/л селенита натрия	1,696±0,146	160,45	2,784±0,146	183,16
Среда МС с 50 мг/л селенита натрия	1,324±0,091	125,26	1,666±0,049	109,61

Выводы

Таким образом, нами установлено, что каллусные клетки многоколосника морщинистого обладают выраженной металлофитной способностью по отношению к Se. При этом селенит натрия для клеток *A. rugosa* более биодоступен, чем наноSe, однако в высоких концентрациях он токсичен – приводит к гибели клеток.

Se, накапливаемый каллусными клетками *A. rugosa*, стимулирует в них биосинтез белка и модифицирует активность пероксидазы. Результаты предварительных экспериментов указывают, что на роль компонента БАД претендует исключительно наноSe как нетоксичный ни для животных, ни для растений препарат.

Литература

1. Громова О.А. Селен – впечатляющие итоги и перспективы применения // Трудный пациент. – 2007. – Т. 5, №14. – С. 25–30.
2. Макаревич И.А. Исследование йод-дефицитных состояний у подростков загрязненных районов Брестской области // BFRIR-PINSK.ORG: официальный сайт Брестского филиала РНИУП «Институт радиологии». – 2005–URL: <http://www.bfrir-pinsk.org/docs/article/2005/004bf05.pdf>. – дата обращения 27.02.2012.
3. Жамсаранова С.Д. Селенсодержащая кормовая добавка // Молочная промышленность. – 2008. – №7. – С. 23.
4. Муроx В.И., Коломиец Н.Д. и др. Обогащение хлеба и хлебобулочных изделий селеном: методические рекомендации. – Минск: Минздрав Республики Беларусь, 2001. – 20 с.
5. Kheyrandish P., Mohraz M., Farzambar B., Shah H.M.H., Madani H., Sadeghi B.B. et.al. Preclinical and phase 1 clinical safety of Setarud (IMOD TM), a novel immunomodulator // DARU. – 2009. – Vol. 17, №3. – P. 148–156.
6. Shirazi F.G., Raoufi A., Yousefi M., Asgarian-Omran H., Memarian A., Khoshnoodi J., Younesi V., Shokri F. In vitro immunoinhibitory effects of Setarud on human B lymphocyte // Journal of Medicinal Plants Research. – 2011. – Vol. 5, №11. – P. 2223–2231.
7. Голубкина Н.А., Папазян Т.Т. Селен в питании. Растения, животные, человек. – М.: Печатный город, 2006. – 254 с.
8. Zhang J.-S. Biological effects of nano red elemental selenium // BioFactors. – 2001. – Vol. 15. – P. 27–38.
9. Храпцов А.Г., Серов А.В., Тимченко В.П., Мирошниченко М.В. Новый биологически активный препарат на основе наночастиц селена // Вестник Северо-Кавказского государственного технического университета. – 2010. – №4. – С. 122–125.
10. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // Биохимические методы в физиологии растений: сб. ст. / Под ред. Ю.Г. Молотковского. – М., 1971. – С.113–119.
11. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. / под ред. Б.А. Рубина. – М.: Высш. школа, 1975. – 392 с.
12. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases // SUN.ARS-GRIN.GOV: U.S. Department of Agriculture's Agricultural Research Service. – URL: <http://sun.ars-grin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/plantdisp.xsql?taxon=931>. – Date of access: 16.06.2012.

KUZOVKOVA A.A.¹, MAZUR T.V.¹, AZIZBEKIAN S.G.², RESHETNIKOV V.N.¹

¹SSI «Central Botanical Gardens», NAS of Belarus

Belarus, 220012, Minsk, Surganov str., 2B, e-mail: fioraia@nm.ru

²SSI «Institute of Physical Organic Chemistry», NAS of Belarus

Belarus, 220012, Minsk, Surganov str., 13, e-mail: mechanochem@ifoch.bas-net.by

BIOLOGICAL EFFECTS OF SELENIUM NANOPARTICLES AND SODIUM SELENITE ON *AGASTACHE RUGOSA* CELLULAR CULTURES

Aims. Recently search of substances replacing toxic selenites is conducted. The Se nanoparticles and sodium selenite influence on physiological and biochemical parameters of *A. rugosa* callus tissues were investigated.

Methods. Accumulation of Se in callus tissues were measured by nuclear and issue spectrometry. Protein content and peroxidase activity were measured by specific spectrometric methods. **Results.** It was found that *A. rugosa* callus tissues possessed the expressed ability to Se accumulation. Sodium selenite was more bioavailable for *A. rugosa* cells than Se nanoparticles, however it was toxic in investigating concentration (10 and 50 mg/l) and caused callus death. Selenium in *A. rugosa* callus tissues stimulated biosynthesis of protein and modified peroxidase activity. **Conclusions.** Only Se nanoparticles as nontoxic neither for animals, nor for plants apply for a role of the dietary supplement component.

Key words: *Agastache rugosa* (Fisch. & C.A.Mey.) Kuntze, callus tissues, selenium nanoparticles, sodium selenite.

ЛЕМЕШ В.А.¹, ГУЗЕНКО Е.В.¹, САКОВИЧ В.И.¹, НИКОЛАЙЧИК Е.А.², ЕВТУШЕНКОВ А.Н.²

¹Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27; e-mail: e.guzenko@igc.bas-net.by

²Белорусский государственный университет

Минск, Беларусь

СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.), НЕСУЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ, МЕТОДАМИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Снижение засоренности посевов льна не может быть успешно решено без применения гербицидов. В республике Беларусь производится и используется для обработки посевов льна глифосатсодержащий гербицид «Белфосат». Данный препарат создан на основе системного гербицида сплошного действия – N-фосфометилглицина (C₃H₈NO₅P), эффективного против более 300 видов однолетних и многолетних однодольных и двудольных растений. Однако многократное опрыскивание растворами гербицидов негативно влияет на состояние посевов льна, а также приводит к накоплению остаточных количеств токсических веществ в семенах. Обеспечить эффективную и экономически выгодную защиту данной сельскохозяйственной культуры возможно с помощью технологий получения генетически модифицированных (ГМ) растений. Встраивание в геном организма хозяина генетических конструкций имеет целью получить новый признак, недостижимый для данного организма путем традиционной селекции.

К настоящему времени клонированы гены, кодирующие нечувствительные к действию гербицидов ферменты-мишени, что дало возможность получить трансгенные растения устойчивые к глифосату [1, 2, 3, 4], хлорсульфурновым и имидазолиновым гербицидам [5, 6]. Изолированы также гены, кодирующие ферменты деградации некоторых гербицидов, что способствовало созданию линий с устойчивостью к фосфинотрицину [7], 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) [8], далапону [9].

Несмотря на то, что лен был в числе первых растений – объектов генной инженерии, в мире не существует коммерческих ГМ линий льна. Возможно, это связано с относительно слабой генетической изученностью льна, с ограниченностью информации о закономерностях органогенеза данной культуры, анатомическими и физиологическими особенностями растений-регенерантов, а также низкой эффективностью применяемых методов трансформации и вводимых генетических конструкций.

Целью работы являлось создание транс-

генных растений льна, несущих специфические гены бактериального происхождения, которые обеспечивают устойчивость к гербициду глифосату, методом агробактериальной трансформации и модифицированным методом *in planta*.

В работе использованы бактериальные штаммы и плазмиды, основные характеристики которых представлены в таблице 1.

Культивирование микроорганизмов осу-

ществлялось на бактериальных питательных средах при температуре 37°C (*E. coli*) и 28°C (*D. dadantii*), для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) глифосата использовалась глюкозо-солевая среда с добавлением 0,5 ммоль/л ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактозид).

Коммерческие препараты антибиотиков использовались в необходимых концентрациях.

Таблица 1. Штаммы и плазмиды

Штаммы/ плазмиды	Генотип	Источник
Штаммы		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA 4404	(Ach5 pTiAch5) Sm/Sp ^R	коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rk-, mk+), <i>relA1, supE44, λ⁻, Δ(lac-proAB)</i> , [F', <i>traD36, proAB, lacI^fΔM15</i>]	Promega
<i>Escherichia coli</i> DH5a	F'φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁻) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1λ⁻</i>	коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Escherichia coli</i> ES1301 mutS	<i>lacZ53, mutS201::Tn5, thyA36, rha-5, metB1, deoC, IN(rrnD-rrnE)</i>	Promega
<i>Dickeya dadantii</i> ENA49	Природный изолят	коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
Плазмиды		
pBI121	[10]	коллекция кафедры молекулярной биологии
pAlter-1	oriV _{ColEI} , Tet ^R , <i>blaM*</i> , <i>lacZ</i> _□	Promega

Электротрансформация клеток, трансформация с помощью хлорида кальция, выделение плазмидной ДНК из клеток бактерий выполнялись в соответствии со стандартными протоколами [11]. В данной работе были использованы ферменты и буферные системы фирм Fermentas (Литва), и Roche (Германия). Рестрикция и лигирование проводилось согласно протоколам фирм производителей.

Аmplификацию ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции.

Для проведения секвенирующих реакций применяли набор реактивов CycleReaderTM Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas) и следовали протоколам производителя. Электрофорез и регистрацию продуктов реакции проводили в 0,5xTBE буфере при 1500 В, 60 мА, 55°C на ДНК-анализаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech) с соответствующим программным обеспечением. Анализ результатов

полученной нуклеотидной последовательности осуществлен пакетом программ ALFwin 2.1 (Amersham Pharmacia Biotech).

Для сайт-направленного мутагенеза использовали набор реактивов Altered Sites II (Promega) согласно протоколам производителя.

Исходным растительным материалом служили два сорта льна-долгунца Василек (Беларусь), Левит-1 (Беларусь) и сорт льна масличного Alaska (Франция). Протоколы проведения агробактериальной трансформации методом сокультивации и модифицированным методом *in planta* опубликованы нами ранее [4, 12].

Генетически измененные растения, устойчивые к гербицидам, являются одним из перспективных биотехнологических продуктов. Нами проводятся работы по созданию ГМ растений льна с устойчивостью к глифосату, мишенью действия которого является фермент EPSP (5-енолпирувилшикимат-3-фосфат синтаза). При

попадании глифосата в растения происходит блокировка синтеза ароматических соединений, включая аминокислоты, гормоны и витамины, что приводит к гибели растения. Введение в геном растения гена *aroA* снижает афинность EPSP к глифосату.

Анализ геномных последовательностей позволил разработать праймеры для амплификации гена *aroA* бактерий видов *D. dadantii* и *E. coli*. В праймеры были введены последовательности рестрикционных сайтов, необходимых для клонирования, и последовательности рибосом-связывающего сайта для обеспечения эффективной экспрессии в клетках бактерий [10].

В качестве матриц для амплификации гена *aroA* использовали хромосомную ДНК штаммов *D. dadantii* ENA49 и *E. coli* JM109. В результате ПЦР были получены целевые продукты размером около 1,3 т.п.н., что соответствовало прогнозируемому размеру. В качестве вектора для клонирования использовали вектор pAlter-1 (Promega). Амплифицированные фрагменты ДНК и молекулы вектора обрабатывали рестрицирующими эндонуклеазами *Pst*I и *Sac*I, затем фрагменты смешивали, лигировали, и получен-

T42M_coliCTATCCAGCAGATTTCATTAATACTGTTTT
P101S_coliGCCGCCAGCGAACGCATTGCC
P101S_dadGCGGCGGCCAGCGAGCGCATCGC

После мутагенеза рекомбинантные плазмиды были введены в клетки штамма *E. coli* JM109 путем электротрансформации. Отбор рекомбинантных клонов производился на минимальной глюкозо-солевой среде, содержащей глифосат в концентрации 2,5 ммоль/л и 0,5 ммоль/л ИПТГ в качестве индуктора. В результате были отобраны плазмиды с тремя типами замен: производные плазмиды pZH475 с заменой P101S и двойной заменой T42M и P101S, а также производные плазмиды pZH476 с одиночной заменой P101S. Первые две мутантные плазмиды получили обозначения соответственно pZH477 (замена P101S) и pZH478 (замены T42M и P101S), а третья – pZH479 (замена P101S). Аналогичным способом был проведен сайт направленный мутагенез, который позволил ввести еще одну мутацию T97I (треонин в положении 97 заменен на изолейцин) в ген *aroA* *D. dadantii* с уже имеющейся одиночной заменой P101S. Плазмида pAlter I, несущая ген *aroA* *D. dadantii* с двумя заменами P101S и T97I была обозначена pZH501. Эффективность мутантных вариантов генов *aroA* была проверена с помощью метода реплик на минимальной глюкозо-солевой среде с концентрациями глифосата 5, 10

ной смесью трансформировали бактерии *E. coli* JM109. Наличие искомой вставки в рекомбинантных плаزمидах было подтверждено рестрикционным анализом, а также функциональным тестом. При культивировании бактерий *E. coli*, несущих плазмиды с клонированными генами *aroA*, в условиях индукции ИПТГ, отмечено формирование изолированных колоний на минимальной среде с 1 ммоль/л глифосата. Сконструированные таким образом плазмиды получили обозначения pZH475 (с геном из *E. coli*) и pZH476 (с геном из *D. dadantii*).

Анализ литературных данных показал, что повысить устойчивость EPSP к глифосату могут одиночные замены пролина на серин в 101 положении (P101S), треонина на метионин в 42 позиции (T42M), а также глицина на аланин в 96 положении (G96A) и треонина на изолейцин в 42 позиции (T97I).

После определения полной нуклеотидной последовательности генов *aroA* бактерий *D. dadantii* ENA49 и *E. coli* JM109 нами проведен мутагенез. Для введения мутаций в клонированные гены использовали олигонуклеотиды:

и 20 ммоль/л. Этот подход позволил нам отобрать варианты генов *aroA*, наличие которых в бактериальных клетках повышает устойчивость их к глифосату (МИК глифосата в 40 раз выше по сравнению с неизмененными генами). Наиболее устойчивым оказался продукт гена *aroA* из *D. dadantii* с двумя заменами P101S и T97I (pZH501).

Для оценки эффективности работы данного мутантного гена в клетках растений нами был сконструирован бинарный вектор с экспрессионной кассетой 35S-СТР-*aroA*. Регенерация предположительно трансформированных побегов льна проходила через стадию формирования каллуса на гипокотильных эксплантах при культивировании на селективной среде. Наибольшее число первичных трансформантов получено у сорта льна масличного Alaska (Франция). Для подтверждения трансгенного статуса проводили комплексный ПЦР-скрининг, позволяющий исключить ложно положительные результаты. При тестировании анализируемых образцов ДНК первичных трансформантов на присутствие бактериальных генов обнаружено, что в четырех образцах присутствует бактериальная ДНК и амплификация последовательности 35S промо-

тора, *nptII* гена и *aroA* гена происходит с экспрессионного вектора, который встроен в плазмиду бактериальной клетки. Истинный трансгенный статус подтвержден у 4 растений, укорененных и высаженных в грунт «Биона» (Белреахим, РБ).

При использовании любых методов агробактериальной трансформации большое значение имеют температура, состав среды для инокуляции, концентрация бактериальных клеток, использование индукторов генов вирулентности, штамм агробактерии, тип векторной конструкции и генотип растения. Все эти ограничения делают проблему регенерации стабильных фертильных трансформантов наиболее острой. Технология трансформации клеток растения *in planta* позволяет преодолеть трудности и упростить дорогостоящую, трудозатратную, требующую специального оборудования стадию регенерации и укоренения трансгенных растений. Мы использовали наиболее эффективные (до 70%) модификации метода *in planta* для создания трансгенных растений льна [13, 14]. Стерильной иглой для инъекций накалывали гипокотиль или плюмулу ростка. Место укола обрабатывали агробактериальной суспензией. Инокулированные проростки высаживали в грунт. Эффективность трансформации по данным комплексного ПЦР-скрининга (амплификация последовательности фрагментов ДНК почвенной бактерии, целевого гена, 35S промотора и гена *nptII*) предположительно транс-

генных растений льна T0 составила 25%. Однако не следует исключать вероятность контаминации растительных тканей поколения T0 агробактериями и получение ложных положительных результатов ПЦР-анализа. По данным некоторых авторов передача T-ДНК в эндофитную микрофлору растения во время трансформации *in planta* и выращивание в почве без селективного давления может стать причиной получения ложных положительных результатов гибридизации по Саузерену в поколении T0 [15]. Следовательно, для корректной оценки эффективности данного метода необходимо получить и проанализировать семенное поколение. Наследование T-ДНК в поколениях T1 и T2 изучалось многими исследователями, использующими методы трансформации *in planta*, и в большинстве случаев показано менделевское наследование вставки [16, 17].

В результате наших исследований созданы оригинальные векторные конструкции, имеющие экспрессионную кассету 35S-СТР-*aroA*, и проведена агробактериальная трансформация льна методом со-культивации и модифицированным методом *in planta*. Получены первичные трансформанты льна, молекулярно-генетический анализ которых подтвердил трансгенный статус. Предложен модифицированный метод *in planta* для льна, который может стать альтернативой широко применяемым методам трансформации.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ.

Литература

1. Monsanto Company History / Monsanto Web Site [Electronic resource] – Mode of access: monsanto.com.
2. Comai L. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate // *Nature*. – 1985. – Vol. 317, №6039. – P. 741–744.
3. Ishida Y. High Efficiency Transformation of Maize (*Zea mays* L.) Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *Nature Biotechnol.* – 1996. – Vol. 14, №6. – P. 745–750.
4. Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Сакович В.И., Орловская О.А., Николайчик Е.А., Присяженко О.К., Евтушенков А.Н., Хотылева Л.В. Агробактериальная трансформация льна-долгунца генетической конструкцией с геном *aroA*, несущим устойчивость к гербициду глифосату // Доклады НАН Беларуси. – 2010. – Т. 54, №6. – С. 68 – 71.
5. Mazur B.J. Isolation and Characterization of Plant Genes Coding for Acetolactate Synthase, the Target Enzyme for two Classes of Herbicides // *Plant Physiol.* – 1987. – Vol. 85, №4. – P. 1110–1117.
6. Li Z. Sulfonylurea Herbicide Resistance Gene from *Arabidopsis thaliana* as a New Selectable Marker for Production of Fertile Transgenic Plants // *Plant Physiol.* – 1992. – Vol. 100, №2. – P. 662–668.
7. De Block M. Engineering Herbicide Resistance in Plants by Expression of a Detoxifying Enzyme // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6, №9. – P. 2513–2518.
8. Bayley C. Engineering 2,4 D Resistance into Cotton // *Theor. Appl. Genet.* – 1992. – Vol. 83, №5. – P. 645–649.
9. Buchaman-Wollaston V. Plant Selectable Marker Gene Based on the Detoxification of the Herbicide Dalapon // *Plant Cell. Rep.* – 1992. – Vol. 11, №12. – P. 627–632
10. Николайчик Е.А., Гуцинская Н.Н., Евтушенков А.Н. Конструирование вариантов бактериального гена *aroA* со сниженной чувствительностью к гербициду глафосату // Труды БГУ. Сб. науч. тр. – 2011. – Т. 6, ч. 1. – С. 174–180.
11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.:

Мир, 984. – 480 с.

12. Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Селезнева Ю.В., Евтушенков А.Н. Создание трансгенных растений льна (*Linum usitatissimum* L.) модифицированным методом *in planta* // IV Всероссийский симпозиум «ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ: технологии создания, биологические свойства, применение, биобезопасность», Москва, 19-23 ноября 2012 г. / Ин-т физиологии растений РАН. – Москва, 2012. – С. 33.
13. Suparthana P., Shimizu T., Nogawa M., Shioiri H., Nakajima T., Haramoto N., Nozue M., Kojima M. Development of simple and efficient *in planta* transformation method for wheat (*Triticum aestivum* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* // J. Biosci. Bioengi. – 2006. – Vol. 102, №3. – P. 162 – 170.
14. Kojima M., Arai Y., Iwase N., Shiratori K., Shioiri H., Nozue M. Development of simple and efficient method for transformation of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2000. – Vol. 64. – P. 845 – 847.
15. Langridge P., R.Brettschneide, P. Lazzeri, H. Lorz. Transformation of cereals via *Agrobacterium* and the pollen pathway: a critical assessment // The Plant J. – 1992. – Vol. 2. – P. 631-638.
16. Zale J.M., S. Agarwal, S. Loar, C.M. Steber. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Rep. – 2009. – Vol. 28. – P. 903-913.
17. Curtis I.S., H.G. Nam. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. longipinnatus Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency // Transgen. Res. – 2001. – Vol. 10. – P. 363-371.

**LEMESH V.A.¹, GUZENKO E.V.¹, SAKOVICH V.I.¹, NIKOLAICHUK Y.A.²,
EVTUSHENKOV A.N.²**

¹*Institute of Genetics and Cytology National Academy of Science of Belarus
Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str. 27; e-mail: e.guzenko@igc.bas-net.by*

²*Belarussian State University
Belarus, Minsk*

THE DEVELOPMENT OF GENETICALLY MODIFIED FLAX PLANTS (*Linum usitatissimum* L.) CARRYING THE BACTERIAL RESISTANCE GENE TO GLYPHOSATE BY *Agrobacterium*- MEDIATED TRANSFORMATION

Aims. Development of transgenic flax plants carrying bacterial specific genes that provide resistance to the herbicide glyphosate by *Agrobacterium*-mediated transformation and the modified method of *in planta*.

Methods. We cloned *aroA* genes from *E.coli* and *D.dadantii* and used site-directed mutagenesis to obtain altered genes with 40-fold lower sensitivity to glyphosate. The resistance gene was inserted into an *Agrobacterium* transformation vector (pBI121 35S-CTP-*aroA*) and used to transform flax. *Agrobacterium*-mediated co-cultivation technique and *in planta* was used to increase the transformation efficiency of flax.

Results. The resulting transgenic flax was shown to contain 35S promoter, *nptII* gene and glyphosate resistance gene. **Conclusions.** The results show that modified method of *in planta* can be used to produce transgenic flax plants. The system is rapid, simple and offers an alternative to *Agrobacterium*-mediated co-cultivation technique.

Key words: *Linum usitatissimum*, *Agrobacterium*-mediated transformation, *in planta*, gene *aroA*.

МАЙСТРЕНКО О.М.^{1,2}, ЛУЧАКІВСЬКА Ю.С.¹

¹*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного 148,*

²*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Україна, 01601, Київ, вул. Володимирська 64, e-mail: mayster37@yandex.ru*

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННОЇ КУЛЬТУРИ „БОРОДАТИХ” КОРЕНІВ ТОПІНАМБУРУ (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.), ЯКА МІСТИТЬ ГЕН ЛЮДСЬКОГО ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА-2b

Рекомбінантний лейкоцитарний людський інтерферон альфа-2b використовують в медицині для лікування гепатитів В і С, гострих

респіраторних вірусних захворювань, герпесвірусної інфекції та деяких типів раку завдяки його антивірусній та антипроліферуючій

активності [1]. Розробка методів отримання лейкоцитарного рекомбінантного інтерферону рослинного походження в препаративних кількостях уможливила б застосування в медицині препаратів зі зниженою собівартістю (у порівнянні з використанням інших систем гетерологічної експресії) та вищою безпечністю застосування [2].

Однією з найбільш вдалих з точки зору біотехнології рослинною системою є культура «бородатих» коренів, перевагами використання якої є швидкий ріст, довготривала генетична та синтетична стабільність [3], можливість синтезування тих же речовин, що і в коренях трансгенних рослин [4]. Культуру «бородатих» коренів пропонують використовувати для продукції рекомбінантних фармацевтичних білків [5, 6]. На сьогоднішній день показано можливість отримання моноклональних антитіл IgG₁ (до 1,8% СРБ) [7], анти-ВІЧ ціановіріну-N (до 0,64 мкг/мл середовища) [8], SEAP (secreted

alkaline phosphatase) [9, 10,11] з культури «бородатих» коренів тютюну *Nicotiana tabacum* L.

Топінамбур (*Helianthus tuberosus* L.) є стійкою до негативних біотичних чинників та невибагливою до фізико-хімічних факторів середовища рослиною, яка характеризується швидким приростом біомаси та накопиченням цінних речовин, що робить його перспективною культурою для сільського господарства [12], джерелом сировини для фармацевтичної [13] та харчової промисловості [14] та потенційною системою для гетерологічної експресії генів [12].

Метою даної роботи було отримати культуру „бородатих” коренів топінамбуру (*Helianthus tuberosus* L.), що містить ген людського інтерферону альфа-2b під контролем коренеспецифічного *Mll* промотору цукрового буряку [15] або під контролем конститутивного *35S* промотору ВМЦК.

Матеріали та методи

Рослинний матеріал. Для генетичної трансформації використовували листові експланти та фрагменти стебел асептичних рослин топінамбуру (*Helianthus tuberosus* L.). Рослини культивували на живильному середовищі MS [16] за температури 28°C, 16-годинному фотоперіоді.

Плазмідні векторні конструкції та бактеріальні штами. Плазмідні векторні конструкції pCB124 та pCB161 містили рекомбінантний ген людського інтерферону

альфа-2b (*HuINFa-2b*) злитий з рослинним (*Nicotiana plumbagenifolia* L.) кальретикуліновим апопластним сигналом таргетингу під контролем конститутивного *35S* промотору ВМЦК та коренеспецифічного *Mll* промотору цукрового буряку [17]. Обидві конструкції містили також селективний ген неоміцинфосфотрансферази (*nptII*) під контролем *nos* промотору. (Рис. 1) Для агробактеріальної трансформації застосовували агропіновий штам А4 *Agrobacterium rhizogenes*.

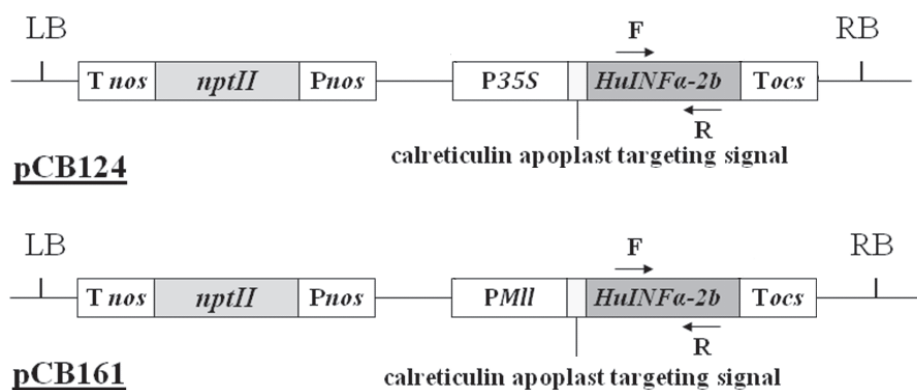


Рис. 1 Схеми векторних конструкцій pCB124 та pCB161, що несуть ген людського інтерферону альфа-2b [17]

Генетична трансформація та селекція. Генетичну трансформацію рослин топінамбуру з використанням агропінового штаму А4 *A. rhizogenes* проводили методом листових дисків. Суспензійну бактеріальну культуру ви-

рошували на орбітальному шейкері (200 об./хв.) за температури 28°C протягом 24 годин у рідкому живильному середовищі Лурія-Бертані (10г/л пептону, 5г/л дріжджового екстракту, 10г/л NaCl, рН=7.2) з додаванням 20 мг/л селек-

тивного антибіотику карбеніциліну. Отриману бактеріальну культуру осаджували центрифугуванням (5000 об./хв., 10 хв.). Осад ресуспендували в рідкому середовищі MS з додаванням 200 мкМ ацетосирингону та культивували на ротаційному шейкері (200 об./хв.) за температури 28°C протягом години. Листкові експланти та фрагменти стебел інкубували у бактеріальній суспензії протягом 20 хв. та надалі піддавали вакуумній інфільтрації. Для трансформації експланти викладали на безгормональне живильне середовище MS без додаванням антибіотиків на одну добу, культивували на розсіяному світлі при кімнатній температурі. Надалі експланти переносили на агаризоване живильне середовище MS з додаванням 500 мг/л антибіотику цефотаксиму для елімінації бактерій і 100мг/л селективного антибіотику канаміцинсульфату та культивували при температурі 24°C в умовах 16-годинного фотоперіоду з періодом субкультивування 2-4 тижні.

Молекулярно-біологічний аналіз. Сумарну рослину ДНК екстрагували згідно Doyle J.L. та Doyle J.J [18]. Присутність трансгенів підтверджували за допомогою дуплексного

Результати та обговорення

Ініціацію Ri-коренетворення після *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації листкових та стеблових експлантів асептичних рослин топінамбуру спостерігали через 2-3 тижні культивування на безгормональному живильному середовищі MS з додаванням антибіотиків цефотаксиму та канаміцинсульфату у вказаних концентраціях при 24°C в умовах 16-годинного фотоперіоду. Коренева культура характеризувалася Ri-фенотипом: гормон-незалежним ростом, формуючи надзвичайно розгалужені бічні корені, та відсутністю геотропізму (рис. 2, б). Контрольні нетрансформовані експланти були нездатні до формування культури Ri-коренів на середовищах з додаванням селективного антибіотику канаміцинсульфату у концентрації 100 мг/л. Частоту Ri-коренетворення визначали як відношення кількості точок ініціації коренетворення до загальної кількості інокульованих експлантів, за умови проведення трансформації з використанням плазмідних векторних конструкцій pCB124 та pCB161 вона становила 14,7±8,4% та 25,0±9,0% відповідно. ПЛР-аналіз дозволив виявити присутність агробактеріального *rolB* гену

ПЛР-аналізу з використанням праймерів 5'-ctctgcttgaaggacag-3', 5'-ggagtcctctctcatcag-3' для підтвердження присутності цільового *HuINFa-2b* гену (розмір фрагменту 264 п.н.) та праймерів 5'-atgtcgaaggcagtaagccca-3', 5'-ggagtccttccagcatggagca-3' для ідентифікації присутності *virD1* гену з метою виявлення агробактеріального забруднення (розмір фрагменту 432 п.н.). Ампліфікацію фрагментів генів людського інтерферону *HuINFa-2b* та *virD1* проводили 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. [19]. Для підтвердження трансгенної природи отриманої культури „бородатих” коренів ампліфікували фрагмент (780 п.н.) агробактеріального *rolB* гена, реакція проходила за наступних умов: денатурація 94°C/5 хв.; 34 цикли (денатурація 94°C/30 с, відпал 65°C/30 с, синтез 72°C/45 с); заключний синтез 72°C/5 хв. з використанням праймерів 5'-atggatcccaattgctattcctccacga-3', 5'-ttagctcttctcaggttactgcagc-3'. Продукти реакцій фракціонували в 1 % агарозному гелі в трисборатній буферній системі.

для 95–98% аналізованих ліній культури „бородатих” коренів, що підтверджує трансгенну природу отриманої кореневої культури (рис. 2, г).

Крім того, на селективному середовищі (MS (20 г/л сахарози) з додаванням 100 мг/л антибіотику канаміцинсульфату) спостерігали індукцію калусогенезу на листових та стеблових експлантах рослин топінамбуру трансформованих з використанням А4 штаму *A. rhizogenes*, векторних конструкцій pCB124 та pCB161, при чому частота калусотворення становила 13,2±9,1% та 16,7±10,5 відповідно (рис 2а). ПЛР-аналіз дозволив підтвердити присутність цільового гену *HuINFa-2b* для близько 85% досліджуваних зразків калусних культур та культури „бородатих” коренів топінамбуру, а також відсутність агробактеріального забруднення для 62% з них (рис. 2, в).

На отриманих Ri-культурах та трансгенних калусних культурах топінамбуру не спостерігали спонтанної регенерації рослин, навіть незважаючи на відмічену активну регенерацію рослин на культурі нетрансгенних коренів та ініційованих калусних культурах топінамбуру [20].

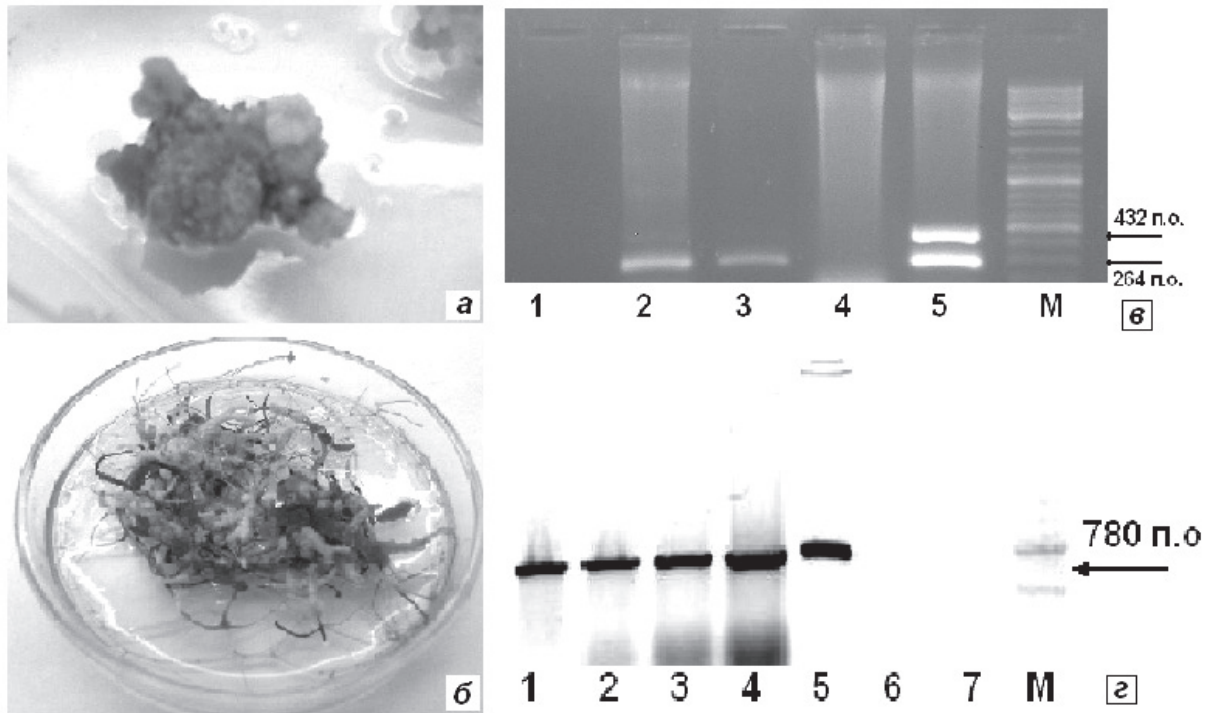


Рис. 2. Калусогенез на стеблових експлантах рослин топінамбуру (а) та культура „бородатих” коренів топінамбуру (б) на живильному середовищі з додаванням селективного антибіотику. ПЛР-аналіз зразків культури „бородатих” коренів топінамбуру: в – дуплекс на присутність *HuINFα-2b* та *virD1* генів (М – ДНК маркер (1 Kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 1 – негативний контроль (проба без ДНК) 2,3 - ДНК аналізованих зразків, 4 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини), 5– позитивний контроль (сумарна ДНК *A.rhizogenes*, pCB124), г – на присутність *rolB* гену (М – Маркер (1 kb Plus DNA Ladder, Fermentas), 1-4 – ДНК аналізованих зразків культури „бородатих” коренів топінамбуру, 5– позитивний контроль (плазмідна ДНК (A4)), 6 – негативний контроль (ДНК нетрансформованої рослини), 7 – негативний контроль (проба без ДНК)

Висновки

Показано можливість отримання культури «бородатих коренів» та трансгенної калусної культури *H. tuberosus*, що містять ген лейкоци-

тарного людського інтерферону альфа-2b шляхом *A. rhizogenes*-опосередкованої трансформації.

Література

1. Ariyasu T., Tanaka T., Fujioka N. Effects of interferon-alpha subtypes on the Th1/Th2 balance in peripheral blood mononuclear cells from patients with hepatitis virus infection-associated liver disorders // *In Vitro Cell Dev. Biol. Animal.* – 2005. – Vol. 41 – P. 50-56.
2. Desai P. N., Shrivastava N., Padh H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression // *Biotech. Adv.* – 2010. – Vol. 28, №4. – P. 427–435.
3. Huang L.-F. Liu Y.-K., Lu C.A. et al. Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter and rice cell culture // *Transgenic. Res.* – 2000. – Vol. 14, №5. – P. 569-581.
4. Sivakumar G. Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceutical from plant roots // *J. Biotechnol.* – 2006. – №1. – P. 1419-1427.
5. Choi Y.E., Kim Y.S., Paek K.Y. Types and designs of bioreactors for hairy root culture // *Plant Tissue Culture Engineering.* – 2006. – №6. – P. 161-72.
6. Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati P.K. et al. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects // *Curr. Opinion in Plant. Biol.* – 2006. – №9. – P. 341–346.
7. Drake P.M.W., Chargelegue D.M., Vine N.D. et al. Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 52, №1. – P. 233-241.

8. Wongsamuth R., Doran P.M. Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots // *Biotechnol. Bioeng.* – 2000. – №54. – P. 401-415.
9. Ma J.K., Drake P.M., Chargelegue D. et al. Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production // *Vaccine.* – 2005. – Vol. 23, №15. – P. 1814-1818.
10. Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Logendra S. et al. Production of recombinant proteins in plant root exudates // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – №17. – P. 466-469.
11. Gaume A., Komarnytsky S., Borisjuk N. et al. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots // *Plant Cell Rep.* – 2009. – Vol. 21, №12. – P. 1188-1193.
12. Kays S.J., Nottingham S.F., *Biology and chemistry of the Jerusalem Artichoke.* – Boca Raton, USA: CRC Press, 2008. – P. 97-116, 160-164.
13. 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.
14. Кищенко Е.М. Особенности экспрессии репортерного гена β -глюкуронидазы под контролем 35S и MII промоторов в трансгенных растениях // Фактори експериментальної еволюції організму в: Зб. наук. пр. – 2010. – Т. 9. – С. 261-266.
15. Roberfroid, M. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. In: *CRC Series in Modern Nutrition.* CRC Press, Boca Raton, FL. – P. 2493-2502.
16. 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.
17. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasimenko I., Olevinskaya Z., Simonenko Yu., Spivak M., Kuchuk M. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // *Plant Cell Reports.* – 2010. – Vol. 30, №3. – P. 407-415.
18. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // *Focus.* – 1990. – №12. – P.13-15.
19. Gerasymenko I. M., Sakhno L. O., Mazur M. G., Sheludko Y. V. Multiplex PCR Assay for Detection of Human Interferon Alpha-2b Gene in Transgenic Plants // *Cytology and Genetics.* – 2012. – Vol. 46, №4. – P. 197-201.
20. Майстренко О.М., Лучаківська Ю.С., Матвеева Н.А. Накопичення поліфруктанів суспензійними та калусними клітинними культурами, культурою «бородатих» коренів та органами рослин топінамбуру (*Helianthus tuberosus* L.) // Збірник наукових праць ІХ з'їзду УТГіС “Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології” – 2012. – С. 566-570.

MAISTRENKO O.M.^{1,2}, LUCHAKIVSKA YU.S.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, NASU*

Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho St.148

²*National Taras Shevchenko University of Kyiv*

Ukraine, 01601, Kyiv, Volodymyska st. 64, e-mail: mayster37@yandex.ru

OBTAINING THE TRANSGENIC HAIRY ROOT CULTURE OF TOPINAMBOUR (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) CONTAINING HUMAN INTERFERON ALPHA-2B GENE

The aim of the study was to obtain *Helianthus tuberosus* L. hairy root culture containing human interferon alpha gene driven by constitutive 35S CaMV and root specific *MII* sugar beet promoters by means of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. **Results.** We observed the high level callus and *Ri*-roots induction on *A. rhizogenes*-inoculated leaf and stem explants on the selective medium in 2-3 week cultivation. PCR proved the presence of human interferon alpha gene for the studied samples as well as it showed the obtained hairy root culture of the transgenic origin. **Conclusions.** Thus we manage to obtain the transgenic *H. tuberosus* hairy root culture containing human interferon alpha gene.

Key words: *Helianthus tuberosus* L., human interferon alpha-2b, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation, tissue-specific promoters, hairy root and transgenic callus culture.

МАМЕДОВА А.Д.

Институт Генетических ресурсов НАН Азербайджана

Азербайджан, AZ 1106, Баку, пр. Азадлыг, 155, e-mail: afet.m@mail.ru

ИНТЕНСИВНОСТЬ СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ОРГАНЕЛЛАХ РАСТЕНИЙ ПРИ ГЕТЕРОЗИСЕ И СТИМУЛЯЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ДЕЙСТВИЕМ ГИДРАЗИД МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Гетерозис или гибридная сила – давно известное и широко распространенное общебиологическое явление, которое чаще всего проявляется в изменении интенсивности уже имеющих у родителей отдельных признаков: высоты растений, веса корней, поверхности листьев и т.д., иногда в развитии комплекса признаков, и обычно не сопровождается проявлением какого-либо нового признака или качества. Меристематическая ткань гетерозисных гибридов обладает способностью к активному делению, что обеспечивает более сильное вегетативное развитие гибридных растений. Гетерозис представляет собой явление количественного порядка и напоминает эффект стимуляции, который возникает под влиянием действия различных факторов. Литературные данные [3] и наши исследования [4] свидетельствуют о том, что действие на растения гидразид малеиновой кислоты (ГМК) при концентрации 0,001% приводит к стимуляции биологических процессов. Стимуляторы оказывают влияние на синтез химических компонен-

Материал и методы

В первой серии исследований было изучено содержание нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах гетерозисных гибридов пшеницы (Лютесценс ФРГ х Бирлик, Бирлик х Лютесценс ФРГ, Лютесценс ФРГ х Лютесценс КСИ, Лютесценс КСИ х Лютесценс ФРГ, Бирлик х Безостая 1, Безостая 1 х Бирлик, *T.durum leucomelan* х Джафари, *T.durum erythromelan* х *T.durum melanopus*) и их родительских сортов. Во вторую серию исследований по изучению действия стимулирующей дозы ГМК (концентрация 0,001%) на синтез нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах были вовлечены рожь и пшеница (Н-2).

Выделение митохондрий из листьев осуществляли методом дифференциального центрифугирования на холоду при +4°C в среде, содержащей сахарозу 0,5 М; ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты) 0,005 М; калий фосфатный буфер 1/15 М, рН 7,4. Количество среды и материала брали в отношении 5:1. Гомогенат отжимали через двойной слой полотна и центрифугировали 15 мин при 3000g для уда-

тов клетки, деление и дифференцировку клеток, морфогенез.

Известно, что генетический материал эукариотных организмов сосредоточен не только в ядре, которое служит главным хранителем наследственной информации, но и диспергирован по всей клетке в субклеточных структурах.

Так как цитоплазматические генетические факторы играют чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности клетки, контролируя формирование и функционирование энергообеспечивающих структур клетки, определяя адаптивные свойства организма к изменяющимся условиям среды и по принципу обратной связи регулируют деятельность ядерных генов и реализацию наследственной программы в процессе индивидуального развития, нам представлялось интересным изучить при гетерозисе и стимуляции ростовых веществ активность синтеза нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах, являющихся основными поставщиками энергии клетки.

ления ядер, пластид, клеточных оболочек и других фрагментов. Супернатант для осаждения митохондрий центрифугировали 20 мин при 8000-9000g. 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. Чистоту выделенных митохондрий определяли энзиматически [1].

Хлоропласты выделяли в среде, содержащей 0,4 М сахарозы; 0,05 М Трис-НСI буфер (рН 7,4); 0,01 М NaCl и 0,03 М MgCl₂. Гомогенат отжимали через двойной слой полотна и центрифугировали 5 мин при 200g для удаления ядер, разрушенных клеточных оболочек и других фрагментов. Супернатант для осаждения хлоропластов центрифугировали 15 мин при 1500g. Надосадочную жидкость удаляли, осадок дважды ресуспензировали в той же среде и снова центрифугировали при указанных выше оборотах. Чистоту выделенных хлоропластов контролировали под световым микроскопом.

Выделенные хлоропласты и митохондрии

обрабатывались этиловым спиртом для получения бесцветного фильтрата, а затем промывали холодной дистиллированной водой, 0,2 н хлорной кислотой, снова дистиллированной водой, еще раз этиловым спиртом, смесью этилового

спирта и серного эфира (1:1) и эфиром.

Содержание нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах определяли методом спектрофотометрии по Шмидту-Тангаузеру в модификации Конарева [2].

Результаты и обсуждение

Как показали результаты исследований, гетерозисные гибриды пшеницы по содержанию митохондриальной РНК превосходили свои родительские сорта. Так, например, Лютесценс ФРГ х Бирлик на 87%, Бирлик х Лютесценс ФРГ на 55%, Лютесценс КСИ х Лютесценс ФРГ на 31% по этому параметру превосходили средний показатель родителей. Такое же резкое отличие между гибридами (Лютесценс ФРГ х Бирлик, Бирлик х Лютесценс ФРГ, Лютесценс ФРГ х Лютесценс КСИ, Бирлик х Безостая 1 и др.) и родительскими формами наблюдалось и по содержанию митохондриальной ДНК (рис. 1). Ис-

ключение составил лишь гибрид Безостая 1 х Бирлик, который занимает по этому показателю среднее положение в сравнении с исходными формами. Однако транскрипционная активность ДНК у этого гибрида составила 2,1 против 1,8 и 1,3 по сравнению с родительскими формами, соответственно. Активация синтеза нуклеиновых кислот митохондрий свидетельствует о том, что энергообеспечение за счет митохондриальной системы у гетерозисных гибридов пшеницы более высокое по сравнению с родительскими сортами.

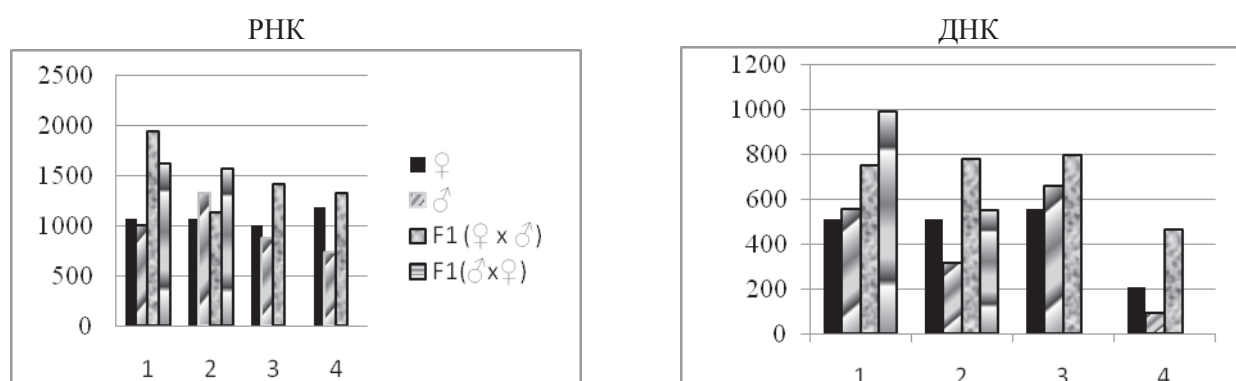


Рис. 1. Динамика изменения содержания нуклеиновых кислот в митохондриях гетерозисных гибридов пшеницы в сравнении с родительскими формами:

1. Лютесценс ФРГ х Бирлик; Бирлик х Лютесценс ФРГ; 2. Лютесценс ФРГ х Лютесценс КСИ; Лютесценс КСИ х Лютесценс ФРГ; 3. Бирлик х Безостая 1; 4. *T. durum leucomelan* (Иран) х Джафари

Изучение содержание хлоропластной РНК не выявило определенной закономерности. Гибриды либо характеризовались активацией синтеза РНК (Лютесценс ФРГ х Бирлик, Лютесценс ФРГ х Лютесценс КСИ), либо занимали среднее положение (Бирлик х Лютесценс ФРГ, Лютесценс КСИ х Лютесценс ФРГ, *T. durum leucomelan* (Иран) х Джафари, *T. durum erythromelan* х *T. durum melanopus*), либо уступали (Безостая 1 х Бирлик) родительским сортам по этому показателю (рис. 2).

Характерно, что все гибридные комбинации превышали своих родителей по содержанию хлоропластной ДНК: Лютесценс ФРГ х Бирлик на 45%, Бирлик х Лютесценс ФРГ на 29%, Бир-

лик х Лютесценс ФРГ на 42 %. Такое же резкое отличие между гибридами и родительскими формами наблюдалось и по содержанию хлоропластной ДНК у гибридных комбинаций Лютесценс ФРГ х Лютесценс КСИ, *T. durum leucomelan* (Иран) х Джафари и др.

Во второй серии исследований нами проводилось изучение изменения синтеза нуклеиновых кислот в цитоплазматических органеллах при воздействии на растения стимулирующей дозы ГМК. Исследование интенсивности синтеза относительного содержания нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах ДНК у растений ржи и пшеницы представлены в таблице.

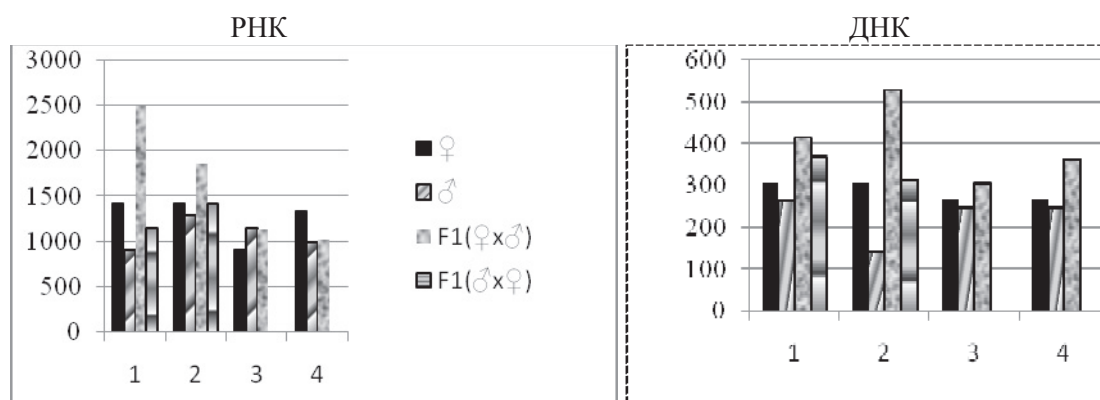


Рис. 2. Динамика изменения содержания нуклеиновых кислот в хлоропластах гетерозисных гибридов пшеницы в сравнении с родительскими формами:

1. Лютеценс ФРГ х Бирлик; Бирлик х Лютеценс ФРГ; 2. Лютеценс ФРГ х Лютеценс КСИ; Лютеценс КСИ х Лютеценс ФРГ; 3. Бирлик х Безостая 1; 4. *T.durum leucomelan* (Иран) х Джафари

Таблица. Изменение синтеза нуклеиновых кислот в митохондриях и хлоропластах ржи и пшеницы (мг% на сухое вещество цитоплазматических органелл) под влиянием стимулирующей дозы ГМК

	митохондрии			хлоропласты		
	РНК	ДНК	РНК/ДНК	РНК	ДНК	РНК/ДНК
			рожь			
контроль	971,52±33,1	273,45±7,4	3,55	2111,39±86,0	151,16±3,84	13,97
опыт	2113,6±65,4	578,2±9,8	3,65	1947,9±69,0	394,91±18,41	4,93
			пшеница			
контроль	1251,76±6,4	188,14±7,8	6,65	1914,14±82,8	643,09±7,82	2,98
опыт	2056,2±13,8	526,7±16,0	3,90	1925,40±6,6	370,18±6,65	5,20

Изучение генетического материала цитоплазматических органелл показало, что у проростков ржи и пшеницы процесс активации ростовых процессов при воздействии на растения стимулирующей дозой ГМК сопровождается активацией синтеза нуклеиновых кислот в митохондриях. Через 24 часа после воздействия ГМК содержание РНК в митохондриях проростков увеличивается по сравнению с контрольными растениями: у ржи в 2,2 раза, у пшеницы в 1,6 раза. Отмечается усиление биосинтеза и митохондриальной ДНК. По содержанию ДНК в митохондриях опытные растения ржи превышают контрольные в 2,1 раз, пшеницы в 2,8 раз.

Что касается хлоропластной генетической системы, то у пшеницы увеличение синтеза РНК при воздействии ростового вещества незначительно по сравнению с контрольными растениями. Увеличение содержания хлоропластной РНК у пшеницы составило 11,26 мг%. У ржи этот показатель у опытного растения в сравнении с контролем снижается. Так, количество РНК в

этих органеллах у контрольных растений ржи составило 2111,39 мг%, у опытных растений – 1947,9 мг%. В то же время, если у опытных растений ржи содержание хлоропластной ДНК увеличилось по сравнению с контрольными растениями, но это не наблюдалось у растений пшеницы. Содержание хлоропластной ДНК под влиянием ГМК падает в 1,7 раз. Это свидетельствует о том, что в этом случае в общую энергообеспеченность клетки преимущественно вносит митохондриальная генетическая система.

Если депрессия роста при инбридинге напоминает ингибирование ростовых процессов, то гибридная мощь при гетерозисе – стимуляцию ростовых процессов, возникающих под влиянием различных факторов внешней среды. В наших исследованиях гетерозис и стимуляция ростовых процессов, вызываемых действием гидразид малеиновой кислоты, сопровождается интенсификацией работы генетического аппарата митохондрий.

Литература

1. Кинцурашвили Д.Ф., Пруидзе Г.Н., Дурмишидзе С.В. Внутриклеточная локализация цитохромоксидазы и пероксидазы в листьях виноградной лозы // Изв. АН Груз. ССР. Сер. Б. – 1980. – Т. 6, №11. – С. 45-56.
2. Конарев В.Г., Тютюрев С.Л. Методы биохимии и цитохимии нуклеиновых кислот растений // Научные труды ВИР. – Л: Колос, 1970. – 202 с.
3. Ракитин Ю.В. Гидразид малеиновой кислоты как регулятор роста растений // М.: Наука, 1973. – 367 с.
4. Mammadova A.D. Nuclear-mitochondrial interaction of cells genetic systems, under the stimulation of the growth processes by maleic acid hydrazide // Scientific enquiry in the contemporary world: theoretical basics and innovative approach», Research articles, Publishing Titusville, FL, USA. 2012. – P. 99-100.

MAMMADOVA A.D.

Genetic Resources Institute of the Azerbaijan National Academy of Sciences
Azerbaijan, AZ 1106, Baku, Azadlig Avenue, 155, e-mail: afet.m@mail.

INTENSITY OF SYNTHESIS OF THE NUCLEIC ACIDS IN THE CYTOPLASMIC ORGANELLES OF PLANTS IN HETEROSIS AND STIMULATION OF THE GROWTH PROCESSES BY THE INFLUENCE OF MALEIC HYDRAZIDE

Aims. The study of changes in the content of nucleic acids in the mitochondria and chloroplasts of heterotic plants and stimulation of growth processes by the influence of maleic hydrazide. **Methods.** Mitochondria and chloroplasts were isolated by the differential centrifugation. Nucleic acids content in the mitochondria and chloroplasts were determined by the method described in the works of V.G. Konareva and S.L. Tyutereva (1970). **Results.** High content of mitochondrial RNA and DNA, as well as DNA of chloroplasts was observed in the wheat hybrids in comparison with their parental species. Activation of growth processes under the concentration of maleic hydrazide was accompanied by the activation of RNA and DNA in mitochondria of rye and wheat. **Conclusions.** Heterosis and stimulation of growth processes by the maleic hydrazide are accompanied by the intensification of the genetic apparatus of mitochondria.

Key words: Heterosis, stimulation of growth processes, maleic acid hydrazide, cytoplasmic organelles, nucleic acids.

МАРКОВСЬКИЙ О.В., БАННИКОВА М.О., МОРГУН Б.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

ВИЯВЛЕННЯ *сru* ГЕНІВ, ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ СТІЙКІСТЬ ДО КОМАХ, ЗА ДОПОМОГОЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У ТРАНСГЕННОЇ КУКУРУДЗИ

Для швидкої та надійної детекції досліджуваних генів, які детермінують стійкість до комах (*сru* гени) було розроблено і оптимізовано методику проведення мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (мПЛР). Ця технологія дозволяє проводити ампліфікацію в одній реакції декількох досліджуваних ділянок ДНК характерної довжини [1]. Розроблена методика передбачає використання двох (або більше) пар

олігонуклеотидних праймерів, специфічних до трансформаційних подій та однієї пари праймерів, специфічної до референтного гену кукурудзи – *zein* [1] або *adh1*. мПЛР було розроблено для проведення масового аналізу експериментальних зразків кукурудзи, зменшуючи затрати часу та реактивів. Досліджувані нами *сru* гени входять до складу трансформаційних подій кукурудзи (табл. 1).

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. У роботі досліджували експериментальні селекційні зразки кукурудзи НВФГ компанії «Маїс» та референтні зразки, які містили відповідні трансформаційні події.

Виділення та очищення ДНК. Загальну ДНК виділяли з паростків кукурудзи. Виділення та очищення ДНК проводилось ЦТАБ методом за [2-4]. Для перевірки наявності та якості загальної рослинної ДНК після процедури

виділення застосовувався метод електрофорезу нуклеїнових кислот в агарозному гелі [2]. Далі проводили спектрофотометричне вимірювання концентрації ДНК та стандартизацію зразків (30 нг/мкл).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за [1].

Електрофорез продуктів ампліфікації.

Електрофорез 12 мкл кожного зразка після мПЛР проводили в агарозному гелі (1,2%). В якості маркера використовували 400 нг маркера молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix. Умови проведення електрофорезу для всіх трансформаційних подій: напруга – 3,5 В/см; тривалість – 1,5 години.

Таблиця 1. Перелік праймерів, температур їх плавлення та температур віджигу

Ген	Трансформаційна подія	Праймер	T _m , °C	Температура віджигу, °C	Розмір амплікону	Специфічність
<i>adh1</i>		Adh-F3	66	55	231	До гену
		Adh-R1	60			
<i>cryIA(b)</i>	Bt176	PEPC-C-20	60	56	186	До К
		CRY04	63			
	MON810	mg1	66	59	401	До К
		mg2	64			
		VM01	65	59	170	До ТП
		VM03	64			
<i>cryIF</i>	DAS1507	TC1507 01-5	61	56	103	До К
		TC1507 01-3	61			
		TC1507-1F	58	52	279	До ТП
		TC1507-2R	57			
<i>cry34Ab1</i> <i>cry35Ab1</i>	DAS59122	59F1	67	60	148	До К
		59R1	65			
		SEQ ID NO 9	69	57	313	До гену
		SEQ ID NO 10	63			
<i>cry3Bb1</i>	MON88017	M7F8	67	60	313	До гену
		M7R8	65			
		MON88017-mF	58	53	150	До ТП
		MON88017-mR	61			
<i>mcry3A</i>	MIR604	M6F1	67	62	268	До гену
		M6R1	67			
		E-604-F	60	55	133	До ТП
		E-604-R	65			

Примітки: T_m – температура плавлення; «До ТП» – до трансформаційної події; «До К» – до генетичної конструкції, якою було здійснено генетичну трансформацію кукурудзи.

Результати та обговорення

На відміну від більшості лабораторій, при аналізі зразків на наявність трансгенів детектували не наявність 35S промотора або NOS термінатора, а наявність послідовності самих генів. Тому був проведений добір та дизайн специфічних праймерів конкретно для кожного гена/трансформаційної події (таблиці 1, 2) [5, 6]. Для скорочення часу проведення ПЛР реакцій була розроблена мультиплексна ПЛР – одночасно визначали наявність декількох генетичних послідовностей.

Для виявлення трансформаційних подій готували реакційні суміші об'ємом 20 мкл, до

складу яких входи 1 × DreamTaq™ Green буфер (Thermo Scientific), 200 мкМ дНТФ, 0,5 одиниці DreamTaq™ полімерази, 30 нг зразку рослинної ДНК та праймери до референтного гену (*adh1*) і відповідної трансформаційної події (таблиця 2):

– для **Bt176** (ген *cryIA(b)/int.9* PEPC) 0,35 мкМ праймеру PEPC-C-20, 0,35 мкМ праймеру CRY04, 0,2 мкМ праймеру ADH F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1;

– для MON810 (ген *cryIA(b)* з інтроном *int.hsp70*) 0,45 мкМ праймеру mg1, 0,45 мкМ праймеру mg2, 0,25 мкМ праймеру VM01, 0,25 мкМ праймеру VM03, 0,2 мкМ праймеру ADH

F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1;
 – для **MON88017** (ген *cry3Bb1*) 0,45 мкМ праймеру M7F8, 0,45 мкМ праймеру M7R8, 0,45 мкМ праймеру MON88017-mF, 0,45 мкМ праймеру MON88017-mR, 0,2 мкМ праймеру ADH F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1;
 – для **DAS1507** (ген *cry1F*) 0,5 мкМ праймеру TC1507 01-5, 0,5 мкМ праймеру TC1507 01-3, 0,5 мкМ праймеру TC1507-1F, 0,5 мкМ праймеру TC1507-2R, 0,15 мкМ праймеру ADH F3, 0,15 мкМ праймеру ADH R1;
 – для **DAS59122** (гени *cry34Ab1*, *cry35Ab1*) 0,45 мкМ праймеру 59F1, 0,45 мкМ праймеру 59R1, 0,45 мкМ праймеру SEQ ID NO 9, 0,45 мкМ праймеру SEQ ID NO 10, 0,2 мкМ праймеру ADH F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1;
 – для **MIR604** (ген *mtcry3A*) 0,35 мкМ праймеру M6F1 01-5, 0,35 мкМ праймеру M6R1

01-3, 0,5 мкМ праймеру E-604-F, 0,5 мкМ праймеру E-604-R, 0,2 мкМ праймеру ADH F3, 0,2 мкМ праймеру ADH R1.

У всіх випадках негативним контролем слугувала реакційна суміш з 1 мкл ТЕ буфера рН 8,0 замість зразку ДНК.

Методика мПЛР на наявність трансформаційних подій Bt176, MON810, MON88017, DAS1507, MIR604, DAS59122 була наступною: денатурація рослинної ДНК – 4 хв при 94 °С; проводили 35 циклів, кожен з яких включає денатурацію ДНК – 30 сек при 94 °С. Час і температуру ренатурації ДНК з олігонуклеотидними праймерами та синтезу фрагментів цільових генів для кожної трансформаційної події підбирали індивідуально:

Таблиця 2. Нуклеотидні послідовності праймерів

Трансформаційна подія	Назва праймеру	Нуклеотидна послідовність праймеру
Референтний ген <i>adh1</i>	Adh-F3	CGTCGTTTCCCATCTCTTCCTCC
	Adh-R1	GACAGAGGAGAAACAAGGCG
Bt176	PEPC-C-20	ATC TCG CTT CCG TGC TTA GC
	CRY04	GGT CAG GCT CAG GCT GAT GT
MON810	mg1	TATCTCCACTGACGTAAGGGATGAC
	mg2	TGCCCTATAACACCAACATGTGCTT
	VM01	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG
	VM03	TCCATCTTTGGGACCACTGTCTG
MON88017	M7F8	CGCCAAGTCCAAGGCCCTGG
	M7R8	CGCCAAGTCCAAGGCCCTGG
	MON88017-mF	ATCGTGTGACAACGCTAGCA
	MON88017-mR	CATATTGACCATCATACTCATTGCT
DAS1507	TC1507 01-5	GCTTCAACAGGGCTGAGTTTG
	TC1507 01-3	CCCCACACAGTTTGGGATCTA
	TC1507-1F	CTTGTGGTGTTTGTGGCTCT
	TC1507-2R	TGGCTCCTCCTTCGTATGT
DAS59122	59F1	GCACCTCCCCGACCAACGTG
	59R1	CCGGCGAACGGGTTGTGCGAA
	SEQ ID NO 9	CTCCTTCAACGTTGCGGTTCTGTGTCAG
	SEQ ID NO 10	TTTTGCAAAGCGAACGATTCAGATG
MIR604	M6F1	CGCCATCAGCGGCTACGAGG
	M6R1	GGTCATCTCGCGGCGGTAGC
	E-604-F	TGGACGCCAGATCACACATG
	E-604-R	GGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCT

Bt176 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 56 °С, синтез фрагментів цільових генів – 18 сек при 72 °С.

MON810 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 59 °С, синтез фрагментів цільових генів – 27 сек при 72 °С.

MON88017 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 53 °С, синтез фрагментів цільових генів – 22 сек при 72 °С.

DAS1507 – ренатурацію ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 52 °С, синтез фрагментів цільових генів – 20 сек при 72 °С.

DAS59122 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 57 °С, синтез фрагментів цільових генів – 22 сек при 72 °С.

MIR604 – ренатурація ДНК з олігонуклеотидними праймерами – 30 сек при 55 °С, синтез фрагментів цільових генів – 19 сек при 72 °С.

Кінцевий синтез фрагментів цільових генів у всіх реакціях проводили 10 хв при 72 °С.

Продукти мПЛР являли собою фрагмен-

ти референтного гену кукурудзи *adh1* розміром 231 п.о. та цільові фрагменти ДНК *cry* генів/трансформаційних подій/генетичних конструкцій, які мають характерну довжину (табл. 1, рис.).

«ДЗ» – досліджуваний зразок, «РЗ» – референтний зразок, «К-» – негативний контроль – реакційна суміш з 1 мкл ТЕ буфера рН 8,0 замість зразку ДНК, «М» – маркер молекулярної маси O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

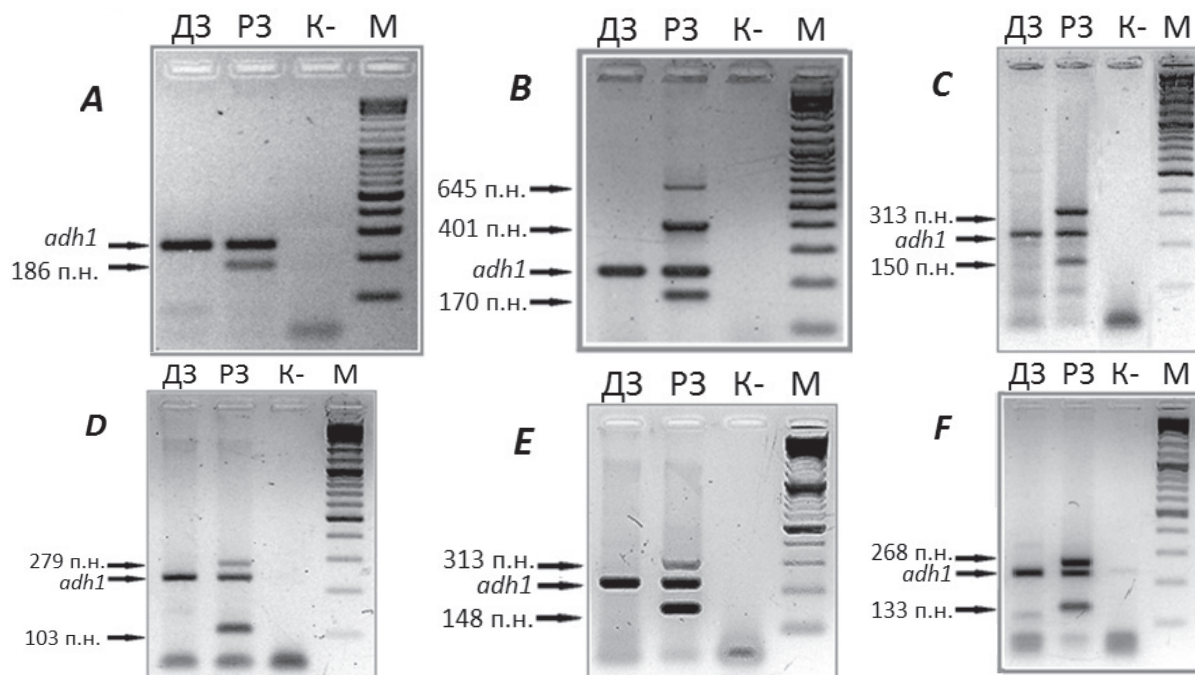


Рис. Електрофореграми продуктів ампліфікації

А. Трансформаційна подія ВТ176. Фрагмент ДНК розміром 186 п.о. складається з фрагменту РЕРС-промотору та фрагменту гену *cryIA(b)* генетичної конструкції, якою проводилась трансформація

В. Трансформаційна подія MON810. Фрагмент ДНК розміром 170 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація; фрагмент ДНК генетичної конструкції розміром 401 п.о.; фрагмент довжиною 645 п.о., утворений в результаті синтезу ділянки, яка обмежена праймерами з різних пар (VM01 та mg2), що додатково свідчить про наявність трансформаційної події MON810 у зразку ДНК

С. Трансформаційна подія MON88017. Фрагмент ДНК розміром 150 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація; фрагмент кодуючої

послідовності гену *cry3Bb1* розміром 313 п.о.

Д. Трансформаційна подія DAS1507. Фрагмент ДНК розміром 279 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація; фрагмент ДНК генетичної конструкції розміром 103 п.о.

Е. Трансформаційна подія DAS59122. Фрагмент ДНК розміром 148 п.о. складається з фрагменту гену *cry34Ab1*; фрагмент ДНК розміром 313 п.о. складається з 5'-фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація

Ф. Трансформаційна подія MIR604. Фрагмент ДНК розміром 133 п.о. складається з фланкуючої ділянки рослинної ДНК та ділянки ДНК генетичної конструкції, якою проводилась трансформація; фрагмент гену *cry3A* генетичної конструкції розміром 268 п.о.

На рисунках бачимо, що отримані

амплікони відповідають очікуваним, наведеним у таблиці. У досліджуваних зразках проявляються лише референтний ген кукурудзи *adh1*, що свідчить про наявність та якість рослинної ДНК у зразках та відсутність детектованих генів в генетичному матеріалі рослин. В референтних зразках спостерігаються як маркерний ген кукурудзи *adh1*, так і амплікони очікуваних довжин, що вказує наявність трансгенних подій та адекватність підібраних умов мПЛР. Негативні контролю не містять жодних фрагментів, що

Висновки

Нами розроблено метод мПЛР для масового виявлення *cry* генів, які входять до складу трансформаційних подій, в зразках кукурудзи. мПЛР має переваги над звичайною ПЛР у значній економії затрат реактивів, часу персона-

свідчить про відсутність забруднень реактивів ДНК та належну якість проведення реакції.

Таким чином розроблена нами методика мПЛР дозволяє одночасно достовірно виявляти *cry* гени та трансформаційні події кукурудзи, до складу яких вони входять, і перевіряти якість виділеної загальної ДНК. Для інших трансформаційних подій кукурудзи, які містять *cry* гени (**Bt11** – *cry1A(b)*, **MON863** – *cry3Bb1*, **MON89034** – *cry1A.105* та *cry2Ab2*) була розроблена Touchdown ПЛР.

лу. мПЛР дозволяє достовірно детектувати цільові генетичні послідовності у комплексних препаратах ДНК. В експериментальних селекційних зразках кукурудзи НВФГ компанії «Маїс» *cry* генів не виявлено.

Література

1. Hsin-Ying Huang, Tzu-Ming Pan. Detection of Genetically Modified Maize MON810 and NK603 by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods // J.Agric. Food Chem. – 2004. – №52. – P. 3264-3268.
2. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds.). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., 2003. – 1600 p.
3. Somma, M. Extraction and Purification of DNA. Session 4. In: Training Course on the Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms – User Manual. Edited by M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede. European Commission, DG Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg, 2006. – 229 p.
4. Дрейпер Дж., Скотт Р., Армитидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений / Дрейпер Дж. Пер.с англ. Г.И.Эйснер, В.М.Андрианова. – М.: Мир, 1991. – С. 241-245.
5. European Union Reference Laboratory for GM Food and Feed (EU-RL GMFF). EU Database of Reference Methods for GMO Analysis. Режим доступу: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>.
6. GMO Detection Method Database (GMDD). Режим доступу: <http://gmdd.shgmo.org>.

MARKOVSKIY O.V., BANNIKOVA M.O., MORGUN B.V.

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, 148 Akademika Zabolotnoho St., e-mail: molgen@icbg.org.ua*

IDENTIFYING *CRY* GENES THAT DETERMINE INSECT RESISTANCE BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD IN TRANSGENIC MAIZE

Aims. Multiplex PCR was developed for detection of genetic sequences that determine insect resistance (*cry* genes) in experimental maize samples and reference samples (containing the appropriate transformation events). **Methods.** The total DNA was extracted from maize living plant tissue. Isolation and purification of DNA was carried out using CTAB method. PCR was performed by [1]. Electrophoresis of each sample (12 µl) after mPCR performed in agarose gel (1,2%) during 1,5 hour at 3,5 V/cm. **Results.** Primers to detect genes *cry1A(b)*, *cry1F*, *cry1A.105*, *mcry3A*, *cry2Ab2*, *cry3Bb1*, *cry34Ab1*, *cry35Ab1* were designed and selected. Multiplex for simultaneous determination of few genes were worked out. mPCR amplification of sequences was carried out to determine the presence or absence of transgenes (*cry*). **Conclusions.** Multiplex PCR was developed using reference samples. Primers to detect *cry* genes/transgenic maize events were designed and selected. No *cry* genes were found out in experimental maize samples.

Key words: maize, *cry* genes, transformation events, multiplex PCR.

МАТВЕЕВА А.Ю., КУРЧИЙ В.М., ТИЩЕНКО Е.Н.

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

АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ МЕТАБОЛИЗМА САХАРОЗЫ В ЭНДОСПЕРМЕ МОЛОЧНО-ВОСКОВОЙ СПЕЛОСТИ Т2-РАСТЕНИЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *IN PLANTA* С ПОМОЩЬЮ LBA4404 (pBi2E)

Одно из актуальных направлений генетической инженерии связано с физиолого-генетическими аспектами трансгенеза растений, среди которых углеводный обмен исследован крайне слабо. Особый интерес вызывает метаболизм сахарозы и гексоз, поскольку эти углеводы, являясь источником углерода и энергии в гетеротрофных тканях растений при культивировании *in vitro* и *in vivo*, рассматриваются как регуляторные и сигнальные молекулы в процессах пролиферации и дифференцировки клеток [1, 2]. Основными ферментами метаболизма сахарозы являются сахарозосинтаза (СС, К.Ф.2.4.1.13) и инвертаза (К.Ф.3.2.1.26), первая из которых осуществляет синтез/ расщепление дисахарида, а вторая – её гидролиз с образованием глюкозы и фруктозы [1–3].

Ранее нами показано, что тотипотентность клеток кукурузы, компетентных к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, сопряжена с повышением активности ферментов синтеза сахарозы – сахарозосинтазы и её гидролиза инвертазой [3]. Учитывая важную роль альдоз в активации двухкомпонентной VirA-VirG - регуляторной системы [4], было предположено, что через гексозы (в частности Д-глюкозу) может осуществляться взаимодействие в путях передачи сигналов, стимулирующих, с одной стороны,

агробактериальную *vir*-регуляторную систему процессинга и переноса рекомбинантных ДНК, а с другой – процессы роста и дифференцировки клеток растений. В связи с разработкой технологий генетической трансформации *in planta* целесообразно изучение изменений в метаболизме сахарозы в ответ на взаимодействие агробактерий с клетками генеративных тканей растений (Т0) при формировании зерновок и их отдалённых последствий на рост и развитие растений в следующих поколениях. Предыдущие наши исследования показали, что в эндосперме зерновок кукурузы (*Zea mays* L.) на стадии восковой спелости Т0-растений и их Т1-поколения происходили существенные различия в соотношении сахарозы к гексозам по сравнению с нетрансформированными растениями как результат изменений в активности ферментов сахарозосинтазы и инвертазы [5]. Цель данной работы состояла в сравнительном изучении активности ферментов СС и инвертазы (вакуолярной и цитоплазматической), а также содержания сахарозы, моносахаров и крахмала в эндосперме зерновок молочного-восковой спелости Т2-поколения растений кукурузы, полученных методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* с применением обезоруженного штамма LBA4404, несущего векторную конструкцию pBi2E.

Материалы и методы

Генетическую трансформацию инбредных линий кукурузы 250, 370, 1555 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины) проводили частично модифицированным нами способом Чумакова и соавт. [6]. Для изучения метаболизма сахарозы использовали эндосперм зерновок трансгенных Т2 Т1-растений, в которых ПЦР-методом идентифицировано наличие селективного гена *nptII* и целевого гена – двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы (*pdh*).

Активность ферментов СС и инвертазы измеряли в эндосперме зерновок молочного-восковой спелости Т2-растений кукурузы методами, описанными ранее [7]. Растительную ткань (0,5 г) гомогенизировали в буфере А, содержащем 0,05 М Трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЕД-

ТА, 10 мМ ДТТ и 10 мМ MgCl₂. После центрифугирования супернатант фракционировали сульфатом аммония от 0 до 80% насыщения. Осадок растворяли в минимальном объёме буфера А, диализировали 12 час в том же буфере, разбавленном в 10 раз. Полученный диализат, в котором определяли белки по Лоури, использовали как источник ферментов – СС и инвертазы. Активность СС в реакции синтеза определяли по количеству образованной сахарозы [8], в реакции расщепления сахарозы – по количеству образованной фруктозы арсеномолибдатным методом [9]. Активность вакуолярной (ВИ) и цитоплазматической (ЦИ) инвертазы, а также содержание сахарозы, моносахаров и крахмала определяли методами, описанными нами ранее [10]. В агробактериальном штамме ночной куль-

туры активность ферментов, изученная с помощью тех же методов, отсутствовала. Достовер-

ность полученных результатов определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У крахмалсодержащих растений, к которым относится кукуруза, сахароза, являясь источником нуклеозиддифосфатсахаров – субстратов для биосинтеза крахмала в эндосперме, включается в метаболизм сахарозосинтазой [2]. Другая предполагаемая функция этого энзима связана с созреванием и дифференцировкой. На

рис. 1 представлены результаты сравнительного исследования активности сахарозосинтазы эндосперма зерновок на стадии молочно-восковой спелости Т2-растений кукурузы линий 250, 370, 1555, где в качестве контроля использовали их исходные инбредные линии.

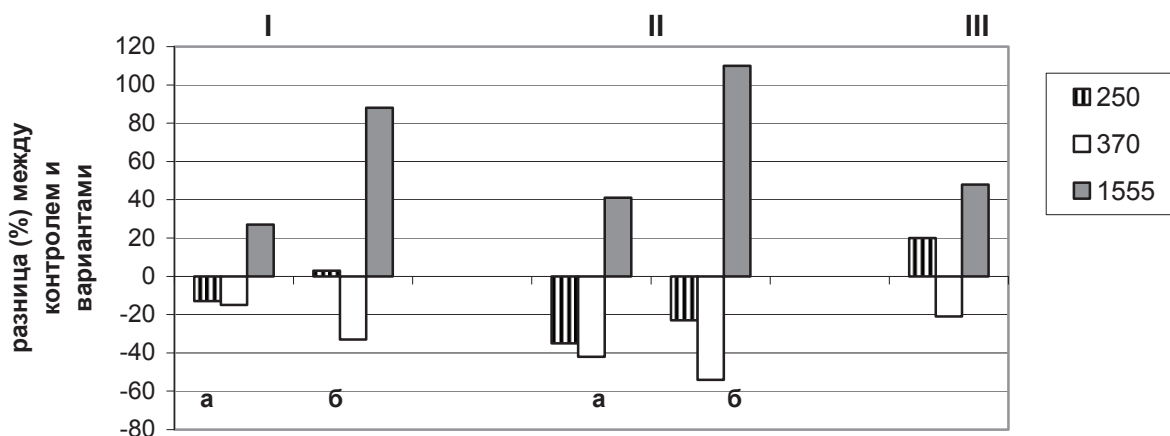


Рис. 1. Относительная удельная (а) и общая (б) активность СС (% от контроля) в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой зрелости Т2-растений, полученных после генетической трансформации *in planta* с использованием штамма LBA4404 (pBi2E):

I – в реакции синтеза сахарозы, II – в реакции расщепления с УДФ; III – содержание легкорастворимых белков

Удельная активность СС в реакции синтеза сахарозы Т2-растений линий 250 и 370, достоверно не отличаясь между собой, снижалась, тогда как линии 1555 – увеличивалась. Что касается общей активности, то различия между изучаемыми генотипами были более четко выражены. А именно, для трансгенных растений линии 1555 наблюдалось существенное повышение, для линии 370, наоборот, снижение, а для линии 250 разница практически отсутствовала.

Реакция расщепления сахарозы энзимом СС проведена нами с уридиндифосфатом (УДФ) в концентрации, соответствующей максимальной скорости реакции. В результате образуются фруктоза и уридиндифосфатглюкоза, используемая непосредственно в реакции трансгликозилирования для биосинтеза крахмала и других биополимеров, У Т2-растений линии 1555 наблюдалась стимуляция удельной и общей активности этого энзима. В то же время реакция трансгенных растений других анализируемых линий была диаметрально противоположной, хотя им и были характерны количественные

различия. Снижение и общей, и удельной активностей СС в эндосперме зерновок Т2-растений линий 250 и 370 сопровождалось повышением уровня сахарозы на 10% и 12%, что может быть отражением преобладания катаболической направленности реакции над синтетической.

Отметим, что наблюдаемые вариации активности СС в ответ на *Agrobacterium* - опосредованную трансформацию могут быть связаны с дифференциальной экспрессией генов сахарозосинтазы кукурузы – *sus1*, *sus2*, *sh1*, кодирующих изоформы СС – SUS1, SUS2, SUS-SH1 [11]. Наряду с этим возможны количественные изменения в биосинтезе полипептидов и стабильности белков этого фермента, поскольку в эндосперме в зависимости от генотипа менялось содержание легкорастворимых белков по сравнению с контролем (рис. 1). В целом, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация приводила к изменениям активности СС в реакциях синтеза и расщепления сахарозы в эндосперме зерновок трансгенных растений Т2-поколения проанализированных инбредных линий.

Включение сахарозы в метаболизм осуществляется инвертазой с последующим использованием гексоз в процессах гликолиза и дыхания. В отличие от СС инвертаза необратимо катализирует реакцию, в результате которой образуются две гексозы, которые к тому же рассматриваются как потенциальные сигнальные и регуляторные молекулы в процессах, связанных с про-

лиферацией и растяжением клеток растений. В таблице представлены результаты сравнительного определения активности вакуолярной и цитоплазматической форм инвертазы в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой спелости контрольных и трансгенных Т2-растений линий кукурузы 250, 370, 1555.

Таблица. Активность инвертазы в эндосперме зерновок Т2-растений кукурузы на стадии молочно-восковой спелости, мкМ фруктозы

Вариант	Вакуолярная		Цитоплазматическая	
	на мг белка	на 1 г ткани	на мг белка	на 1 г ткани
250 К.	$18,69 \pm 0,6$ 100	$214,92 \pm 7,4$ 100	$4,08 \pm 0,0$ 100	$46,95 \pm 0,2$ 100
250 Т2-LBA4404	$19,29 \pm 1,0$ 103,21	$264,5 \pm 4,1^*$ 123,07	$4,63 \pm 0,1^*$ 113,48	$63,38 \pm 2,0^*$ 134,99
370 К.	$8,25 \pm 0,8$ 100	$108,0 \pm 1,9$ 100	$2,77 \pm 0,2$ 100	$36,24 \pm 1,0$ 100
370 Т2-LBA4404	$3,90 \pm 0,5^*$ 47,27	$40,33 \pm 0,7^*$ 37,34	$2,15 \pm 0,1^*$ 77,62	$22,25 \pm 0,8^*$ 61,40
1555 К.	$5,80 \pm 0,2$ 100	$54,02 \pm 1,2$ 100	$2,9 \pm 0,1$ 100	$27,04 \pm 0,9$ 100
1555 Т2-LBA4404	$4,89 \pm 0,3^*$ 84,31	$67,60 \pm 0,5^*$ 125,14	$3,25 \pm 0,1^*$ 112,07	$44,86 \pm 0,6^*$ 165,90

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Как видно из представленных данных, активность вакуолярной инвертазы существенно превышала таковую цитоплазматической инвертазы и в контроле, и в трансформированных вариантах. Вместе с тем, в Т2-растениях линий 370, 250, 1555 наблюдалась разница в функционировании этого энзима. В отличие от линии 370, где происходило снижение активности ВИ и ЦИ на мг белка и на г растительной ткани, в

Т2-растениях линий 250, 1555 активность инвертазы повышалась (за исключением удельной активности ВИ линии 1555).

В результате различий в активности ферментов синтеза/расщепления и гидролиза сахарозы в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой спелости Т2-растений наблюдались изменения в содержании сахарозы, крахмала и моносахаров относительно контроля (рис. 2).

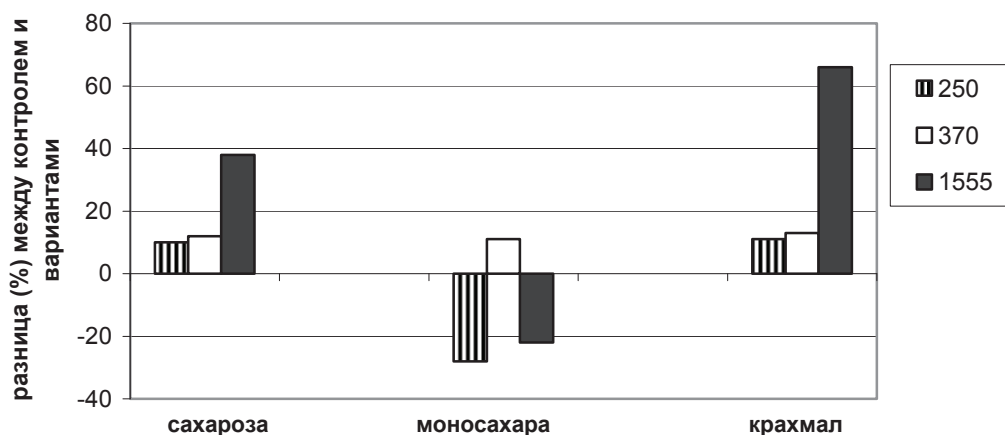


Рис. 2. Содержание углеводов в эндосперме зерновок Т2-растений кукурузы, трансформированных *in planta* с помощью штамма LBA4404 (pBi2E) на стадии молочно-восковой спелости, % от контроля

Что касается сахарозы и крахмала, то их содержание повышалось для всех трансгенных вариантов. Тем не менее их накопление было существенно выше у T2-растений линии 1555, чем линий 370 и 250, для которых разница была недостоверной. Относительно моносахаров следует отметить, что их уровень повышался приблизительно на 10% в эндосперме трансгенных растений линии 370, тогда как у двух других линий, наоборот, снижался почти на 30% и 20%.

Таким образом, в ответ на *Agrobacterium-*

опосредованную трансформацию растений кукурузы линий 250, 370 и 1555 в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой спелости T2-поколения наблюдались изменения в метаболизме сахарозы и гексоз. Анализ особенностей функционирования энзимов синтеза и гидролиза/расщепления сахарозы позволяет высказать предположение о наличии генетических и/или эпигенетических изменений в регуляции биосинтеза сахарозы и гексоз.

Выводы

1. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация растений кукурузы *in planta* приводила к изменениям в метаболизме сахарозы и гексоз в эндосперме зерновок молочно-восковой спелости T2-поколения.

2. Показана генотипическая зависимость функционирования энзимов синтеза/расщепления и гидролиза сахарозы, а также баланса сахарозы и гексоз, содержания крахмала в эндосперме зерновок T2-поколения кукурузы.

Литература

1. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2004. – Vol. 7. – P. 235-248.
2. Сакало В.Д. Регуляция метаболизма сахарозы у свёклы и других культур. – Киев: Логос, 2006. – 248 с.
3. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Тищенко Е.Н. Активность сахарозосинтазы и инвертазы морфогенного и неморфогенного каллусов, полученных из незрелых зародышей кукурузы (*Zea mays* L.) инфицированных *Agrobacterium tumefaciens* // *Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2010. – Т. 8, №1. – С. 18-24.
4. Gelvin S.B. *Agrobacterium*-Mediated plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2003. – P. 16-37.
5. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Моргун Б.В., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Активность сахарозосинтазы и инвертазы эндосперма кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированной *in planta* обезоруженными штаммами *Agrobacterium tumefaciens* // *Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів*. – 2011. – Т. 9, №1. – С. 55-64.
6. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., Волохина И.В. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* // *Генетика*. – 2006. – Т. 42, №8. – С.1083-1088.
7. Sowokinos I.R. Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum* // *Plant Physiol*. – 1976. – Vol. 57. – P. 63-68.
8. Roe J.H. A colometric method for the determination of fructose in blood and urine // *J. Biol. Chem*. – 1934. – Vol. 107, №1. – P. 15-22.
9. Somogii M. Notes on sugar determination // *J. Biol. Chem*. – 1952. – Vol. 195, №1. – P. 18-23.
10. Сакало В.Д., Курчий В.М. Активність сахарозосинтази та інвертази в етіолозованих проростках кукурудзи за дії стресових чинників // *Физиол. и биохим. культ. растений*. – 2009. – Т. 41, №5. – С. 400-407.
11. Hardin S.C., Duncan K. A., Heber S.C. Determination of structural requirement and probable regulation effectors for membrane association of maize sucrose syntase1 // *Plant Physiol*. – 2006. – Vol. 141, № 3. – P. 1106-1119.

MATVEYEVA A.YU., KURCHYI V.M., TISHCHENKO E.N.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska St. 31/17, e-mail: mgirais@mail.ru*

ACTIVITY OF SUCROSE METABOLIZING ENZYMES AT THE MILK-WAXY RIPENESS ENDOSPERM OF MAIZE INBRED LINES T2-PLANTS TRANSFORMED *IN PLANTA* USING LBA4401 (PBI2E)

Aims. Comparative studying the activity of sucrose metabolizing enzymes of T2-plants 250, 370, 1555 transformed *in planta* by disarmed strain LBA4404 harboring vector constructions pBi2E was investigated.

Methods. Sucrose's metabolism enzymes activity and carbohydrates' content under effect of the *Agrobacterium*-mediated transformation by strain LBA4404 were measured. **Results.** The alterations of the sucrose's and hexoses' metabolism at the endosperm of the T2 plant generation milk-waxy ripeness corn seeds were occurred under *Agrobacterium*-mediated transformation on the plants' pollination stage. **Conclusions.** The data indicate genotypic changes in the sucrose's metabolism enzymes activity – sucrose synthase and inver-

tase, as well as at the carbohydrates' content under effect of the *Agrobacterium*-mediated transformation by strain LBA4404.

Key words: *Zea mays* L., transformation, sucrose synthase, invertase carbohydrates' content, endosperm, T2-plants.

МАТВЄЄВА Н.А.¹, КУДРЯВЕЦЬ Ю.Й.², ЛІХОВА О. О.², КВАСКО О.Ю.¹, ШАХОВСЬКИЙ А.М.¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, м. Київ, вул. академіка Заболотного 148, e-mail joyna56@gmail.com

²Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України

Україна, 03022, г. Київ, ул.Васильківська 45

ПОРІВНЯННЯ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ З ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ ЦИКОРІЮ, САЛАТУ ТА АЛТЕЯ

Створення рослин, що синтезують сполуки медичного призначення, є одним з актуальних напрямків сучасної біотехнології. Перелік таких сполук нині є досить великим. Серед рослин, у які переносили цільові білки, можна відмітити насамперед тютюн, який є класичним модельним об'єктом біотехнологій, а також арабідопсис, ріпак, сою, кукурудзу, капусту, картоплю та інші види.

Салат *Lactuca sativa* L. також використовувався для створення трансгенних рослин, що синтезують цільові білки медичного призначення [1-2]. Використання цих рослин має певні переваги, оскільки розроблено ефективні методи *in vitro* культивування, калюсоутворення та регенерації цих рослин [3-4].

До останнього часу рослини цикорію та алтею не використовували для отримання трансгенних рослин з геном інтерферону. Разом з тим, рослини цих видів становлять великий інтерес, оскільки відносяться до лікарських та мають цілу низку природних корисних властивостей. Зокрема, екстракти з рослин цикорію мають гепатопротекторні властивості, нормалізують рівень цукру у крові (застосовують при лікуванні діабету), сприяють кращому засвоєнню кальцію (використовують для профілактики остеопорозу), мають кардіотонічні властивості, активізу-

ють ріст біфідобактерій (є пребіотиками та застосовують у комплексній терапії дисбактеріозів) [5-8]. Рослини алтею відомі перш за все як засіб, що використовується при бронхолегеневих захворюваннях завдяки наявності сполук із лікувальними властивостями [9,10]. Саме тому для нас становило інтерес до природних властивостей цих рослин додати ще і штучні, невласливі. Крім того, завдання порівняння активності екстрактів з рослин, які мають ген інтерферону, дає можливість вибору оптимального об'єкту для трансформування, який надасть можливість отримання цільового продукту з високою ефективністю. Тому наші дослідження були спрямовані на перенесення до рослин салату, алтею та цикорію гена інтерферона- $\alpha 2b$ людини, дослідження ефективності трансформації та порівняння біологічної активності екстрактів з отриманих трансгенних рослин. Ми вважали, що, виходячи з перспективи отримання цільового продукту, перевага може бути надана культурі трансгенних коренів [11], оскільки для їх вирощування не потрібне освітлення, підвищена температура, компоненти середовища високої вартості. Саме тому для генетичної трансформації використовували бактерії *Agrobacterium rhizogenes*.

Матеріали і методи

Трансгенні корені цикорію та салату було отримано шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації за методикою [12] при використанні у якості вихідного матеріалу сім'ядоль 10-14 денних рослин. Для отримання „бородатих” коренів алтею використовували листки 30-40-денних рослин, культивованих у стерильних умовах на середовищі Мурасіге та Скуга [13] зі зменшеним вмістом макросо-

лей при 16-годинному освітленні та температурі +24°C. *A. rhizogenes* A4 з векторною конструкцією pCB161 [14], яка мала цільовий ген *ifn-a2b* та селективний ген *nptII*. Наявність останнього дозволила здійснювати селекцію трансгенних коренів на живильному середовищі, що містило 25 мг/л канаміцину. Наявність та транскрибування генів *ifn-a2b*, *nptII*, *rollB* визначали відповідно методами ПЛР та ЗТ-ПЛР на ампліфікаторі

Mastercycler Personal (Eppendorf) з використанням раніше застосованих праймерів [15]. Рослинну ДНК виділяли згідно з методиками [16, 17].

Для отримання екстрактів використовували фосфатний буфер рН 7,1-7,4. Рослинний матеріал зважували, розтирали на холоді з буфером, центрифугували 5 хвилин при 10000g (+4⁰C). Надсадкову рідину відбирали, перенесли в пробирку та центрифугували 25 хвилин

Результати та обговорення

Після проведеної агробактеральної трансформації було отримано культури «бородатих» коренів рослин усіх трьох видів, причому частота трансформації (відсоток експлантів, на яких у селективних умовах на безгормональному середовищі утворювалися корені) була високою та досягала 100%. Проведений ПЛР аналіз виявив присутність гена *rollB* в

при 16000g (+4⁰C). Вміст загального розчинного білку у екстрактах визначали за методом Бредфорда [18]. Противірусну активність рослинних екстрактів визначали згідно з методикою, описаною раніше у статті [19] за зниженням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (штам Індіана) в клітинах нирки бика лінії MDBK. Порівнювали противірусну активність екстрактів трансгенних коренів салату, цикорію та алтея (по 3-5 ліній кожного виду рослин).

усіх тестованих зразках, що свідчило про перенесення Ri-плазмиди агробактерії. Також було показано, що всі аналізовані лінії коренів мали гени *ifn- α 2b* та *nptII* (рис.1). За результатами ЗТ-ПЛР аналізу у 100% аналізованих ліній рослин усіх видів відбувався синтез мРНК.

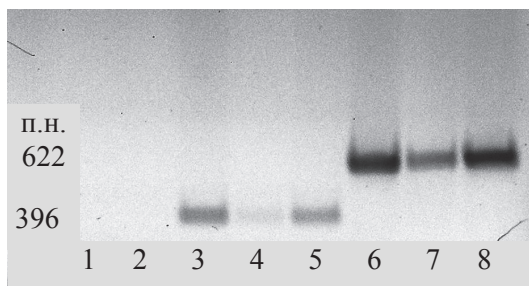


Рис.1. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу присутності генів *ifn- α 2b* (3-5) та *nptII* (6-8); 1, 2 – контрольні рослини

Визначення противірусної активності екстрактів з трансгенних коренів виявило значну варіабельність показників. Для однієї з ліній цикорію визначено відсутність інтерферноподібної активності (рис.2а, лінія 4), хоча наявність мРНК детектували.

Найвищу активність мали екстракти з трансгенних коренів алтея – більше 30000 МО/г маси та 16000 МО/мг загального розчинного білку (рис.2а, лінії 13 та 14).

Найменшу активність мали екстракти з коренів цикорію – до 2250 МО/г маси та 358 МО/мг загального розчинного білку (рис.2а, лінії 1–3). Крім того, було виявлено відмінності і у активності екстрактів різних ліній одного виду рослин. Наприклад, для алтею коливання активності становили від 446,48 до 16378,8 МО/мг

загального розчинного білку (рис.2б, лінії 12-14). Екстракти з коренів нетрансформованих рослин (контроль) противірусної активності не виявили (рис.2а, лінії 5, 11, 15).

Слід зазначити, що різні лінії трансформованих коренів усіх трьох видів рослин відрізнялися також і за швидкістю росту. Так, приріст маси коренів салату у ліній № 1 та 4 відрізнявся у три рази. Спостерігалася кореляція між швидкістю росту коренів та вмістом у зразках загального розчинного білку: чим більшим був приріст маси, тим меншим вміст білку. Можливо, цим частково можна пояснити і різницю у біологічній активності екстрактів, отриманих з різних ліній, адже, чим меншою є кількість синтезованого загального білка, тим меншою буде і кількість інтерферону.

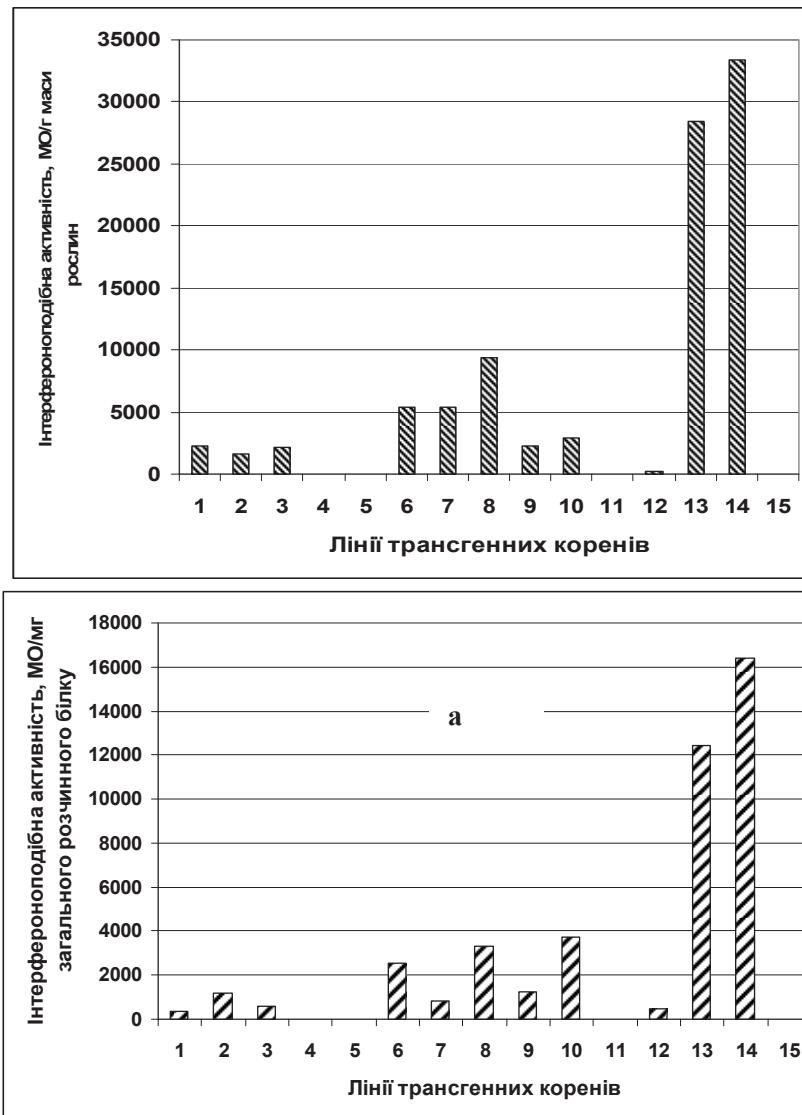


Рис.2. Інтерфероподібна активність екстрактів із трансгенних коренів *C. intibus* (1-4), *L. sativa* (6-10) та *A. officinalis* (12-14); відповідні корені нетрансформованих рослин – лінії 5, 11 та 15

Висновки

Порівняно ефективність зниження цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (штам Індіана) в клітинах нирки бика лінії MDBK при додаванні екстрактів з трансгенних коренів салату (5 ліній), цикорію (4 лінії) та алтею (3 лінії). Виявлено значні відмінності у інтерфероподібній активності екстрактів як різних ліній одного виду рослин, так і міжвидові

відмінності. Найвищу активність проти вірусу везикулярного стоматиту мали екстракти з трансгенних коренів алтею – до 16378,8 МО/мг загального розчинного білку. Таким чином, рослини цього виду можуть бути об'єктом генетичної трансформації векторами з геном інтерферону- $\alpha 2b$ людини для отримання високоефективного противірусного препарату.

Література

1. Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M. et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus // FASEB J. – 1999. – Vol. 13. – P. 1796-1799.
2. Marcodes J., Hansen E. Transgenic lettuce seedlings carrying hepatitis B virus antigen HbsAg // Braz. J. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 12. – P. 469-471.
3. Michelmore R.W., Marsh E., Seely S., Landry B. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell. Rep. – 1987. – Vol. 6 – P. 439-442.

4. Ahmed M.B., Akhter M.S., Hossain M., et al. An Efficient *Agrobacterium-mediated* Genetic Transformation Method of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) With an Aphidicidal Gene, *Pta* (*Pinellia ternata* Agglutinin) // Middle-East J. of Scientific Res. – 2007. – Vol. 2. – P. 155-160.
5. Ki C.G., Yim D., Lee S.Y. Biological activities of root of *Cichorium intybus* // Nat. Prod. Science. – 1999. – Vol. 5. – P. 155-158.
6. Gadgoli C., Mishra S.H. Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* // Ethanopharmacology. – 1997. – Vol. 58. – P. 131-134.
7. Ahmad K.D., Gilani S.N., Akhta A.H., Khan L. Antiulcerogenic evaluation of aqueous extracts of *Cichorium intybus* and *Phyllanthus emblica* in normal and aspirin-treated rats // Pakistan. J. of Scie. and Industrial Res. – 1998. – Vol. 41. – P. 92-96.
8. Hughes R., Rowland I.R. Stimulation of apoptosis by two prebiotic Chicory fructans in the rat colon // Carcinogenesis. – 2001. – Vol. 22. – P. 43-47.
9. Alihah S. M., Akhtar Naveed, Akram M. et al. Pharmacological activity of *Althaea officinalis* L. // J. of Medicinal Plants Research. – 2011. – Vol. 5. – P. 5662-5666.
10. Gudej J. Flavonoids, phenolic acids and coumarins from the roots of *Althaea officinalis* // Planta Med. – 1991. – Vol. 57 – P. 284-285.
11. Mei-Liang Zhou, Xue-Mei Zhu, Ji-Rong Shao et al. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 90, №4. – P. 1229-1239.
12. Матвеева Н.А., Кіщенко О.М., Шаховський А.М., Кучук М.В. Синтез інуліну в «бородатих» коренях цикорію, трансформованого за допомогою *Agrobacterium rhizogenes* // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4. – С. 56-63.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473-497.
14. Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al. High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants // Plant Cell Rep. – 2011. – Vol. 30. – P. 407-415.
15. Матвеева Н.А., Шаховський А.М., Кучук Н.В. Особенности трансгенных растений салата с геном интерферона-α2b, полученных путем *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованной трансформации // Цитология та генетика. – 2012. – Т. 46, №3. – С. 27-32.
16. Дрейпер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. – М.: Мир, 1991. – С.241-245.
17. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // Analytical Biochem. – 1987. – Vol. 163. – P.16-20.
18. 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. – Vol. 7. – P. 248–254.
19. Матвеева Н.А., Кудрявец Ю.И., Лихова А.А. и др. Противовирусная активность экстрактов трансгенных растений цикория и салата с геном интерферона α-2b человека // Цитология и генетика. – 2012. – Т. 46, №5. – С. 28-35.

MATVIEIEVA N.A.¹, KUDRYAVETS YU.I.², LICHOVA O.O.², KVASKO O.YU¹., SHACHOVSKY A.M.¹

¹ *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine*

Ukraine, 03680, Kyiv 143, 148 Zabolotnogo str., e mail: joyna56@gmail.com

² *R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine*
Ukraine, 03022, Kyiv, 45 Vasylkivska str.

COMPARISON OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM TRANSGENIC CHICORY, LACTUCA AND MARSHMALLOW PLANTS

Aim. Comparison of antiviral activity effectiveness (suppression of vesicular stomatitis virus Indiana strain in bovine kidney cell line MDBK) by extracts from transgenic roots of lettuce, chicory and marshmallow with *ifn-α2b* gene was done. **Methods.** The transgenic plants were obtained by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. The presence of transgenes and their transcription were determined by PCR and RT-PCR respectively. Antiviral activity was investigated by suppression of vesicular stomatitis virus (Indiana strain) in bovine kidney cell line MDBK. **Results.** There were significant differences in antiviral activity of extracts from different root strains and also differences of antiviral activity of extracts from different species. The extracts from marshmallow transgenic roots had highest activity against vesicular stomatitis virus – up to 16378,8 MU/mg of total soluble protein. So, marshmallow plants are suitable object for *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation using vectors with human interferon α2b gene. **Conclusions.** The extracts from transgenic lettuce, chicory and marshmallow have antiviral activity against

vesicular stomatitis virus. The *Althaea officinalis* is a most suitable plant species for obtaining transgenic plant with high antiviral activity.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*, transformation, *Lactuca sativa* L., *Althaea officinalis* L., *Cichorium intybus* L.

МЕЛЬНИЧУК М.Д., КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., ЛІХАНОВ А.Ф., АВETИСЯН Ю.Ф.

Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, e-mail: julyja@i.ua

СПЕЦИФІЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТКАНИН РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ ТОМАТІВ (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) ПІД ВПЛИВОМ ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Томати – одна з популярних і основних культур овочівництва. Плоди томатів піддаються бактеріальним хворобам, що суттєво знижує врожайність культури і якість продукції. Для визначення надійних ознак стійкості рослин до фітопатогенних чинників та отримання високопродуктивних і несприйнятливих до збудників хвороб сортів томатів регулярно проводяться цитологічні та гістологічні дослідження патогену,

які уможливають виявлення специфічних морфо-фізіологічних маркерних ознак конституціональної стійкості рослин, а також дозволяють визначити специфіку взаємодії організмів у системі рослина – патоген. У зв'язку з цим метою наших досліджень було вивчення трансформації тканин і клітин репродуктивних органів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) в умовах бактеріозів.

Матеріали і методи

Для досліджень специфіки трансформації тканин репродуктивних органів томатів нами були обрані сорти «Стожар», «Лагідний», «Настенька», «Санька», «Ефемер», «Новичок». Структурно-функціональну перебудову у насінневих зачатках і плодах вивчали методами світлової та люмінесцентної мікроскопії. Анатомо-гістологічні дослідження тканин проводили за стандартними протоколами [2] з використанням мікроскопа AxioScore A-1 Carl Zeiss. Анатомо-гістохімічні дослідження квіток і плодів проводили на постійних мікропрепаратах товщиною 10-12 мкм. Рослинний матеріал фіксували розчином Чемберлена [1]. Зразки зневоднювали

і просочували парафіном. Зрізи виготовляли на санному мікромомі. Тканини фарбували ацетофуксином, сафраніном – водним синім, гематоксилином за Гейденгайном, корифосфіном, флуоресцеїном (розведення 1 : 10000). Лінійні показники анатомічних структур вимірювали у спеціалізованій комп'ютерній програмі Axio Vision Rel. 4.7. Морфометричні показники тканин визначали у 10-ти кратній повторності, діаметр клітин, структурні елементи генеративних органів - у 30-ти кратній. Отриманні результати обробляли статистично з використанням програм Microsoft Office Excel та STATISTICA 6.

Результати та обговорення

З'ясовано, що в обраних нами сортах томатів навіть після застосування хімічних засобів боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами, виявлялися симптоми бактеріальних захворювань. Рослини томатів, які уражені патогенами мають ознаки структурної перебудови мезофілу листків, мікроспорангіїв, плаценти та насінневих зачатків на тканинному і клітинному рівні. Первісною захисною реакцією рослин на шкодочинну дію фітопатогенних мікроорганізмів є процес опробковіння, посиленої кутинізації та суберинізації клітинних стінок епідермісу та мезофілу листків, паренхіми квіток і плодів. Бактеріальні інфекції томатів викликають порушення мікро-

спорогенезу, що призводить до зменшення загальної кількості фертильного пилку і орбікул, до складу яких входить спорополенін; викликають аберації насінневих зачатків за трьома типами.

Встановлено, що бактеріальний патогенез призводить до повного руйнування хлоропластів і ядер клітин. Під впливом екзометаболітів бактерій у клітинах мезокарпію утворюється в'язкий за консистенцією секрет полісахаридної природи (позитивна реакція ШИК), який викликає значні функціональні порушення протопластів, індукує створення додаткових клітинних перетинок, викликає хлорози з подальшою некротизацією тканин (рис. 1, а,б).

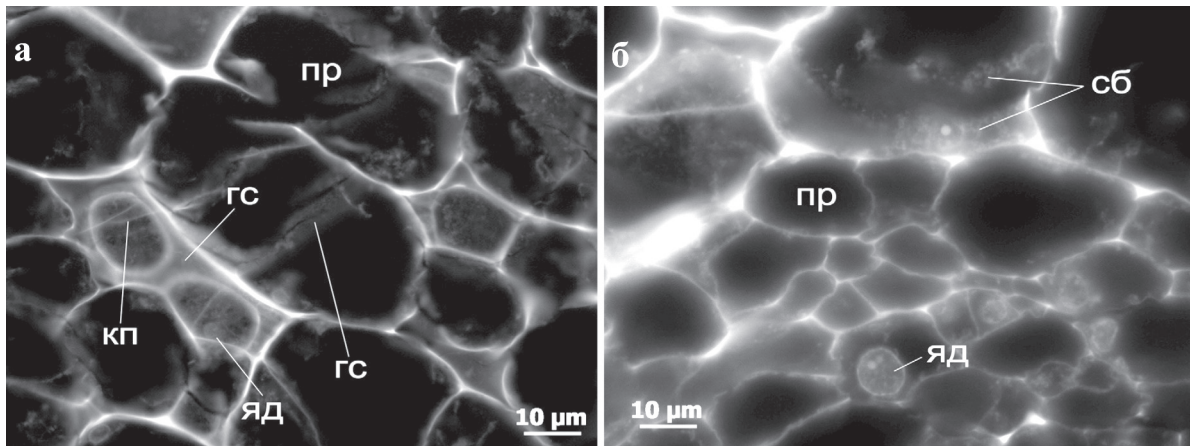


Рис. 1. Особливості аномальної трансформації тканин плаценти (а) і мезокарпію (б) в недозрілих плодах томатів з ознаками бактеріозу: пр – паренхіма плаценти; кп – макрофіброзні потовщення, що утворюють клітинні перегородки; гс – гелеподібна структура бактеріального походження (акридино-вий оранж. 1 : 10000, фільтр Yellow); сб – виділення бактерій; яд – ядро

На поперечному розрізі провідні пучки в ягодах томатів сорту «Стожар» формуються групами по 2–3. Їх діаметр становить 150–170 мкм. У центрі розташовуються трахеїди, по периферії клітини флоєми: ситовидні трубки та супутникові клітини. Поширення бактеріальних клітин по тканинах відбувається латерально від провідних пучків, і, як правило, рівномірно.

У мікроспорангіях уражених патогенними бактеріями рослин томатів були відсутні орбікули – особливі сфероїдальні структурні компоненти пиляків розміром 0,43–0,46 мкм. У нормі вони утворюються в цитоплазмі клітин тапетуму з про-орбікул на стадії дозрівання мікроспор. Орбікули локалізовані на внутрішніх та зовнішніх тангентальних і радіальних стінках тапетуму (рис. 2, а). Ймовірно, що формуванням цих специфічних структур генетично пов'язано з порушенням мікроспорогенезу під впливом патогенних мікроорганізмів. До складу оболонки орбікул входить спорополенін – гідрофобна хімічно стійка речовина, яка необхідна для утворення оболонки фертильного пилку. За нашим даними гістохімічних досліджень, з усіх мікроспор, що виявлялися у гніздах пиляків, лише 50–55% є фертильними (рис. 2, б). Для повноцінного пилку характерна густа цитоплазма, наявність цілком сформованого вегетативного ядра й генеративної клітини. Флуоресценція спорополенінової оболонки пилку у нормально сформованого пилку яскравіша ніж у стерильного.

У патогенезі тканини насінневих зачатків трансформуються. При вивченні структури пло-

дів томатів з ознаками бактеріальних захворювань було встановлено, що окрім нормально сформованих, але не запліднених насінневих зачатків, у тканинах плаценти утворюється велика кількість аберантних, які за комплексом ознак-маркерів можна розділити на три типи: 1 тип – зміна морфологічного типу й співвідношення розмірів елементів насінневого зачатка; 2 тип – зміна динаміки розвитку (передчасна дегенерація структур); 3 тип – відсутність структур або утворення додаткових.

У досліджених нами плодах, зустрічалися аберантні насінневі зачатки всіх трьох типів. Ступінь вираженості патогенної трансформації генеративних органів залежить від багатьох умов. По-перше, природа захворювання рослини, фітопатогенні властивості мікроорганізмів, швидкість їх розмноження, характер впливу екзометаболітів на пластичний обмін тканин насінневих зачатків, здатність до подолання внутрішніх клітинних бар'єрів, стійкість самої рослини до патогенів, швидкість протікання реакції надчутливості рослинного організму. По-друге, від тривалості патогенезу, стадії загального ураження рослини. По-третє, погодні та мікрокліматичні умови місцезростання рослин, пора року, характер мінерального живлення рослини, дефіцит або навпаки надлишок макро- та мікроелементів. Усі ці фактори в значній мірі можуть впливати на характер та швидкість протікання патогенних процесів – від початкових проявів до повної некротизації тканин і загибелі всього організму.

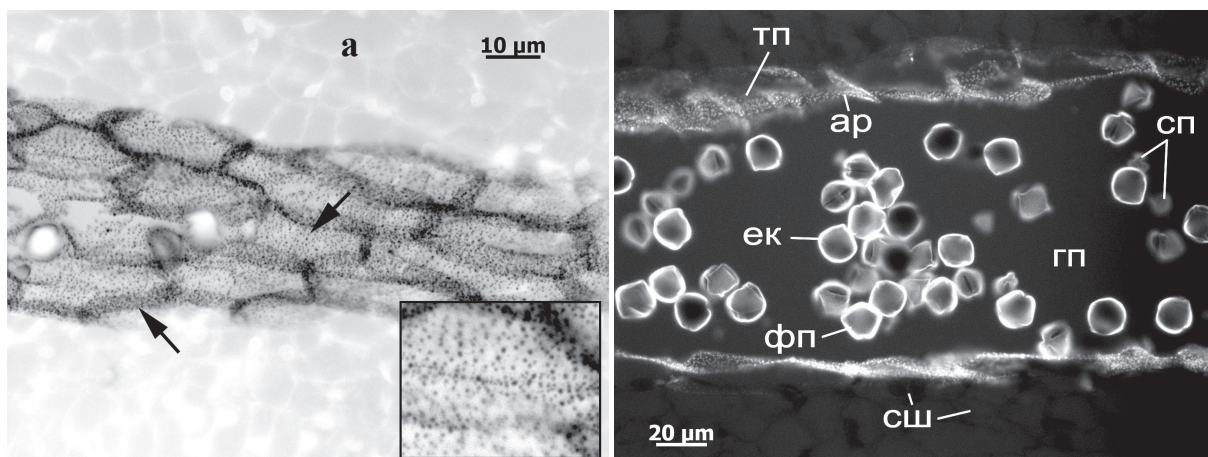


Рис 2. Флуоресценція пилку і орбікул на тангентальних стінках тапетуму в мікроспорангіях неуражених квіток томатів: а – інвертований знімок (стрілками позначені орбікули, або тільця Убіша); б – флуоресценція; гп – гніздо пиляка; тп – тапетум; ар – орбікули; сш – середній шар мікроспорангія; фп – фертильний пилок; сп – стерильний пилок; ек – екзина пилкового зерна

З'ясовано, що у тих випадках коли патогенні мікроорганізми потрапили в плаценту через провідні пучки до закладення основних структурних елементів насінневих зачатків, то структурні порушення в них майже не визначаються. Окрім того, такі насінневі зачатки є здатними до нормального розвинення, у тому числі з утворенням повноцінного насіння. У більшості випадків, як правило, в клітинах починають накопичуватись фенольні сполуки, клітинні стінки пробковіють і стають більш здерев'янілими. Якщо патогенний вплив розпочався ще на ранніх стадіях розвитку насінневого зачатку, то спостерігається перетворення і недорозвинення основних тканини – інтегумента, нуцелуса і зародкового мішка (рис. 3). Тканини фунікулуса,

зазвичай, мають ознаки протікання реакції надчутливості – клітинні стінки стають сильно здерев'янілими з високим вмістом фенольних сполук.

Клітини внутрішніх прошарків інтегумента сильно лігніфікуються, що дозволяє частково, або повністю ізолювати нуцелус і зародковий мішок від шкодочинної дії фітопатогенів. Патогенні мікроорганізми в тканини насінневих зачатків можуть проникнути лише через фунікулус та провідні пучки. Люмінесцентна мікроскопія дозволила встановити, що накопичення патогенних мікроорганізмів, особливо в базальній частині насінневого зачатка, супроводжується значним збільшенням густини протопластів клітин.

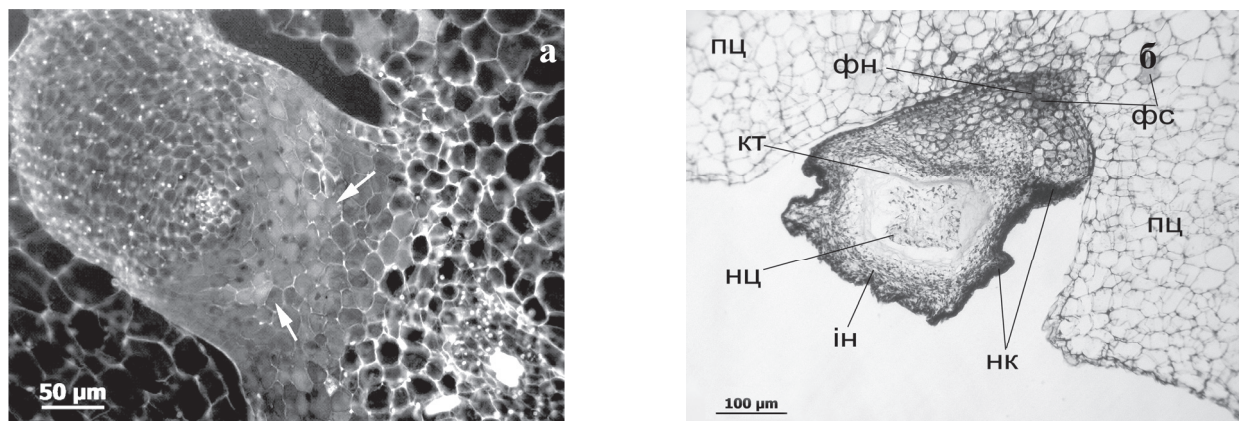


Рис. 3. Трансформація тканин насінневих зачатків *Lycopersicon esculentum* Mill. уражених бактеріями: а – флуоресценція протопластів (показано стрілками) тканин халазальної зони (акридиновий оранж. 1:10000, фільтр Yellow); б – абортні насінневі зачатки з некротичними перетвореннями у плодах томатів із симптомами бактеріозу: пц – плацента; фн – фунікулус; фс – фенольні сполуки; ін – облітеровані клітини інтегумента; нц – нуцелус; кт – кутикула

Клітинні оболонки навколо осередків активного патогенезу сильно флуоресціюють, що більш за все є проявом захисної реакції рослинного організму, у той же час клітини, що мають в протопластах густий секрет, вірогідно полісахаридної природи, навпаки майже не дають світіння.

Зниження флуоресценції клітинних стінок більш за все пов'язано з деструктивними процесами у самих клітинних оболонках. Окрім того, в уражених клітинах ядра піддаються повній деструкції, що призводить до швидкої загибелі клітин і тканин. Топічна спрямованість патогенезу чітко визначається характером розташування та організації васкулярної системи. Патогенез за ознаками ступеня ураженості клітин чітко вказує на те, що патогенні мікроорганізми по тканинам і органам рослини рухаються головним чином по трахеїдах.

У результаті проведених досліджень ми дійшли до висновку, що патогенну некротизацію клітин у тканинах квіток та плодів томатів можна поділити на 6 основних стадій (рис. 4):

1. Активізація метаболізму клітини, що спрямована на підвищення її захисних функцій

(неспецифічного імунітету).

2. Перші конституціональні зміни клітин – потовщення клітинної оболонки завдяки відкладенням лігніну (доведено гістохімічною реакцією на М-лігнін) та підвищений вміст у цитоплазмі фенольних сполук.

3. Утворення оптично гетерогенних структур у протопласті клітини, що розмежовує її на дві суттєво різні частини – здорову та уражену: перша характеризується наявністю ядра, типовою для паренхіми цитоплазми з високим вмістом фенольних сполук; друга – оптично щільною цитоплазмою та включеннями, які локалізуються по межі розділу клітини.

4. Помітні конституційні перебудови клітин. Формування нових клітинних перетинок, які розділяють клітину на рівні або нерівні, функціональні та уражені частини.

5. Інтенсивні конституційні перебудови. Значне потовщення клітинних стінок, руйнування ядра, подальший процес сегментації клітини перетинками, часткова некротизація сегментів.

6. Повна некротизація клітин і тканин (як правило відбувається на фоні часткової або повної некротизації суміжних клітин).

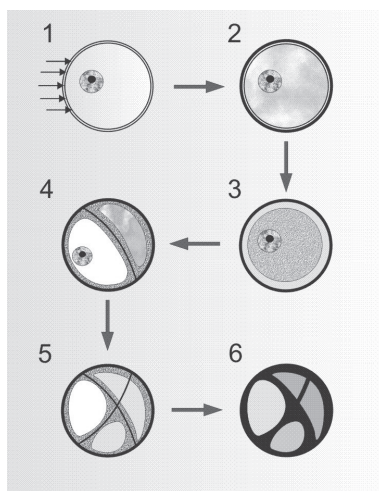


Рис. 4. Послідовні стадії патогенної трансформації клітини паренхіми мезокарпію томатів

Висновки

Нами запропоновано виділяти 6 основних стадій трансформації тканин репродуктивних

органів томатів за впливу патогенних мікроорганізмів.

Література

1. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
2. Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. – М.: Наука, 1979. – С. 40-65.

MELNYCHUK M.D., KOLOMIETS J.V., LIKHANOV A.F., AVETYSJAN J.F.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Ukraine, 03401, Kyiv, 15 Geroiv Oborony St., e-mail: julyja@i.ua

SPECIFIC TRANSFORMATIONS OF TISSUE REPRODUCTIVE ORGANS OF TOMATOES (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) UNDER THE INFLUENCE PATHOGENIC MICROORGANISMS

Aims. The aim of our research was the study of transformation of tissues and cells of reproductive organs of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in conditions of bakteriozsis. **Methods.** For research we have chosen such kinds of tomatoes as “Zarnica”, “Myaghkaya”, “Nasten’ka”, “San’ka”, “Ephemer”, “Novichok”. Structural and functional reorganization in seeds and fruit buds we study using light and fluorescent microscopy methods. Anatomico-histological studies of tissues we made according to standard statements.

Results. We found that bacterial pathogenesis of tomatoes lead to the destruction in chloroplasts, nucleus and in other components. Under the impact of bacterium’s exometabolites in parenchyma of cover tissues of integuments, placenta and mesocarp of fruits form a viscous consistency secret - polysaccharide, which cause significant disturbance of protoplasts, induces the creation of cell walls, leads to chlorotic changes which are followed by necrosis of tissues. **Conclusions.** We suggested the transformations of tissues and cells of reproductive organs of tomatoes in conditions of bakteriozsis divide into 6 main stages.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill., cells components, bakteriozsis.

ПАРХОМЕНКО А.Л.¹, ПУНИНА Н.В.^{2,3}, ЗОТОВ В.С.², ПАРХОМЕНКО Т.Ю.¹

¹ Институт сельского хозяйства Крыма НААН

Украина, 95453, АР Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: tat.parkhomenko@rambler.ru

² Институт биохимии им. АН. Баха РАН

Россия, 11907, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

³ Медико-генетический научный центр РАМН,

Россия, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Одним из экологически безопасных методов защиты растений от фитофагов является использование препаратов на основе энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). В мире разработан широкий ассортимент таких препаратов, так как этот биоагент является одним из немногих, эффективных против большинства фитофагов из семейств *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* и в то же время безопасных для человека, животных и полезных насекомых [1].

Постепенное расширение ареала фитофагов, связанное с изменением климата, а также появление и развитие резистентных к химическим инсектицидам насекомых требует скри-

нинга новых более эффективных штаммов, изучения их физиолого-биохимических и генетических свойств и оценки эффективности против экономически значимых фитофагов с целью создания на их основе новых микробных препаратов.

Целью нашей работы было провести первичную оценку эффективности новых выделенных из природных популяций фитофагов штаммов *Bt*, определить их физиолого-биохимические и генетические свойства и провести сравнительный анализ с имеющимися штаммами в коллекции с целью их идентификации.

Материалы и методы

В работе были изучены штаммы из коллекции отдела микробиологии Института сельского хозяйства Крыма НААН: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 0293 (III серотипа) – аналог штамма биоагента препарата Лепидоцид, *B. thuringiensis*

var. *thuringiensis* 994 (I серотипа) - аналог штамма биоагента препарата Битоксибациллин, *B. thuringiensis* var. *morrisoni* 109 (VIII серотипа), *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* H₁₀ (X серотипа), а также новые штаммы *B. thuringiensis* 0376

р.о. И 408 (или 0408). Для исследований нами также были использованы типовые штаммы: *B. thuringiensis* sbsp. *israelensis* B-5246; *B. thuringiensis* sbsp. *thuringiensis* B-1223; *B. thuringiensis* sbsp. *subtoxicus* B-822; *B. thuringiensis* sbsp. *galeriae* B-197; *B. thuringiensis* sbsp. *finitimus* B-1162.

Нами были использованы микробиологические, биохимические и молекулярно-биологические методы. Сбор и хранение насекомых, выделение штаммов, определение их морфологических признаков, идентификацию проводили общепринятыми методами [2,3,4]. Первичная оценка эффективности новых штаммов была проведена в лабораторных опытах на личинках колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata*, *Coleoptera*) младшего возраста. Листья картофеля обрабатывали методом опрыскивания суспензией с титром спор 2×10^8 в 1 мл. Объем использованной суспензии составлял 5 мл на повторность. Эффективность определяли на протяжении 10 суток после обработки путем учета погибших особей.

Для проведения молекулярно-биологических исследований данных штаммов использовались и подтверждения их принадлежности к роду *Bacillus* применялись анализ нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК и методы АР-ПЦР: Rep-ПЦР [5,6]; ERIC-ПЦР, BOX-ПЦР, а также новый метод – saAFLP [7].

Выделение ДНК. Для выделения препаратов суммарной клеточной ДНК штаммы культивировали на агаризованной среде ТУ: дрож-

жевой экстракт – 1 г/л; пептон – 10 г/л; CaCl₂ – 0,4 г/л; агар – 20 г/л. ДНК была выделена из свежих культур на 1-2 сутки их роста с помощью метода сорбции на магнитных частицах (набор “Минипреп”, «Силекс», Россия).

ПЦР с использованием праймеров к различным повторяющимся элементам (Rep-ПЦР). Для проведения Rep-ПЦР были использованы описанные ранее праймерные системы и протоколы [5,6].

saAFLP анализ штаммов *Bt* [7,8]. Рестрикционный анализ проводили одновременно с лигированием в 10 мкл смеси, содержащей 80 нг образца ДНК, 1х лигазный буфер (“Fermentas”, США), 10 пкМ одноцепочечного адаптера (Ad.CTAG1: 5'-ctagCTGGAATCGATTCCAG-3'), 5 ед. Т4 ДНК лигазы (“Fermentas”, США) и 1 ед. рестриктазы XmaI (XbaI). Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 2 часов, после чего доводили реакционный объем до 100 мкл. ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler gradient Eppendorf в 25 мкл смеси содержащей: 1х буфер для ПЦР, 2,8 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP, в качестве ДНК-матрицы – 2 мкл рестрикционно-лигазной смеси, 0,4 мкМ праймера (Pr.CTAG1: 5'-CTGGAATCGATTCCAGctag-3'), комплементарного адаптеру и 1 ед. ДНК-полимеразы BioTaq (“Диалат ЛТД”, Россия). Для ПЦР амплификации был использован следующий температурно-временной профиль: первоначальная денатурация при 94°C - 2 мин; последующие 30 циклов: 94°C – 30 с, 40°C – 30 с, 72°C – 3 мин; окончательная элонгация – 5 мин при 72°C.

Результаты и обсуждение

Из трупов имаго картофельной моли в период эпизоотии выделен новый штамм *Bt* 0376 р.о. Штамм *Bt* 408 выделен из трупа имаго зерновой моли.

Клетки штамма *Bt* 0376 р.о. – продолговатые палочки, округлые на концах, длиной 4.12 ± 0.07 мкм и шириной 1.28 ± 0.03 мкм. Клетки

штамма *Bt* 408 – продолговатые палочки, округлые на концах, длиной — 4.41 ± 0.07 мкм и шириной 1.25 ± 0.03 мкм.

Первичная оценка эффективности штаммов против фитофагов проводилась на гусеницах колорадского жука младшего возраста (табл.1, 2).

Таблица 1. Эффективность штамма *Bt* 0376 р.о. против личинок *Leptinotarsa decemlineata* (лабораторный опыт L_{1-2})

Вариант опыта	Гибель личинок, сутки, %			
	3	5	7	10
Контроль (вода)	0.0	0.0	2.3±0.1	2.3±0.1
<i>Bt</i> 994	10.7±0.3	69.7±0.1	91.7±0.1	98.3±0.3
<i>Bt</i> 0376 р.о.	20.0±0.3	76.7±0.7	95.0±1.0	100.0±0.00

Таблица 2. Эффективность штамма *Bt* 0408 против личинок *Leptinotarsa decemlineata* (лабораторный опыт L_{1-2})

Вариант опыта	Гибель личинок, сутки, %			
	3	5	7	10
Контроль (вода)	1.3±1.23	4.0±2.25	4.0± 2.25	4.0±2.25
<i>Bt</i> 994	12.0±2.31	24.0±4.00	57.3±4.81	96.0±2.31
<i>Bt</i> 408	17.3±1.33	54.7±9.61	97.3±1.33	100.0±0.00

Так, в результате данных экспериментов была показана высокая энтомопатогенная активность штаммов против личинок *Leptinotarsa decemlineata*, что стало основанием для проведения дальнейшего изучения их биохимических и генетических свойств. Все остальные изучаемые нами штаммы также показали высокую энтомопатогенную активность против соответствующих фитофагов (данные не представлены). Были проведены необходимые биохимические реакции – рост на мясо-пептонном бульоне, протеолитическая, амилитическая, уреазная активность штаммов, продуцирование лецитиназы, ферментация эскулина и усвоение углеводов – сахарозы, маннозы, глюкозы, мальтозы,

арабинозы, дульцита, рафинозы, рамнозы, а также реакция на образование ацетил-метилкарбинола.

В целом было проанализировано 15 признаков штаммов *Bt*. Полученные результаты были использованы для кластерного анализа (рис. 1). Показан высокий уровень сходства (S) штаммов *Bt* I серотипа и *Bt* 0376 p.o., а также *Bt* X серотипа и штамма *Bt* 408 между собой ($0,7 < S \leq 1,0$) — 0,88. Штаммы *Bt* III и VIII серотипов образовывали отдельные кластеры, однако выяснить их действительные филогенетические отношения с помощью проведения кластерного анализа только на основании биохимических характеристик не представлялось возможным.

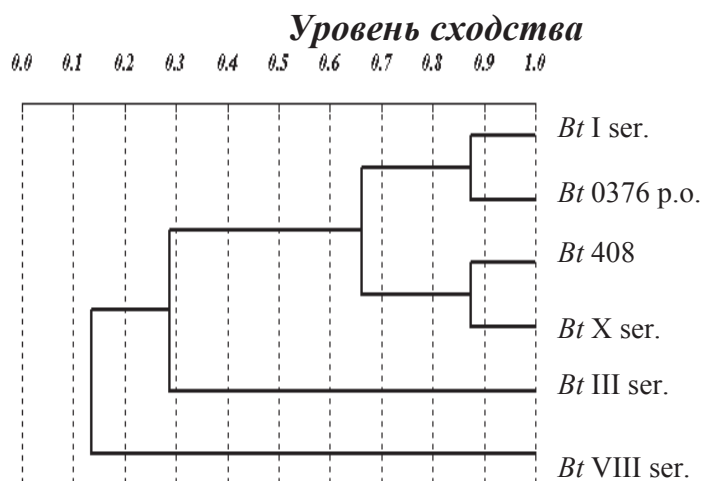


Рис. 1. Дендрограмма уровня сходства исследуемых штаммов *Bt* по физиолого-биохимическим характеристикам

Для уточнения филогенетических взаимоотношений исследуемых штаммов нами были применены генетические методы исследования. С целью подтверждения принадлежности штаммов к роду *Bacillus* был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *16S* рРНК и *gyrB*. На основании данного анализа все исследуемые штаммы были отнесены к роду *Bacillus*, группе *B. cereus*. С помощью сравнительного анализа нуклеотидной и аминокислотной последовательностей было уточнено таксономическое положение изучаемых штаммов и показано, что они относятся к виду *Bt* [8]. Однако не удавалось выявить генетических различий, которые бы позволили разделить исследуемые штаммы, например, *Bt* 0376 p.o и *Bt* 408. Поэтому для выявления различий между близкими штаммами бактерий внутри вида были применены методы геномного фингерпринтинга: ERIC-, BOX-ПЦР и метод saAFLP, модифи-

кислотной последовательностей было уточнено таксономическое положение изучаемых штаммов и показано, что они относятся к виду *Bt* [8]. Однако не удавалось выявить генетических различий, которые бы позволили разделить исследуемые штаммы, например, *Bt* 0376 p.o и *Bt* 408. Поэтому для выявления различий между близкими штаммами бактерий внутри вида были применены методы геномного фингерпринтинга: ERIC-, BOX-ПЦР и метод saAFLP, модифи-

цированный нами ранее [7]. Данные методы достоверно позволили различить штаммы на уровне: вид – группа штаммов — штамм. Ранее был проведен анализ геномного фингерпринтинга (рис. 2, [8]). Показано, что все полученные спектры разделили исследуемую выборку штаммов на 5 кластеров, разделение не соотносилось с данными серотипического анализа, что, возможно, связано с наличием *cry* генов в тех

или иных штаммов. Кластер 1 включал в себя типовые и референтные штаммы *Bt* sbsp. *thuringiensis*, *Bt* 0408, а также штамм *Bt* 0376 p.o., который также имел уникальную полосу, отличающую его от спектров штаммов группы 1. Кластеры 2, 3, 4, 5 были представлены либо малым числом штаммов, либо одним. Все штаммы относились к одному виду *B. thuringiensis*, предположительно к разным подвидам.

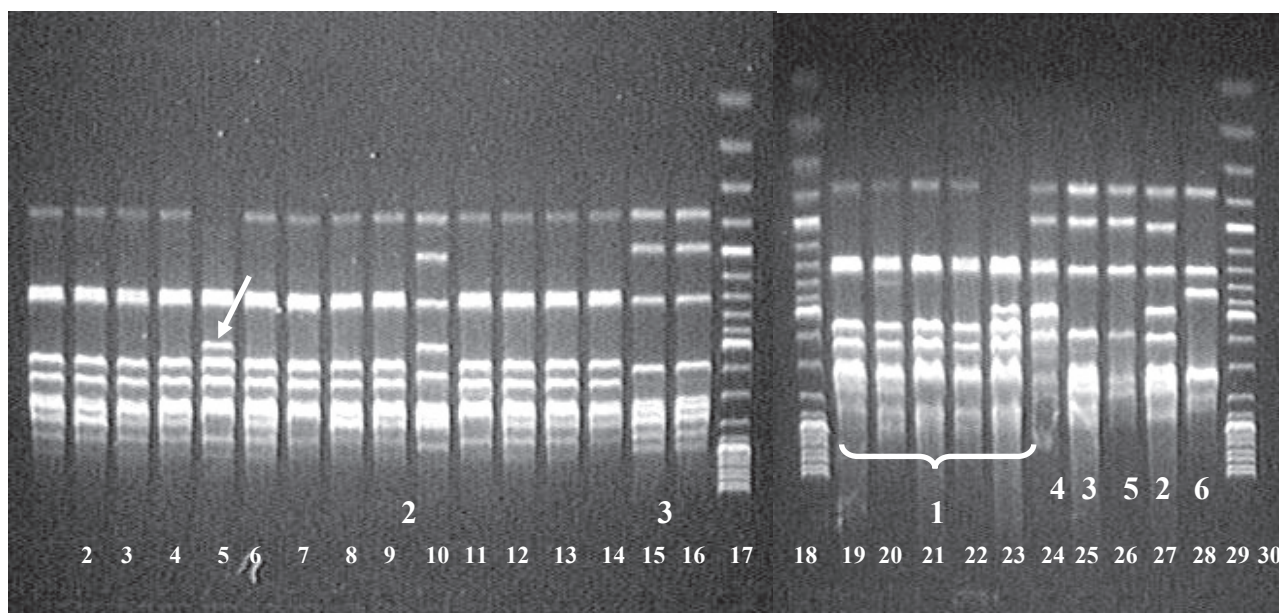


Рис. 2. Результаты электрофоретического анализа продуктов saAFLP на препаратах ДНК *Bt*. Номера дорожек: 17, 18, 29 – маркер GeneRuler™ молекулярной массы ДНК 1 kb (Fermentas); 1 – *Bt* H10, R-тип; 2 – *Bt* A/N; 3 – *Bt* 0408; 4, 19 – *Bt* 5681st; 5, 23 – *Bt* 0376 p.o.; 6 – 9, 10, 27, 11–15, 21 – другие исследованные штаммы; 16, 25 – *Bt* 0293; 20 – *Bt* sbsp. *israelensis* B-5246; 22 – *Bt* sbsp. *thuringiensis* B-1223; 24 – *Bt* sbsp. *subtoxicus* B-822; 26 – *Bt* sbsp. *galerae* B-197; 28 – *Bt* sbsp. *finitimus* B-1162; 30 – контроль в отсутствии ДНК-матрицы

При помощи методов ERIC-, BOX-ПЦР и saAFLP было выявлено 36 полиморфных признаков, на их основе была построена дендрограмма. Все исследуемые штаммы были достоверно разделены на 5 кластеров. К первому относились штаммы *Bt* H10 R-типа, типовой штамм *Bt* sbsp. *thuringiensis* B-1223, штаммы *Bt* 0408, *B. israelensis* B-5246 и другие штаммы коллекции. Однако следует отметить, что штамм *Bt* 0376 p.o. хотя и был сгруппирован в данный кластер, был удален от других штаммов группы,

Выводы

Оценена эффективность штаммов *Bt* 0376 p.o. и *Bt* 408 против личинок колорадского жука, которая составляет на 10 сутки 100%. Проведена идентификация перспективных штаммов *Bt* 0376 p.o. и *Bt* 408 с помощью физиолого-биохимических и молекулярно-биологических методов. Выявлено, что оба штамма принадле-

вследствие наличия уникальных полиморфных признаков. Данные признаки в дальнейшем планируется изучить, определить нуклеотидную последовательность и, возможно, использовать в качестве маркера для диагностики или идентификации. Кластер 2 образован двумя подвидами — *Bt* sbsp. *galerae* и sbsp. *subtoxicus* (с низким уровнем достоверности). Кластер 3 объединяет штаммы *Bt* 0293 и 836. Кластер 4 представлен штаммом *Bt* 109. Подвид *Bt* sbsp. *finitimus* выделен в кластер 5.

жат к I серотипу, и штамм *Bt* 0376 p.o. имеет уникальный saAFLP-фрагмент. Показано, что для выявления различий между близкими видами и штаммами бактерий целесообразно применять метод saAFLP совместно с биохимическим анализом.

Литература

1. Кандыбин Н.В. Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми: теория и практика – М.: Агропромиздат, 1989. – 172 с.
2. Лескова А.Я., Рыбина Л.М., Строева И.А. Идентификация культур *Bacillus thuringiensis* и оценка их патогенных свойств. (Методические указания). – Л.: изд. Всесоюз. НИИ защиты растений, 1984. – 21 с.
3. Определитель бактерий Бержи в 2-х т. / [Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т.1. – 432 с.
4. Определитель бактерий Бержи в 2-х т. / [Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига и др.]. – М.: Мир, 1997. – Т.2. – 368 с.
5. Eppelen J.T., Ammer H., Eppelen C. Oligonucleotide Fingerprinting using Simple repeat Motifs: A convenient, Ubiquitously Applicable Method to Detect Hypervariability for Multiple Purposes // eds Burke G., Dolf G., Jeffreys A.J., Wolff G. Basel: Birkhauser. – 1991. – P. 50–69.
6. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T., de Bruijn F.J. // Appl. environ. Microbiol. – 1994. – Т. 60. – С. 2286–2295.
7. Zotov V.S., Punina N.V., Khapchaeva S.A., Didovich S.V., Melnichuk T.N., Topunov A.F. New taxonomic marker – *hin*-region // Ekologicheskaya genetika. – 2012. – Т. 2. – С. 49–62.
8. Пунина Н.В., Зотов В.С., Пархоменко А.Л., Пархоменко Т.Ю., Топунов А.Ф. Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов *16S* рПНК, *gyrB* и методов АР-ПЦР и saAFLP // Acta Naturae. – 2013. – Т. 5, №1. – С. 93-103.

PARKHOMENKO A.L.¹, PUNINA N.V.^{2,3}, ZOTOV V.S.², PARKHOMENKO T. YU.¹

¹*Institute of agricultural of Crimea of NAAS*

Ukraine, 95453, AR Crimea, Simferopol, Kievskaya, 150, e-mail: tat.parkhomenko@rambler.ru

²*A.N. Bach Institute of Biochemistry RAS*

Russia, 11907, Moscow, Leninsky prospect, 33, build. 2

³*Research Center for Medical Genetics RAMS*

Russia, 115478, Moscow, Moskvorechje, 1

PHYSIOLOGY -BIOCHEMICAL AND GENETICALLY CHARACTERISTICS OF PERSPECTIVE INSECT PATHOGEN STRAINS *BACILLUS THURINGIENSIS*

Aims. The estimate of efficiency of new natural strains of *B. thuringiensis*, definite its physiology-biochemical characteristics and identification of new strains. **Methods.** In our work we using the collection, typical and new strains of *B. thuringiensis*. We using microbiological and molecular-biological methods (Rep-PCR: ERIC-PCR, BOX-PCR and new methods – saAFLP. **Results.** The strains of *Bt* 0376p.o. and 0408 have the high insecticide activity to larvae of colorado beetle. The death of larvae on 10 day of carrying out of experiments was 100%. In accordance with physiology-biochemical reactions the strain of *Bt* 0376p.o. was grouped to I serotype, the strain of *Bt* 0408 – to X serotype. But by saAFLP and other methods (Rep-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR the both one were grouped with the type strains *Bt* subsp. *thuringiensis* B-1223. **Conclusions.** It was estimate of strains efficiency of *B. thuringiensis* 0376p.o. and 0408 against to larvae of potato beetle – 100 %. It was shown that the both investigated strains belong to I serotype by saAFLP method.

Key words: *B. thuringiensis*, efficiency, single adaptor AFLP.

РОНИН Е.И., МИНКОВА Д.М., МЕСТЕР Д.И., КОРОЛЬ А.Б.

University of Haifa, Institute of Evolution

Mount Carmel, Haifa 31905 Israel, e-mail: efim@research.haifa.ac.il

МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ SNP-МАРКЕРОВ

Новые технические возможности, позволяющие тысячи маркеров на хромосому, требуют модернизации программных средств построения генетических карт, способных переработать не больше сотен маркеров в хромосоме.

Желание иметь гигантское число маркеров при относительно низком объеме популяции (затраты проекта пропорциональны количеству особей в популяции) оправдывается стремлением «залатать дыры в генетической карте». Тут же возни-

кают проблемы «утилизации» огромного числа абсолютно сцепленных маркеров, разошедшихся из-за ошибок их идентификации. Удивительным является тот факт, что абсолютно сцепленные маркеры расходятся и выстраиваются в генетической карте, порождая «облака» ошибочно упорядоченных маркеров, сильно увеличивающих длину карты. Когда маркеров не так много, 100-200 на хромосому, с этим удаётся справиться в рамках традиционных подходов (Mester, et al 2003, Ronin et al 2010). Но при тысячах маркеров

Материалы и методы.

1. Метод окрестностей (МО). Предлагается подход решения проблемы, заключающийся в ослаблении требования, которое позволяло исключать абсолютно сцепленные маркеры. А именно, вместе с абсолютно сцепленными маркерами исключаются маркеры, принадлежащие некоторой окрестности опорных маркеров, радиус которой мы заранее определяем (Рис. 1). Выбор опорных маркеров может быть случайным из оставшегося множества маркеров после удаления окрестности предыдущего опорного маркера, а может быть направленным – выби-

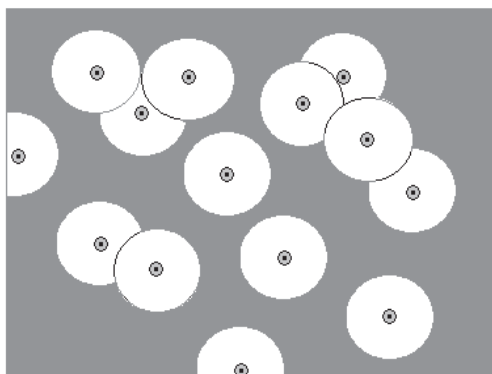


Рис.1

Тогда вероятность того, что у всех особей оба аллеля маркера m будут безошибочно идентифицированы, равна:

$$P=(1-p)^N=(1-0.01)^{100}\approx e^{-1}. \quad (1)$$

Это значит, что примерно третья часть абсолютно сцепленных с m маркеров останутся абсолютно сцепленными и безошибочными. Насколько идея метода работает, легко увидеть, проделав следующие простые оценки. Пусть хромосома имеет длину 100 сМ., тогда, имея популяцию типа *backcross* объемом 100 особей, мы можем рассчитывать на определение мини-

на хромосому, которые поставляет нам SNP-технология, трудности решения задачи становятся непреодолимыми. В работе предлагаются два метода, которые направлены на преодоление этой трудности.

Важным моментом является понимание того, что наличие определённого уровня ошибок при аллельной идентификации SNP-маркеров ограничивает плотность маркеров генетической карты некоторой величиной, не зависящей от объёма популяции.

рвать из оставшегося множества наиболее информативные (в указанном смысле) маркеры. Очевидно, чем больше окрестность, тем меньше остаётся маркеров, которые мы можем использовать при построении карты. Этот негативный эффект, сопровождающий процесс удаления огромного числа неинформативных маркеров, может быть уменьшен, если уменьшить радиус исключаемых окрестностей. Но при этом увеличивается количество ошибок в генетической карте, которое автоматически растёт с увеличением числа анализируемых маркеров.

2. Метод групп абсолютного сцепления (МГАС). При использовании этого метода в качестве опорных маркеров выбирают только по одному представителю из каждой группы абсолютно-сцепленных маркеров за исключением, может быть, очень малочисленных групп. Остальные маркеры удаляются. Идея этого простого метода возникла в связи со следующей оценкой. Пусть объём популяции $N=100$. И пусть вероятность ошибочной идентификации $p=0.01$. аллелей маркера m у i -ой особи равна

мального интервала длиной в 1сМ. Следовательно, в карте максимальной плотности не может быть больше 101 маркера. Другими словами, из 10000 маркеров в этой карте, по существу, будут только 100 маркеров, остальные с ними абсолютно сцеплены. Таким образом, для каждого маркера достаточная часть его «близнецов» будет безошибочной и, следовательно, абсолютно-сцепленной. Правда, совершенно случайно (с малой вероятностью) могут оказаться сцепленными ошибочные варианты маркера. Поэтому и вводится порог на отбор маркеров с достаточным числом абсолютно-сцепленных копий.

Результаты анализа моделируемых примеров.

1. Метод МО. На нескольких примерах, в первом из которых полностью отсутствует шум, а в трёх других мы данные первого примера подвергаем искажениям разной степени, анализируются результаты генетического картирования в случае, когда на хромосоме 10000 маркеров. Вначале смоделирована карта с 10000 маркерами типа ВС для популяции объёмом 100 особей. Из всей совокупности маркеров 99% имеют нулевое расстояние с соседними маркерами, 0.8% маркеров отстоят от одного из соседей на расстояние, которое распределено равномерно в интервале [0,2] сантиморгана. Оставшиеся 0.2% маркеров отстоят от одного из соседей на расстояние, распределённое равномерно в интервале [2, 6] сантиморгана. Таким образом, средняя длина построенной хромосомы. $L_{chr}=80x1cM+20x4cM = 160cM$. Построенная

карта оказалась состоящей из 60-ти опорных маркеров, остальные маркеры были абсолютно сцепленными с ними, поэтому их заранее удалили. В табл. 1 приводятся результаты построения генетической карты с зашумлёнными 10000 маркерами. В таблице приводятся результаты исследования зависимости качества построенной карты от величины окрестности опорного маркера и от уровня ошибок идентификации аллелей маркеров. В первом столбце указаны величины радиусов (*Rad*) окрестностей. Другие обозначения: % *ош. м.* – процент маркеров, в которых возможны ошибки идентификации аллелей; *вер.ош.* – вероятность неверной идентификации аллелей у данной особи; *к.оп.м.* – количество опорных маркеров; *к.м.к.* – количество маркеров итоговой карты; *длина* – длина карты в сМ; *чис. ош.* – число ошибок в построенной генетической карте.

Таблица 1. Зависимость качества построенной карты от величины окрестности опорного маркера и от уровня ошибок идентификации аллелей маркеров

<i>Rad</i>	% <i>ош. м.</i>	<i>вер. ош.</i>	<i>к. оп. м.</i>	<i>к. м. к.</i>	<i>длина</i>	<i>чис. ош.</i>
0.08	90	0.01	34	22	202.5	0
	90	0.005	22	22	205.7	0
	50	0.01	33	23	209.5	0
0.04	90	0.01	340	49	277.4	7
	90	0.005	98	42	240.3	3
	50	0.01	207	36	225.9	2
0.03	90	0.01	792	45	236.2	8
	90	0.005	222	40	200.0	3
	50	0.01	437	44	220.0	3
0.00	0	0	60	53	149.5	0

Очевидным является наличие небольшого количества опорных маркеров, остающихся при выборе большой окрестности опорных маркеров, а также безошибочное их расположение в построенной генетической карте. Также очевидным является наблюдаемый рост числа опорных маркеров с уменьшением их окрестностей.

Увеличение почти вдвое числа ошибочных локусов увеличивает почти вдвое число опорных маркеров, идущих на построение генетической карты. Это происходит из-за того, что увеличение ошибок приводит к расхождению большего числа абсолютно сцепленных маркеров, т.е. происходит заметное увеличение числа различных маркеров. Увеличение вероятности

ошибок вдвое более чем в три раза увеличивает число опорных маркеров (*к.оп.м.*), идущих на построение генетической карты. Однако, последнее устранение «неустойчивых соседей» и маркеров, нарушающих монотонность, даёт в итоговой карте близкие количества маркеров (*к.м.к.*).

2. Метод МГАС. В следующей Табл. 2 приведены результаты, полученные этим методом на предложенном выше примере и его зашумлённых вариантах. В первом столбце таблицы показан нижний порог количества абсолютно-сцепленных маркеров (НПСЦ), превышение которого приводило к появлению соответствующего опорного маркера.

Таблица 2. Результаты исследований, полученные методом МГАС

НПСЦ	% <i>ош. м.</i>	<i>вер. ош.</i>	<i>к. оп. м.</i>	<i>к. м. к.</i>	<i>длина</i>	<i>чис. ош.</i>
3	90	0.01	149	56	152.5	0
	90	0.005	134	55	151.5	1
	50	0.01	91	56	152.5	2
6	90	0.01	75	49	143.6	0
	90	0.005	65	53	151.5	0
	50	0.01	59	50	149.5	0
11	90	0.01	54	45	141.6	0
	90	0.005	54	45	141.6	0
	50	0.01	55	48	147.6	0
	0	0	60	53	149.5	0

Примечание. Нижняя строка таблицы совпадает с аналогичной строкой предыдущей таблицы.

Обсуждение. Технический прогресс последних лет позволил сравнительно недорого получать огромное количество полиморфных маркеров на геноме (SNIP-маркеры). Казалось бы, появилось всё необходимое для построения очень плотных генетических карт, но при этом возникли проблемы «утилизации» большого числа абсолютно сцепленных маркеров, разошедшихся из-за ошибок их генотипирования. Если бы не было этих ошибок, то задача автоматически сводилась бы к предыдущей, с числом маркеров на хромосому, отвечающим численности популяции. Очевидно, что в этом случае все маркеры разбиваются на группы абсолютно сцепленных маркеров, и по одному маркеру из каждой группы включаются в карту, а остальные удаляются. Теперь же мы имеем, кроме множеств абсолютно сцепленных маркеров, множество близких к ним маркеров, взаимное расположение которых может быть любым в зависимости от случившихся ошибок генотипирования. Этот факт и раньше имел место, но, в силу небольшой плотности карт, эти ошибки практически не влияли на порядок маркеров. Кроме решения этих проблем, потребовалась модернизация старых программных средств построения генетических карт, которые были способны переработать не больше сотен маркеров в хромосоме.

В работе рассмотрены два метода. Особенность первого метода, метода окрестностей (МО), состоит в случайном или не случайном последовательном выборе опорных маркеров, а также в удалении маркеров, находящихся в окрестностях заданного радиуса для каждого из последовательно выбираемых опорных маркеров. Генетическая карта, как и раньше, строится только по

опорным маркерам.

Второй метод, метод групп абсолютного сцепления (МГАС), сравнительно прост в своей реализации. В нем в качестве опорных маркеров выбирается только по одному представителю из каждой группы абсолютно-сцепленных маркеров за исключением, может быть, очень малочисленных групп. Остальные маркеры удаляются. Очевидно, второй метод является более точным, несмотря на его сравнительную простоту, но он работает в условиях, когда объём популяции соответствует уровню ошибок генотипирования. Полезными, в этом смысле, выглядят следующие простые рассуждения. При объёме популяции в 100 или 200 особей и при 1%-ном уровне ошибок генотипирования, который считается сейчас общепризнанным при получении SNP-маркеров, мы, в соответствии с формулой (1), будем иметь, соответственно, безошибочных 1/3 или 1/9 часть от общего количества абсолютно сцепленных маркеров. И если количество близнецов – три-четыре десятка, то метод МГАС обеспечит построение карты в первом случае с точностью до 1 сМ, а во втором – до 0.5 сМ.

Теперь, с целью увеличения плотности карты, рассмотрим популяцию из 1000 особей. Методом МО получим результат, при котором все близнецы из-за ошибок генотипирования разойдутся. МГАС в этом случае вообще перестаёт работать. Этот факт, в частности, говорит о принципиальной невозможности построить карту с плотностью 0.1 сМ, которую могла бы обеспечить популяция в 1000 особей. Причиной этого является высокий уровень ошибок генотипирования.

Выводы.

Появление SNP-маркеров, способных увеличить плотность существующих генетических карт, породило две основные проблемы. Первая проблема, техническая, связана с необходимостью обрабатывать значительно больший объём информации. Вторая проблема, алгоритмическая, ставит вопрос: как извлечь ожидаемые результаты? Представленная работа посвящена решению второй проблемы. Предлагаются два алгоритма построения генетических карт. Один направлен на построение карт, когда практически

отсутствуют абсолютно-сцепленные маркеры. Второй показывает, что при наличии множеств абсолютно-сцепленных маркеров карты могут быть построены с очень высокой точностью. Важным моментом является понимание того, что наличие определённого уровня ошибок при аллельной идентификации SNP-маркеров ограничивает плотность маркеров генетической карты некоторой величиной, не зависящей от объёма популяции.

Литература

1. 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.
2. Ronin, Y., D. Mester, D. Minkov, A.B. Korol. Building reliable genetic maps: Different mapping strategies may result in different maps // *Nat. Science*. – 2010 – Vol. 2. – P. 576–589.

RONIN Y.I., MINKOVA D.M., MESTER D.I., KOROL A.B.

University of Haifa, Institute of Evolution

Israel, 31905, Haifa, Mount Carmel, e-mail: efim@research.haifa.ac.il

METHODS OF GENETIC MAPPING USING SNP-MARKERS

Aims. The appearance of SNP-markers leads to the increasing of density of existing genetic maps and simultaneously has generated two major problems. The first problem is technical; associated with the processing of much more information. The second problem, algorithmic, raises the question: how to derive the expected results? **Methods.** Two algorithms of genetic mapping are proposed. One of them aims to maps building without any bound-together markers. It is based on the removing of all the markers from some area of chosen markers. The second method is applied when there are some groups of bound-together markers. It is based on the use of one representative from each set of bound-together markers. **Results.** Both methods allow solving of the problem; however the second method can only work at a reasonable population size, which does not lead to the total destruction of the sets of bound-together markers. Maps can be built by this method with very high precision. Moreover, this method uses earlier developed algorithms. **Conclusions.** Specified level of errors in the identification of alleles of SNP-markers limits the density of markers on the genetic map by some value that is independent of population size.

Key words: SNP-markers, genetic mapping, bound-together markers.

САХНО Л.А.¹, СЛИВЕЦ М.С.^{1,3}, ПЕТЕРСОН А.А.¹, КОРОЛЬ Н.А.², КАРБОВСКАЯ Н.В.², ОСТАПЧУК А.Н.², КУЧУК Н.В.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины*

Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: sakhno@icbge.org.ua

²*Институт микробиологии и вирусологии им. Заболотного НАН Украины*

Украина, Д 03680, Киев, МСП, ул. Академика Заболотного, 154

³*Национальный технический университет Украины «Киевский Политехнический Институт», Украина, , 03056, Киев, пр. Победы, 37*

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ РАПСА С ТРАНСГЕНОМ *CYP11A1* В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА

В связи с меняющимися климатическими условиями важной становится такая характеристика растений как устойчивость к стрессовым

факторам различного происхождения.

Устойчивость к повреждающим воздействиям определяется в том числе и свойствами

мембран, которые в свою очередь зависят от липидного состава и степени десатурации жирных кислот в них [1]. Растения табака *Nicotiana tabacum* с повышенным содержанием линоленовой кислоты, благодаря сверхэкспрессии генов *FAD3* и *FAD8*, обладали повышенной устойчивостью к осмотическому стрессу и большей чувствительностью к повреждению высокими температурами [2]. Растения пустынь имеют пониженный уровень десатурации жирных кислот в липидах листьев [3]. У мутантов арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, несинтезировавших триеновые жирные кислоты из-за молчания генов *fad3-2*, *fad7-2* и *fad8*, в условиях повышенных температур увеличивалось содержание насыщенной пальмитиновой кислоты и уменьшалось содержание триненасыщенных жирных кислот [4].

Нами были созданы трансгенные растения ярового рапса, в ядерный геном которых введен ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка [5]. Они выдерживали обработку гербицидом BASTA в условиях теплицы за счёт экспрессии гена *bar*, который использовался в конструкции в качестве селективного. Некоторые трансформанты накапливали

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве исходного материала использовали поддерживаемые в асептических условиях растения ярового рапса (*Brassica napus* L.) сорта Мария (тип "00") (контроль) и трансформанты второго поколения с геном *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка [5] – растения гомозиготных линий T₂1a и T₂2в. Их высаживали в грунт в условиях теплицы (12/12 фотопериод, +23°C). Через две недели адаптированные растения переносили в климакамеру Programmable Plant Growth Chamber, модель WGC-P9 (WiseCube® WGC, Корея).

Тест на устойчивость к повышенным температурам проводили спустя две недели выращивания растений в климакамере при следующих параметрах: 16ч (свет)/8ч (темнота) фотопериод, температура +22°C (день)/+18°C (ночь), влажность - 70%, освещенность - 480-550 μM м⁻² сек⁻¹). Влажность и освещенность оставляли без изменений. Температуру поднимали каждый час на 2°C до 42°C, затем её поддерживали постоянной в течение 16 час согласно [9].

Газовая хромато-масс-спектрометрия

повышенное количество суммарного растворимого белка в листьях и семенах. Антиоксидантная активность тканей листа у них возрастала. Анализ прорастания семян рапса с трансгеном *sup11A1* при повышенной (+26°C) температуре выявил отличия между проростками в накоплении биомассы, длине корней и гипокотилей, активности одного из ферментов антиоксидантной системы растений – супероксиддисмутазы [6]. Трансгенные линии отличались от исходных растений и между собой по устойчивости к осмотическому стрессу, индуцированному маннитолом [7]. С помощью газовой хромато-масс-спектрометрии было показано, что экспрессия гетерологичного гена не изменяет общего количества жирных кислот в семенах гомозиготных линий T₂ поколения, однако влияет на содержание некоторых из них. Количество основной жирной кислоты в масле рапса – олеиновой – возрастало на 6% (до 72,67 M%), количество линоленовой уменьшалось на 30-40% (до 3,89 M%) [8].

Целью данной работы было изучение возможных изменений в составе жирных кислот листьев рапса с трансгеном *sup11A1* в норме и в условиях высокотемпературного стресса.

эфиров жирных кислот. Выделение жирных кислот и образование их метиловых эфиров для проведения газо-хроматографических анализов проводили одноэтапно по методике [10].

Определение метиловых эфиров жирных кислот выполняли на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, США) с капиллярной колонкой DB-FFAP (30м×0,25мм×0,25мкм) (J&W Scientific). Хроматографическое разделение происходило в режиме от 150°C до 220°C с градиентом 2°/мин, температура испарителя - 250°C. В качестве газоносителя использовали гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Идентификацию проводили при помощи библиотеки масс-спектров NIST 02 и стандартной смеси метиловых эфиров жирных кислот бактерий (Supelco). В качестве внутреннего стандарта использовали гептадекановую кислоту (C17:0).

Индекс ненасыщенности, характеризующий ненасыщенность жирных кислот в липидах, рассчитывали по формуле:

$$(\sum C_{n:1} + 2\sum C_{n:2} + 3\sum C_{n:3})/100,$$

где $C_{n:l}$ – содержание (весовые %) соответствующих ненасыщенных жирных кислот.

Результаты и обсуждение

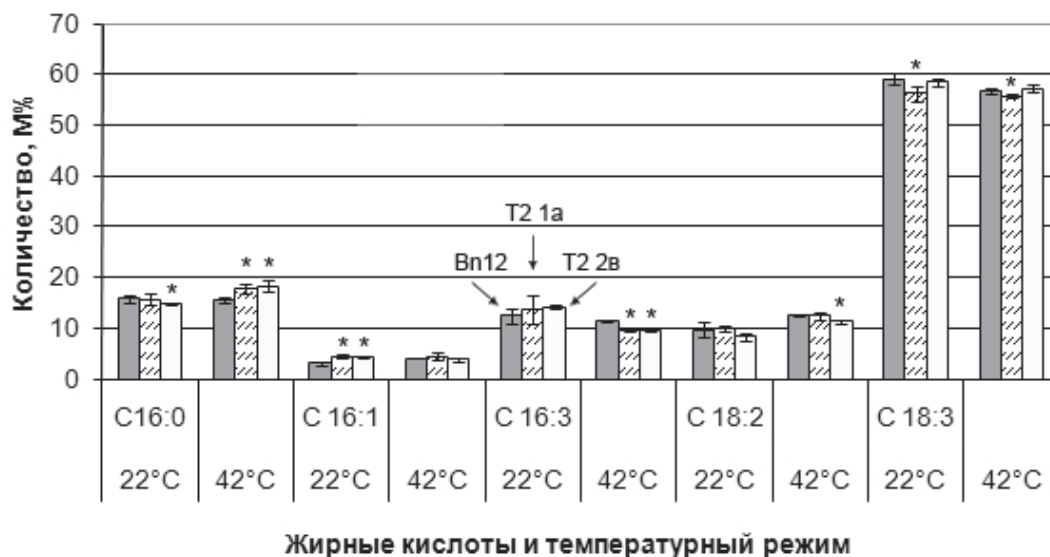
Качественный состав жирных кислот листьев рапса трансгенных растений не отличался от контрольных (рис.1): это (в порядке убывания по количеству) линоленовая (18:3), пальмитиновая (16:0), 7,10,13-гексадекатриеновая (16:3), линолевая (18:2), пальмитолеиновая (16:1).

В условиях без стресса количество линоленовой кислоты в листьях одной из трансгенных линий (Т₂в) не отличалось от контрольной (58,48±1,61 и 59,07±1,04 М%, соответственно) (рис.1). У линии Т₂а оно было на 0,05% достоверно ниже (56,28±1,47). В результате высокотемпературного воздействия содержание линоленовой кислоты у трансгенных линий оставалось без изменений, тогда как у исходной оно снижалось на 2,43 М% (0,04%). Таким образом, отмечены незначительные достоверные различия в количестве линоленовой кислоты в листьях между трансгенными и контрольными расте-

ниями рапса как в нормальных условиях, так и при повышенных температурах.

Не обнаружены различия в количестве пальмитиновой кислоты у исходных и трансгенных растений (рис. 1) в благоприятных условиях выращивания. Однако при высокотемпературном стрессе оно возросло у трансгенных на 12% (линия Т₂а) – 19% (линия Т₂в), что свидетельствует об их лучшей приспособляемости к повышенным температурам [1, 4]. У исходных растений количество пальмитиновой кислоты при повышенной температуре не изменялось.

В условиях без стресса количество пальмитолеиновой кислоты у контрольных растений было ниже, чем у трансгенных на 31%. При стрессе оно возросло до уровня трансгенных растений. У линий Т₂а и Т₂в количество 16:1 кислоты в условиях повышенных температур оставалось неизменным (~4М%).



Жирные кислоты и температурный режим

Рис. 1. Жирнокислотный состав липидов листьев рапса до (22°C) и после (42°C) высокотемпературного стресса: Vn12 – растения исходного сорта Мария, Т₂а и Т₂в – гомозиготные линии второго поколения с трансгеном *sup11A1*, жирные кислоты – пальмитиновая (С16:0), пальмитолеиновая (С16:1), 7,10,13-гексадекатриеновая (С16:3), линолевая (С18:2), линоленовая (С18:3). * – различия достоверны по сравнению с контролем при $P \leq 0,05$

Количество 16:3 кислоты при 22°C не отличалось у исходных и трансгенных растений (~13М%). При высокотемпературном стрессе оно оставалось неизменным у контрольных растений и снижалось у трансгенных на 31-33%. Снижение количества триненасыщенных жирных кислот в липидах листьев является предпосылкой для лучшего противостояния повреждающему действию высоких температур [11].

Содержание линолевой кислоты возросло у растений всех проанализированных линий

при повышенной температуре на ~24%. Не обнаружено различий между контрольными и трансгенными растениями в количестве линолевой кислоты как в условиях стресса, так и без него.

Обнаружено, что у растений рапса с трансгеном *sup11A1* общее количество жирных кислот в листьях достоверно ниже (на ~27%), чем у контрольных при выращивании в условиях климакамеры при 22°C (рис.2, А).

В результате высокотемпературного

стресса количество липидов в листьях контрольных растений снижалось на 33%, в то время как у трансгенных этот показатель оставался без изменений. В условиях повышенных температур превышение количества жирных кислот в листьях рапса с трансгеном *sup11A1* над контрольными составляло 20-25%. Таким образом, высокотемпературный стресс не приводил к изменениям в количестве липидов листьев рапса с трансгеном *sup11A1* и понижал его у исходных растений.

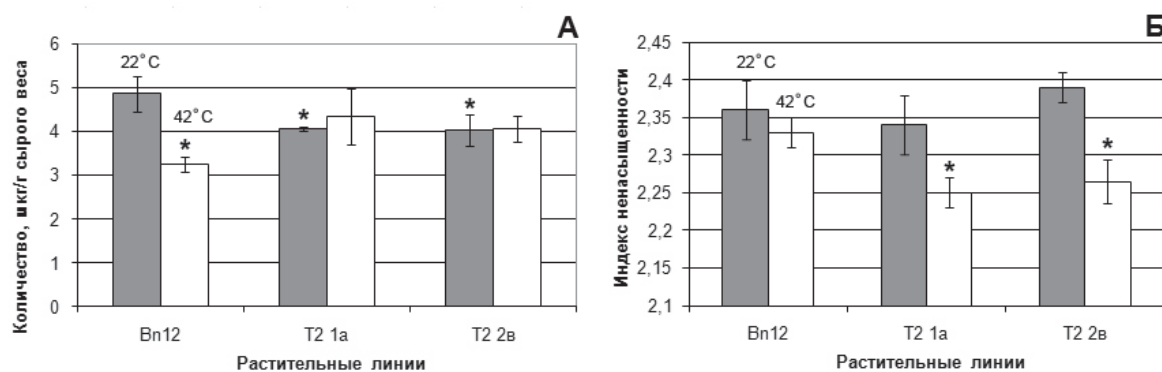


Рис. 2. Общее количество жирных кислот (А) и индекс ненасыщенности мембранных липидов (Б) в листьях растений рапса до (22°C) и после (42°C) высокотемпературного стресса: Вn12 – растения исходного сорта Мария, T₂1a и T₂2v – гомозиготные линии второго поколения с трансгеном *sup11A1*. * – различия достоверны по сравнению с контролем при P ≤ 0,05

Выводы

В результате газо-хроматографического анализа жирных кислот, выделенных из листьев рапса с трансгеном *sup11A1*, показано, что качественный состав жирных кислот не претерпевал изменений в обеих группах растений. В условиях благоприятной температуры (+22°C) не наблюдалось различий между исходными и трансгенными растениями в содержании пальмитиновой, 7,10,13-гексадекатриеновой (16:3), линолевой, линоленовой кислот. Количество пальмитолеиновой кислоты у контрольных растений оказалось на 31% ниже, чем у трансгенных. Индекс ненасыщенности был одинаковым у всех проанализированных растений, а количество жирных кислот у трансгенных растений на ~27% ниже, чем у контрольных.

В результате высокотемпературного (+42°C) стресса у трансгенных растений изменялось содержание пальмитиновой (+19%), 16:3 (-33%) и линолевой (+24%) кислот. Исходные

растения реагировали на высокую температуру увеличением содержания пальмитоолеиновой и линолевой кислот на 31% и 24%, соответственно. Количество липидов листьев рапса с трансгеном *sup11A1* не изменялось, у исходных растений оно снижалось на 33%. Индекс ненасыщенности оставался неизменным у исходных растений и достоверно уменьшался у трансгенных на 0,03 %.

Таким образом, введение трансгена *sup11A1* в растения рапса обеспечивало повышение максимально на 25% содержания жирных кислот в листьях в условиях высокотемпературного стресса и уменьшало индекс ненасыщенности на 0,03%. Увеличение количества насыщенных (16:0) и уменьшение триеновых (16:3) жирных кислот в листьях трансгенных растений создает предпосылки для их большей устойчивости к повышенным температурам по сравнению с исходными растениями.

Литература

1. Murata N., Los D.A. Membrane Fluidity and Temperature Perception // *Plant Physiol.* – 1997. – Vol. 11, №5. – P. 875-879.
2. Zang M., Barg R., Yin M. et al. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct ω -3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cell and plants // *Plant J.* – 2005. – Vol. 44. – P. 361-371.
3. Pearcy R. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of the leaf lipids in *Atriplex lentiformis* (Torr.) Wats. // *Plant Physiology.* – 1978. – Vol. 61. – P. 484-486.
4. Routaboul J.-M., Skidmore C., Wallis J. G., Browse J. Arabidopsis mutants reveal that short- and long-term thermotolerance have different requirements for trienoic fatty acids // *J. Exp. Botan.* – 2012. – Vol. 63, №3. – P. 435-1443.
5. Сахно Л.А., Моргун Б.В., Кваско Е.Ю., Кучук Н.В. Создание трансформированных растений рапса, экспрессирующих ген *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения // *Біотехнологія.* – 2010. – Т.3, №5. – С. 74-82.
6. Сахно Л.А. Особенности прорастания семян растений рапса, экспрессирующих ген *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения // *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів.* – 2011. – Т. 9, №2. – С. 253-259.
7. Трегуб М.С., Сахно Л.А. Особенности роста трансгенных растений рапса с геном *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} в условиях осмотического стресса // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології* (за ред. Кунаха В.А.). – 2012. – Т. 4. – С. 623-628.
8. Sakhno L.O., Ostapchuk A.M., Klochko V.V., Kuchuk M.V. Fatty acid oil composition of canola plants expressing mammalian cytochrome P450_{SCC} *cyp11A1* 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.
9. Gusta L.W., Benning N.T., Wu G. et al. Superoxide dismutase: an all-purpose gene for agri-biotechnology // *Mol. Breeding.* – 2009. – Vol. 24, №2 – P. 103-115.
10. Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues // *Analytical Biochemistry.* – 1993. – Vol. 211. – P. 139-143.
11. Iba K. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2002. – Vol. 53. – P. 225-245.

SAKHNO L.O.¹, SLYVETS M.S.^{1,3}, PETERSON A.A.¹, OSTAPCHUK A.M.², KOROL N.A.², KARBOVSKA N.V.², KUCHUK M.V.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine
Ukraine, DSP-22, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 148
e-mail: sakhno@icbge.org.ua*

²*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine
Ukraine, DSP-22, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str., 154,*

³*National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”
Ukraine, 03056, prospect Peremogy, 37*

FATTY ACID COMPOSITION OF *CYP11A1* CANOLA LEAVES UNDER HEAT SHOCK

Aims. Investigation of *cyp11A1* gene influence on leaf fatty acid composition of canola. **Methods.** Gas chromatography of fatty acid methyl esters. **Results.** Qualitative fatty acid composition of transgenic leaves remained unchanged in comparison with the wild plants. There were no differences between *cyp11A1* and initial canola in 16:0, 16:3, 18:2 and 18:3 acid content under appropriate temperature (+22°C). But palmitoleic acid content was lower by 31% in the control than in transgenic plants. Total lipid content was 27% lower in transgenic plants than in the control ones. Heat shock (+42°C) stress did not lead to the change in total lipids in *cyp11A1* leaves and lowered it in initial plants by 31%. As a result of stress the content of palmitic (+19%), 16:3 (-33%) and linoleic (+24%) acids was changed in transgenic leaves. Initial plants reacted to the high temperature by increasing in palmitoleic (31%) and linoleic (24%) acids. **Conclusions.** The introduction of *cyp11A1* gene in canola nuclear genome affected total lipid content by increasing up 25% and unsaturation index by decreasing 0,03% under heat.

Key words: transgenic canola, *cyp11A1*, gas chromatography, fatty acids

ІДЕНТИФІКАЦІЯ БІЛКОВИХ СПЕКТРІВ ПИВОВАРНИХ СОРТІВ ЯЧМНЮ

Пивоварний ринок країни динамічно розвивається. В Україні зерно з високими пивоварними якостями може формуватися лише в певних областях, де кліматичні умови і ґрунти більш повно відповідають вимогам його вирощування. Це Вінницька, Волинська, Житомирська, Івано-Франківська, Київська, Львівська, Ровенська, Сумська, Тернопільська, Черкаська, Чернівецька і Чернігівська області. Для пивоварного солоду потрібне здорове, однорідне, вирівняне зерно з вмістом білку 9 – 11,5% і здатністю до пророщування 90-95% [8]. Важливими є показники сортової відповідності і чистоти яч-

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були сорти ярого ячменю, отримані від солодових та пивоварних підприємств, сільськогосподарських господарств та приватних підприємців різних областей України. Дані сорти занесені до Державного реєстру. Нами було опрацьовано ряд методів електрофорезу.

Найбільш ефективним підходом виявилась методика Бжезинського [1] – електрофорез в поліакриламідному гелі в присутності сечовини.

Для електрофоретичного аналізу використовували гордеїни 100 довільно вибраних зерен ячменю. Неочищені зернівки подрібнювали, шрот заливали 0,2 мл 70% етанолу. Перемішували металевою паличкою. Через деякий час (2 – 12 годин) центрифугували 4 хвилини при 4000об/хв. Відбирали екстракт білку і ставили на випаровування у термостат, при температурі 30-40° С. Потім заливали розчином 5,5М сечовини пропорційно до об'єму відібраного спиртового екстракту білку (1:1). Пластини заливали поліакриламідними гелями (розділяючим та концентруючим). Компонентний склад поліакриламідних гелів: акриламід, метиленбісакриламід, розчин сірчанокислого заліза, аскорбінова кислота, сечовина, льодяна оцтова кислота. До складу концентруючого гелю, крім вищезазначених речовин, входив гістидин. Каталізаторами виступали ТЕМЕД та 10% розчин персульфату

Результати та обговорення

За допомогою електрофорезу досліджені наступні сорти ячменю, різні за популярністю для виробництва солоду (рис. 1).

меню. Встановлена пряма залежність між сортовою чистотою зерна ячменю і якістю отриманого солоду. Для отримання якісного солоду необхідно використовувати ячмінь із сортовою чистотою не менше 90%. А згідно з вимогами європейських стандартів чистота зерна має бути не нижче 95% [7].

Одним із найпростіших, швидких і відносно дешевих методів контролю сортової чистоти і відповідності зерна ячменю є електрофорез білків. Для проведення електрофоретичного аналізу гордеїнів застосовують більше 20 різних методів електрофорезу і їх модифікацій [2].

Для вирівнювання границі між гелями, на розділяючий гель наносили дистильовану воду. Тривалість електрофоретичного фракціонування гордеїнів була 4 години. Після розділення гелі протягом 10-15 годин фарбували. Склад фарби: Кумасі R – 250-300 мг, етиловий спирт – 70 мл, ацетон – 100 мл, льодяна оцтова кислота – 60 мл, трихлороцтова кислота – 60 г, дистильована вода – до 1 літра. Після фарбування гелі відмивали у воді протягом дня.

Електрофорез водорозчинних білків проводили за методикою ВІР Санкт-Петербург [5] і Поперелі [6].

Для фракціонування альбумінів використовували гель такого складу: акриламід, метиленбісакриламід, ТЕМЕД, гліцин, аскорбінова кислота, розчин семиводного закисного сірчанокислого 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 альбумінів була від 2 до 2,5 годин. Фіксацію і фарбування білків здійснювали у тому ж розчині, що й гордеїнів. Нами був проведений також електрофорез водорозчинних білків зерна ячменю із використанням модифікованої методики Лемлі [3] з додаванням до розчину досліджуванних білків 1М сахарози.

Електрофорез гордеїнів як основний метод лабораторного сортового контролю і відповідності ячменю має певні обмеження. В останній

час на аналіз надходить все більше сортів ячменю, які за електрофоретичними спектрами гордеїнів не відрізняються. Схожі між собою за спектрами гордеїнів такі сорти: Скарлет і Ксанаду;

Джерзей і Беатріс; Шармай, Толар, Ебсон і Барке; Алісіана і Бамбіна; Квенч і Аннабель (рис. 2).

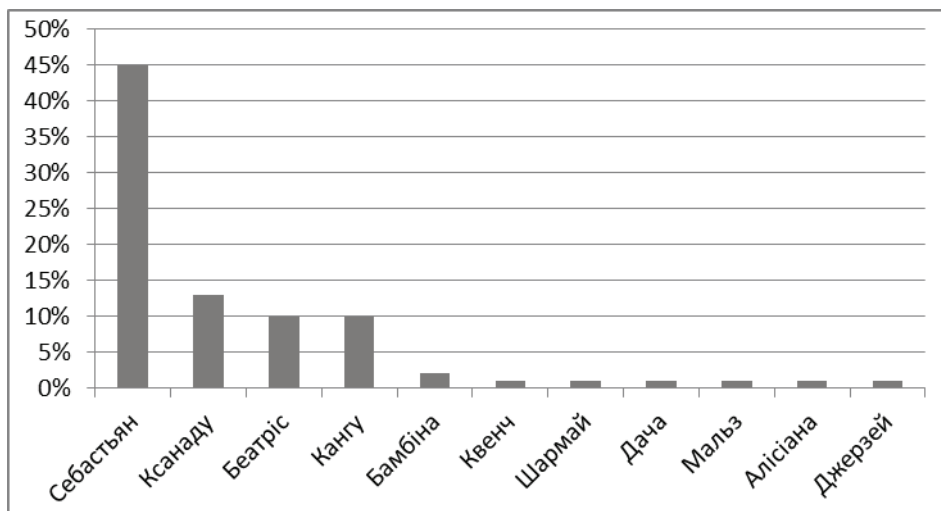


Рис. 1. Використання сортів ячменю при виробництві солоду

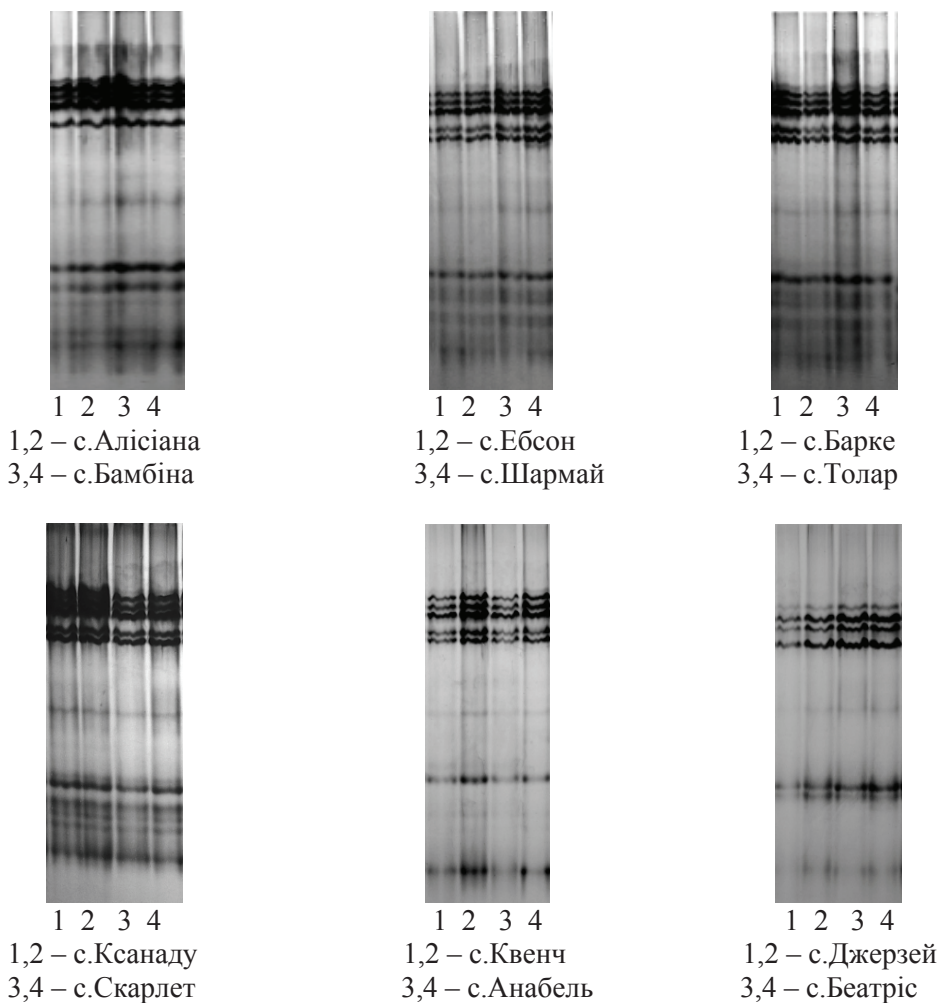


Рис 2. Електрофореграми гордеїнів ячменю

Це є наслідком об'єктивного процесу звуження генетичної різноманітності в результаті селекційної діяльності людини [4]. Для ідентифікації цих сортів треба використовувати додаткові маркери. Сорти схожі за спектрами гордеїнів, легко можна розрізнити провівши електрофорез альбумінів, легкорозчинних білків ендосперму. Електрофоретичні спектри альбумінів представлені на рис.3.

Отримані дані свідчать про ефективність використання електрофорезу білків у якості методу лабораторного контролю у пивоварній промисловості. Цей метод може бути

використаний в аналізах при оцінці сортової чистоти і відповідності зерна ячменю. Модифікована нами методика Бжежинського для визначення спектрів гордеїнів була найбільш ефективною. Для диференціації сортів ячменю з однаковими спектрами гордеїнів потрібно проводити додатковий електрофорез водорозчинних білків. Для цього ми використовували модифіковану методику Поперелі, ВІР та Лемлі. Вказані методики виявились кращими для проведення електрофорезу альбумінів зерна ячменю.

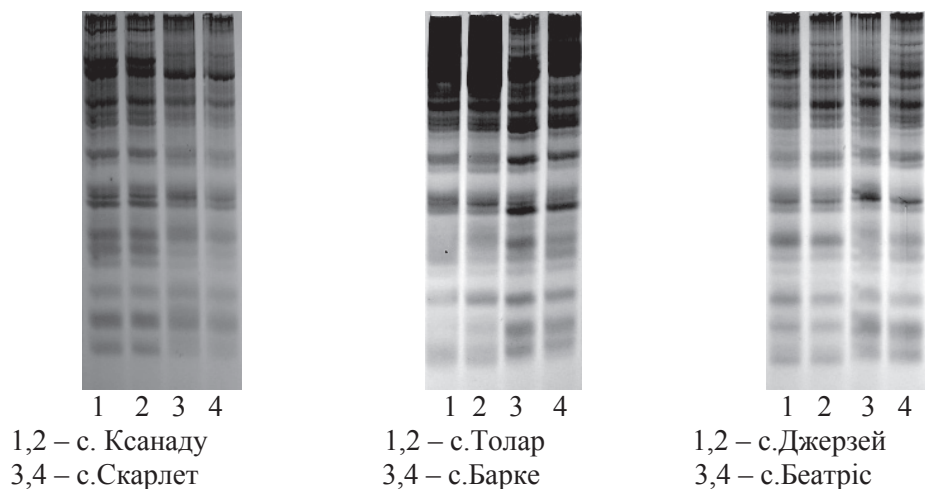


Рис.3. Електрофореграми альбумінів ячменю

Література

1. Brzezinski W., Mendelenski P., Improved PAGA procedure for identification of wheat, triticale, barley and cultivar // XII Eucarpia Congress. – 1989, Gottingen. – P. 28.
2. Cook R.J. Handbook of variety testing. Electrophoresis handbook; variety identification ISTA. – 1992. – P. 25.
3. Laemml V.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Natura*. – 1970. – Vol. 227, №52-59. – P. 680.
4. Алтухов Ю.П., Пухальский В.А., Политов Д.В., Калабушкин Б.А., Упелниек В.П. Динамика популяционных генофондов растений // В кн. Динамика популяций генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. – М.: Наука. – 2004. – С. 295-413.
5. Идентификация, анализ и регистрация сортов, линий и гибридов подсолнечника методом электрофореза гелиантина. Метод. указания / под ред. И.П. Гаврилюк. – Л.: ВИР. – 1988. – 23 с.
6. Попереля Ф.О. Генетична інтерпритація електрофореграм геліантину насіння F₁ соняшника // Цитология и генетика. – 2000. – Т. 34, №2. – С. 84-90.
7. Тарзанов В.А. Качественные аспекты получения пивоваренного ячменя // Мат. III Международ. Конгресса «Зерно и хлеб России». – С.-Петербург, 3–15 ноября, 2007 г. – 2007. – С. 93.
8. Шубенко Н.П. Пиво начинается с солода // *Зерно*. – 2008. – №1. – С. 32-34.

SIRANT L.V., DYKUN M.O., POCHINOK V.M., ZAVALNA G.V.

Institute of Plant Physiology and Genetics

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska st., 31/17, e-mail: luba_va@ukr.net

IDENTIFICATION SPECTRA OF PROTEINS BREWING BARELY VARIETIES

Aim. Diversify barely varieties with similar spectra of hordein. **Methods.** Electrophoresis of storage proteins hordein and electrophoresis of water-soluble proteins albumin. **Results.** Selected modified albumin electro-

phoresis method for the determination of varietal conformity and purity of barely varieties. **Conclusion.** Electrophoresis of proteins is an effective method of laboratory quality control of barely grain.
Key words: barely, hordein, albumin, varietal conformity and purity, electrophoresis.

СТЕПАНЕНКО О.В.^{1,2}, СТЕПАНЕНКО А.І.¹, МОРГУН Б.В.¹

¹ Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua

² Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ *Wx* У ЛІНІЯХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ КОДОМІНАНТНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ

Крохмаль є основною поживною речовиною м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) і міститься він у запасуючих органах зернівки (ендоспермі), де накопичується у вигляді гранул, які складаються з полісахаридів двох типів – розгалуженого амілопектину (70-75%) і лінійної амілози (20-25%) [1].

Головний ферментом біосинтезу амілози є асоційована з гранулами синтаза крохмалю (GBSSI) з молекулярною масою біля 60 кДа, яка має назву *Wx*-протеїн. У геномі м'якої пшениці три гомеологічних гени кодують ізоформи GBSSI ферменту: *Wx-A1*, *Wx-B1* і *Wx-D1*, які розташовані у плечах хромосомах 7AS, 4AL і 7DS відповідно [2].

У кукурудзи, ячменю, рису, вівса, а потім і у пшениці були виявлені мутанти по генах *Wx*, у яких спостерігалось зниження вмісту або повна відсутність амілози [3]. У пшениці кожен з генів *Wx* має кілька алелів: активний алель (а), який кодує синтез білка *Wx*, нуль-алель (в), при якому синтез функціонального білка *Wx* відсутній та функціональні алелі з різною ферментативною активністю білка *Wx*. Пшеницею ваксі *Wx* називають сорти з поєднанням трьох нуль-алелів і відповідно відсутністю амілози у структурі молекули крохмалю. Також існують сорти з кількома нуль-алелями, які мають дещо знижений синтез амілози і називаються частковим ваксі [4].

Таблиця 1. Класифікація ваксі пшениці в залежності від наявності (+) чи відсутності (–) кожного з *Wx*-білків та вмісту амілози в кожному типі [5]

Типи	<i>Wx</i> -протеїни			Вміст амілози (%)
	<i>Wx-A1</i>	<i>Wx-B1</i>	<i>Wx-D1</i>	
Тип 1	+	+	+	28,7
Тип 2	–	+	+	28,5
Тип 3	+	–	+	27,1
Тип 4	+	+	–	28,0
Тип 5	+	–	–	20,3
Тип 6	–	+	–	25,8
Тип 7	–	–	+	22,9
Тип 8	–	–	–	0,9

Для оцінки алельного стану генів *Wx* найбільш надійним способом є молекулярне маркування з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [6-8].

Українськими [9] та російськими [10, 11] вченими в колекціях сортів озимої та ярої пшениці з відповідних країн були знайдені різні

комбінації активних і неактивних алелей *Wx*.

Метою нашої роботи було підібрати молекулярно-генетичні методики виявлення кодомінантних молекулярних маркерів та охарактеризувати алельний стан генів *Wx* селекційних ліній м'якої озимої пшениці *Wx-1* та *Wx-6*.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували лінії Wx-1, Wx-6 та сорти м'якої пшениці Фаворитка, Ятрань 60 та Смуглянка надані Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України.

ДНК виділяли з 5-ти насінин кожного зразку ЦТАБ методом [12] і розчиняли у ТЕ буфері рН 8,0. Чистоту та концентрацію препарату ДНК вимірювали на спектрофотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v. 1.35.

Для полімеразної ланцюгової реакції у 20 мкл реакційної суміші використовували специфічні праймери (Таблиця 2), 30-100 нг загальної очищеної рослинної ДНК, 0,5 од. DreamTaq™ полімерази (Thermo Scientific).

Реакцію проводили в ампліфікаторі Mastercycler Personal (Eppendorf) за специфічними програмами.

Таблиця 2. Перелік праймерів, які використовуються у дослідженнях та очікуваних продуктів ампліфікації

Назва праймеру	Послідовність, посилання, додаткові умови	Розмір амплікону, п.н., алель	Ген
Wx-A1F Wx-A1R	5' - CCCCAAAGCA AAGCAGGAAA C - 3' 5' - CGGCGTTCGGG TCCATAGATC - 3' [13] +HindIII, 1 година, 37°C	495 + 176, Wx-A1a 652, Wx-A1b	<i>Wx-A1</i>
BDFL BRC1 BFC BRC2	5' - CTGGCCTGCT ACCTCAAGAG CAACT - 3' 5' - GGTTGCGGTT GGGGTTCGATG AC - 3' 5' - CGTAGTAAGG TGCAAAAAAG TGCCACG - 3' 5' - ACAGCCTTAT TGTACCAAGA CCCATGTGTG - 3' [14, 15]	778, Wx-B1a 668, Wx-B1b 804, Wx-B1e	<i>Wx-B1</i>
Wx-D1F Wx-D1R	5' - GCCGACGTGA AGAAGGTGGT G - 3' 5' - CCCCTTGCGT CATTTGTTGT GT - 3' [16]	930, Wx-D1a 342, Wx-D1b	<i>Wx-D1</i>

Програма ампліфікації на ген *Wx-A1*: початкова денатурація 3 хв при 94°C, 34 цикли – 30 с. при 94°C, 30 с. при температурі відпалу праймерів – 57°C, 40 с. при 72°C та 10 хв фінальна елонгація.

Програма ампліфікації з використанням методики Touchdown на ген *Wx-B1*: початкова денатурація 3 хв при 94°C, 6 циклів – 30 с при 94°C, 1 хв при температурі вищій за температуру відпалу праймерів – 69°C і з кожним циклом температура зменшується на 1°C, 2 хв при 72°C та ще 24 циклів – 30 с при 94°C, 1 хв при температурі відпалу праймерів – 59°C, 2 хв при 72°C та 10 хв фінальна елонгація.

Програма ампліфікації з використанням

Результати та обговорення

Скринінг рослинного матеріалу для визначення алельного стану гена *Wx-A1* проводили за допомогою молекулярного маркеру, запропонованого Vanzetti і співавт. [13]. Після проведення ПЛР з даним молекулярним маркером розмір амплікон у

методики Touchdown на ген *Wx-D1*: початкова денатурація 3 хв при 94°C, 9 циклів – 30 с при 94°C, 30 с при температурі вищій за температуру відпалу праймерів – 67°C і з кожним циклом температура зменшується на 1°C, 1 хв при 72°C та ще 25 циклів – 30 с при 94°C, 30 с при температурі відпалу праймерів – 57°C, 1 хв при 72°C та 10 хв фінальна елонгація.

Розділення продуктів ампліфікації проводили методом горизонтального електрофорезу у 1,2% агарозному гелі, натрій боратному буфері з 0,5 мг/мл бромистого етидію [17]. Електрофореграми документували системою Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad).

алеля дикого типу і нуль-алеля відрізнявся незначно, тому для кращої візуалізації після ампліфікації проводився гідроліз ПЛР-продукту ендонуклеазою рестрикції HindIII.

Результати типової ампліфікації на ген *Wx-A1* наведені на рис. 1.

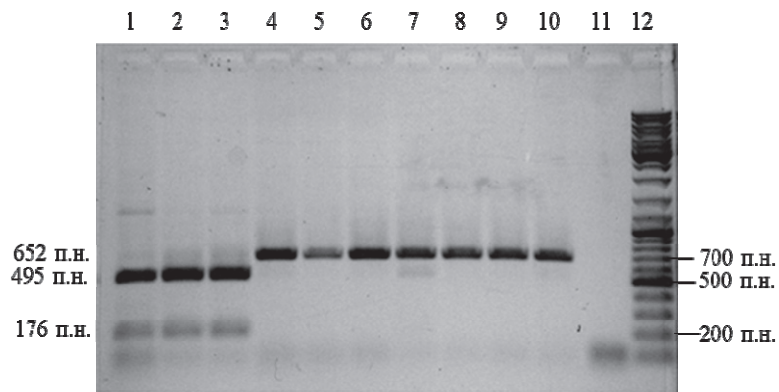


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації на ген *Wx-A1*:
 1 – Фаворитка; 2 – Ятрань 60; 3 – Смуглянка; 4-7 –чотири зразки лінії *Wx-1*; 8-10 – три зразки лінії *Wx-6*; 11 – негативний контроль ТЕ буфер; 12 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Було визначено, що усі зразки ліній *Wx-1* та *Wx-6* містили нуль-алель. Сорти пшениці Фаворитка, Ятрань 60 та Смуглянка містили алелі дикого типу гену *Wx-A1*.

Для аналізу локусу *Wx-B1* використовували кодомінантні маркери запропоновані Saito зі співавт. [14]. При його використанні в ПЛР ампліфікуються фрагменти довжиною 668 п.н. при наявності нуль-алеля і 778 п.н. при наявності алеля дикого типу гену *Wx-B1*. Розмір продукту ампліфікації у зразка,

який несе алель *Wx-B1e*, складає 804 п.н. [15].

Результати типової ампліфікації на ген *Wx-B1* наведені на рис. 2.

Було виявлено, що три зразки лінії *Wx-1* та два зразки лінії *Wx-6* містили нуль-алель і нуль-алель, і алель дикого типу. Сорти пшениці Фаворитка, Ятрань 60 та Смуглянка містили алелі дикого типу гену *Wx-B1*. Функціональний алель *Wx-B1e* не було виявлено в досліджуваних зразках.

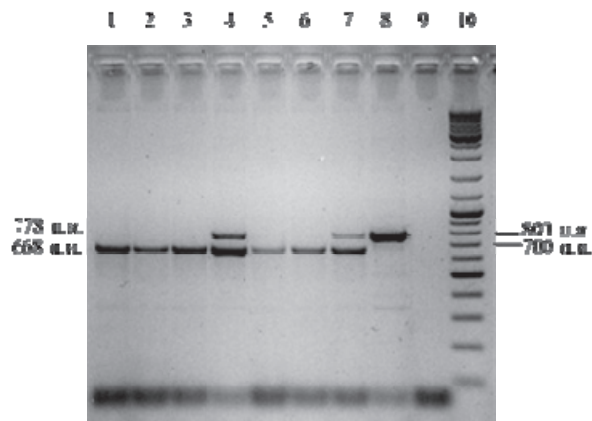


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації на ген *Wx-B1*:
 1-4 – чотири зразки лінії *Wx-1*; 5-7 – три зразки лінії *Wx-6*; 8 – Фаворитка; 9 – негативний контроль ТЕ буфер; 10 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Для визначення алельного стану гена *Wx-D1* використовували підхід запропонований Vrinten і співав. [16]. Було показано, що усі лінії досліджуваних зразків несли нуль-алелі *Wx-D1b*,

а сорти пшениці *Wx-D1a* – алелі дикого типу.

Результати типової ампліфікації на ген *Wx-D1* наведені на рис. 3.

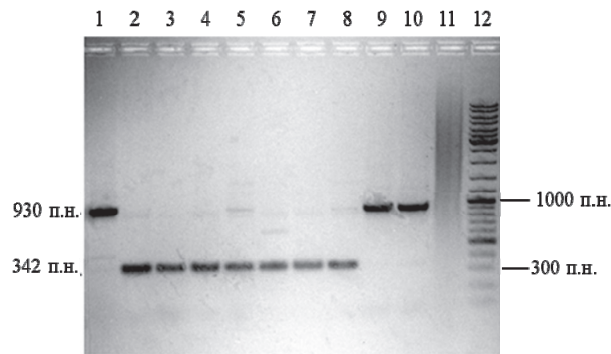


Рис. 3. Электрофореграма продуктів ампліфікації на ген *Wx-D1*:
 1 – Фаворитка; 2-5 – чотири зразки лінії *Wx-1*; 6-8 – три зразки лінії *Wx-6*; 9 – Ятрань 60; 10 – Смуглянка; 11 – негативний контроль ТЕ буфер; 12 – маркер молекулярної маси GeneRuler™ DNA Ladder Mix

Висновки

Було відпрацьовано методики виявлення кодомінантних ДНК маркерів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Серед розглянутих зразків озимої пшениці ліній *Wx-1* та *Wx-6* були виявлені гомозиготні рослини, які несуть нуль-алелі генів *Wx-A1*, *Wx-D1* і *Wx-B1*, та гетерозиготні за геном *Wx-B1*.

Отримана в даній роботі інформація щодо алельного стану генів *Wx* дозволить направити

та інтенсифікувати процес селекції м'якої озимої пшениці на сучасному рівні у напрямку отримання сортів з модифікованим складом крохмалю.

Висловлюємо сердечну подяку доктору біологічних наук Рибалці О.І. за науковий супровід. Роботу фінансовано в рамках проекту №П-2-12 Національної академії наук України, за що автори відверто вдячні.

Література

- James M., Denyer K. et al. Starch synthesis in the cereal endosperm // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2003. – Vol. 6. – P. 215–222.
- Chao S., Sharp P. et al. RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes // *Teor. Appl. Genet.* – 1989. – Vol. 78. – P. 495–504.
- Graybosh R.A. Waxy wheats: origin, properties and prospects // *Trends Food Sci. Technol.* – 1998. – Vol. 9. – P. 135–142.
- Rodriguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats // *Plant Breeding.* – 1998. – Vol. 117. – P. 341–344.
- Saito M., Vrinten P., Nakamura T. DNA markers for identifying waxy mutations and improving noodle quality in Wheat // *JARQ.* – 2010. – Vol. 44, №2. – P. 109–115.
- Briney A., Wilson R., Potter R.H. et al. A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat // *Mol. Breeding.* – 1998. – Vol. 4. – P. 427–433.
- Boggini G., Cattaneo M., Paganoni C., Vaccino P. Genetic variation for waxy proteins and starch properties in Italian wheat germplasm // *Euphytica.* – 2001. – Vol. 119. – P. 113–116.
- Dong Y., Zhao X., Wang J., Yuan G., Zhang X. Improvement for agronomic traits of partial waxy wheat by combination of backcrossing with a PCR-based DNA marker // *Journal of Genetics and Genomics.* – 2007. – Vol. 34. – P. 836–841.
- Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Идентификация *Wx* генотипов среди сортов озимой мягкой пшеницы // *Цитология и генетика.* – 2007. – №6. – С. 11–17.
- Климушина М.В., Гладких Н.И., Дивашук М.Г., Беспалова Л.А., Васильев А.В., Карлов Г.И. Распределение аллелей генів *Wx* в коллекции мягкой пшеницы Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2012. – Т. 16, №1. – С. 187–192.
- Абдулина И.Р., Вафин Р.Р., Ржанова И.В., Гараева А.Л., Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д.Ф., Василова Н.З., Зайнуллин Л.И., Алимова Ф.К. Молекулярная идентификация генотипов яровой пшеницы по аллельным вариантам *Wx*-генов // *Фундаментальные исследования.* – 2013. – №1. – С. 13–17.
- Somma M. Extraction and purification of DNA. Session 4. In: Training Course on the Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms / User Manual. Edited by M. Querci, M. Jermini, G. Van den Eede. European Commission, DJ Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection. Luxembourg. – 2006. – P. 229.

13. Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez -Quijano M. et al. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm // *Electronic J. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 12. – P. 1–9.
14. Saito M., Vrinten P., Ishikawa G. et al. A novel codominant marker for selection of the null Wx-B1 allele in wheat breeding programs // *Mol. Breeding.* – 2009. – Vol. 23. – P. 209–217.
15. Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля Wx-B1 мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // *Генетика.* – 2011. – Т. 47, №12. – С. 1611–1615.
16. Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat // *Mol. General Genet.* – 1999. – Vol. 261. – P. 463–471.
17. Brody, J.R., Kern, S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 2004. – Vol. 333. – P. 1–13.

STEPANENKO O.V.^{1,2}, STEPANENKO A.I.¹, MORGUN B.V.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 03680, Kyiv, 148 Akademika Zabolotnoho St., e-mail: molgen@icbge.org.ua*

²*National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"*

MOLECULAR GENETIC METHODS FOR IDENTIFICATION OF ALLELIC VARIANTS OF Wx GENES IN SOFT WHEAT LINES BY CODOMINANT MOLECULAR MARKERS

Aims. Starch texture is one of the important factors in the quality of wheat products. Thus, it is important to control the amylose content in starch. There are three genes controlling the synthesis of amylose: *Wx-A1*, *Wx-B1* and *Wx-D1*. Each gene can occur in several allelic variants: active allele (a) encoding the protein synthesis Wx, null allele (b) in which the synthesis of a functional protein is absent, and functional Wx alleles with different enzymatic activity of protein GBSSI. **Methods.** The most reliable way to assess the allelic state of *Wx* genes is molecular marking using polymerase chain reaction. **Results.** Among the studied wheat lines Wx-1 and Wx-6 by codominant molecular markers there were identified homozygous plants carrying null alleles of *Wx-A1*, *Wx-D1*, *Wx-B1*, and heterozygous plants for *Wx-B1*. **Conclusions.** Homozygous and heterozygous allelic states of the *Wx* wheat genes were distinguished and can be effectively involved in the breeding process.

Key words: *Triticum aestivum* L., PCR, DNA marker, marker-assisted selection.

СТОЛЕПЧЕНКО В.А.², ВАСЬКО П.П.², КОНДРАЦКАЯ И.П.¹, ФОМЕНКО Т.И.¹

¹*ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» Беларусь, ²РУП «Научно-практический центра НАН Беларуси по земледелию»*

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ СОЗДАНИЯ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ЛИСОХВОСТА

Ведущая роль в создании устойчивой кормовой базы в Республике Беларусь принадлежит многолетним травам на пашне, сенокосах и пастбищах. Среди злаковых трав основную долю в травосмеси занимают сорта райграса пастбищного, лисохвоста лугового и фестулолиума, которые характеризуются интенсивным отрастанием и высоким качеством корма с содержанием обменной энергии 11-11,5 МДж/кг сухого вещества и сырого протеина на уровне 18-20% [1]. Основные направления селекции многолетних злаковых трав направлены на создание генотипов с хорошей отрастаемостью и стабильностью урожая; высокой устойчивостью к основным болезням, зимостойкостью, теневы-

носливостью; хорошей конкурентной способностью в многокомпонентных травостоях; а также стабильной семенной продуктивностью. Объединение хозяйственно-полезных признаков в межвидовом гибриде позволит сформировать сорто-популяцию с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью. Впервые предпринимается попытка разработать геномную технологию селекции лисохвоста лугового на основе дупликации генома, интрогрессивной гибридизации с использованием ДНК-маркирования с целью целенаправленно преобразования генома, расширения генофонда исходного материала и повышения эффективности селекции.

Материалы и методы

Объектом исследования служили родительские и гибридные формы лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis* L.) и лисохвоста вздутого (*Alopecurus ventricorus* Pers.). Для повышения фертильности гибридов при скрещивании переводят стерильные гибриды на тетраплоидный уровень, обрабатывая их колхицином. Полиплоидия способствует закреплению гетерозиса не только в первом, но и в последующих поколениях. Использовали селекционно-генетические методы, позволяющие преодолеть как постгамную, так и прогамную несовместимость [2].

Результаты и обсуждение

При создании межвидовых гибридов в качестве материнской формы использовались растения лисохвоста лугового Рассвет, Rg-782, Brudzynska, Криничный, Puszavan, 4-RA местный, Донской 20, Pioret, Обский в качестве отцовской – лисохвост вздутый Довский. Проведено семь комбинаций скрещиваний с использованием фитотронно-тепличного комплекса и в полевых условиях. В фазу полного вымётывания была проведена изоляция растений лисохвоста, затем в период цветения (12 апреля в фитотронно-тепличном комплексе и с 15 мая в поле) под изоляторами было проведено опыление. На 14-17 день после опыления срезанные султаны перемещены в лабораторные условия, где из них было произведено извлечение 332 штук зерновок (табл. 1).

При скрещивании близкородственных видов для преодоления постгамной несовместимо-

Общие белки из семян гибридных растений лисохвоста экстрагировали буфером для растворения белка pH 6,8 из расчета 150 мл буфера на одну зерновку. Для разделения общих белков использовали 12%-ный полиакриламидный гель с SDS по Лаэмли. Разделение белка вели в течение 3 часов, при величине тока 30 мА на одну пластину. Гели фотографировали на цифровой камере, интенсивность зон и величины молекулярных масс оценивали с помощью специализированного программного обеспечения для ПЭВМ.

сти, выражающейся в атрофии эндосперма, применяется метод извлечения зародыша и его выращивания на искусственных питательных средах. Оптимальный срок извлечения зародыша из материнских тканей зависит от его состояния и степени дифференциации и переносится на питательную среду до начала дегенерации завязи и зародыша. Для увеличения выхода гибридов был использован метод эмбриокультуры *in vitro*. При скрещивании гибридные зародыши выделяют на 17-18 день после оплодотворения. Зародыши вычлняют из завязи в асептических условиях препаровальной иглой под микроскопом и помещают в колбу на питательную агаровую среду. Колбы с зародышами в течение 2 суток инкубируют в темноте. Через 4-6 недель в период образования двух-трех настоящих листьев и нормально развитых корней растения высаживают в сосуды с почвой.

Таблица 1. Результативность создания межвидовых гибридов лисохвоста лугового с лисохвостом вздутым

	Комбинации Скрещивания	Извлечено зерновок		Высажено зародышей		Получено растений	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
Результаты проведения гибридизации в ФТК							
	Лт—3	25	49,0	13	41,9	2	20,0
	Лт—11	15	29,4	9	29,0	3	30,0
	Лт—31	11	21,6	9	29,0	5	50,0
		51		31		10	
Результаты проведения гибридизации в полевых условиях							
	Лк—2	18	6,7	15	9,8	2	6,1
	Лк—3	44	16,2	8	5,2	1	3,0
	Лк—5	37	13,7	30	19,6	15	45,4
	Лк—7	19	7,0	17	11,1	2	6,1
	Лк—9	75	27,7	28	18,3	4	12,1
	Лк—11	63	23,2	43	28,1	5	15,2
	Лк—31	15	5,5	12	7,9	4	12,1
		271		153		33	

На регенерационную питательную среду МС было высажено 184 штук зародышей, из которых 76,7% погибло. Доращивание зародышей было проведено в стерильных условиях в термостатах при температуре 24⁰С до появления проростков, после чего пробирки были переставлены в световую культуральную комнату с режимом 16-ти часового фотопериода с освещенностью 8000 люкс и температурой 20-22⁰С. В результате проведения биотехнологических работ из 92 зародышей, выращиваемых на агарной среде Р-8, в искусственную среду было пересажено 17 зеленых растений. Растения лисохвоста, у которых наблюдалось 2-3 побега, были высажены во второй декаде сентября ширококорядно в полевых условиях для прохождения яровизации. После перезимовки сохранилось 15 растений; процент гибели растений составил 11%, в который вошло два слабо развитых растения.

Полученные гибридные растения лисохвоста, срезанные на высоте 7-8 см, в количестве 43 штук были пересажены в сентябре 2012 года для прохождения яровизации в естественных условиях. У растений насчитывалось 4-5 вегетативных побегов. Формирование генеративных побегов и цветение происходит на втором году жизни. В полевых условиях проведены наблюдения за растениями лисохвоста второго года жизни (регенеранты F₁), полученными гибридизацией лисохвоста лугового и лисохвоста вздутого. Растения были получены при проведении трех комбинации скрещиваний. Первая комбинация скрещивания – материнская форма лисохвост луговой Донской 20 и отцовская форма лисохвоста вздутого Довский. Вторая комбинация скрещивания – материнская форма лисохвоста лугового Pioret и отцовская форма лисохвоста вздутого Довский. Третья комбинация скрещивания - материнская форма лисохвоста лугового Обский и отцовская форма лисохвоста вздутого Довский.

В процессе вегетационного периода текущего года при структурном анализе учитывались количественные и качественные показатели по основным признакам кормовой и семенной продуктивности. У гибридных растений наблюдаются различия по длине и ширине листовой пластинки, также по массе одного побега. Отме-

чено отсутствие поражений на листьях в двух комбинациях скрещиваний и наличие пятнистостей во второй популяции. Наблюдения в первых числах сентября за развитием растений показывают, что среднесуточные приросты у растений лисохвоста после проведения подкоса составляют 1,0-3,2 см/сутки при значительном количестве побегов. Характеристика гибридных растений лисохвоста поколения F₁ представлены в таблице 2.

Содержание общего белка определяли с трехкратной повторностью из листьев гибридных растений лисохвоста и родительских форм в трех укосах. Содержание растворимых углеводов определяли с четырехкратной повторностью. Как видно из рисунка 1 гибридные растения 3/1, 3/2 и 3/3 отмечены наибольшим содержанием белка, а гибридное растение 1/3 наименьшим. В целом по содержанию белка гибридные растения лисохвоста имеют схожие показания. По содержанию растворимых углеводов у гибридных растений наблюдаются существенные отличия. У гибридных растений 3/1,3/2, 3/3, у трех материнских форм и одной отцовской форме содержание растворимых углеводов почти в два- три раза больше, чем у гибридного растения 1/1 – 2/3.

Проведен биохимический анализ гибридных растений лисохвоста по электрофоретическим спектрам общих растворимых белков. Идентификация маркерных белков проводилась на основе разработанных методик разделения общих белков гибридов райграсов и гибридных растений овсяницы луговой на овсяницу тростниковую [3, 4]. Оценена внутригибридная изменчивость по общим белкам семян у гибридных растений F₁. В результате анализа электрофоретических спектров общих белков семян установлено, что основная часть полипептидов у гибридов растений лисохвоста и их родительских форм расположена в диапазоне молекулярных масс от 116,0 до 10,0 кДа. Спектры значительно изменчивы и имеют компоненты, распределение и уровень экспрессии которых индивидуально практически для каждого образца (рис. 2).

Таблица 2. Характеристика гибридных растений лисохвоста поколения F₁

№ п / п	Сортообразец	Кол-во побегов шт./раст. (май)	Зеленая масса, г/растение	К-во побегов, шт./раст (сентябрь)	Масса одного побега, г	Ширина листа, мм	Длина листа, см	Семенная продуктивность, г/5 побегов	Диаметр куста, см	Сухое вещество, %
1	1/1	22	40,34	101	0,399	8-10	20,5-31,0	1,22	20	23,5
2	1/2	20	43,22	114	0,379	4,0-5,0	19,0-22,5	1,09	11	24,8
3	1/3	26	80,70	199	0,406	5,0-6,0	19,0-27,1	2,25	25	23,3
4	1/4	32	81,52	257	0,317	7,0-9,0	22,1-27,3	2,5	21	20,0
5	1/5	30	79,90	123	0,650	6,1-9,0	24,0-29,3	2,45	17	20,6
6	1/6	35	162,70	235	0,692	6,1-8,2	25,1-30,2	3,19	26	20,6
7	1/7	7	3,20	7	0,533	6,0-8,0	17,3-23,5	-	5	21,1
8	1/8	40	133,02	226	0,589	7,5-7,6	23,2-27,0	2,44	30	19,1
9	1/9	50	106,82	301	0,355	5,0-5,5	15,2-17,3	3,55	29	18,4
10	2/1	40	93,10	240	0,388	5,0-6,0	18,5-31,0	1,09	14	20,6
11	2/2	31	89,92	276	0,326	3,5-4,5	8,1-21,3	0,05	18	21,9
12	2/3	3	4,76	54	0,088	2,0-2,5	8,2-12,0	0,06	9	21,4
13	3/1	19	99,88	98	1,019	9,0-9,2	30,0-33,0	1,38	17	21,8
14	3/2	16	80,42	95	0,847	10-1,0	22,1-27,6	-	22	21,1
15	3/3	21	90,72	114	0,796	6,1-7,2	28,2-29,3	0,68	19	20,7
16	1	♀	81,26	170	0,48	9,0	15,0-25,7	2,08	23	21,3
17	2	♀	62,6	190	0,467	5,5	14,1-21,4	0,4	20	21,3
18	3	♀	90,34	102	0,800	9,0	18,0-29,6	0,69	15	21,2
19	4	♂	87,31	150	0,544	8,6	17,2-25,4	1,05	25	22,3

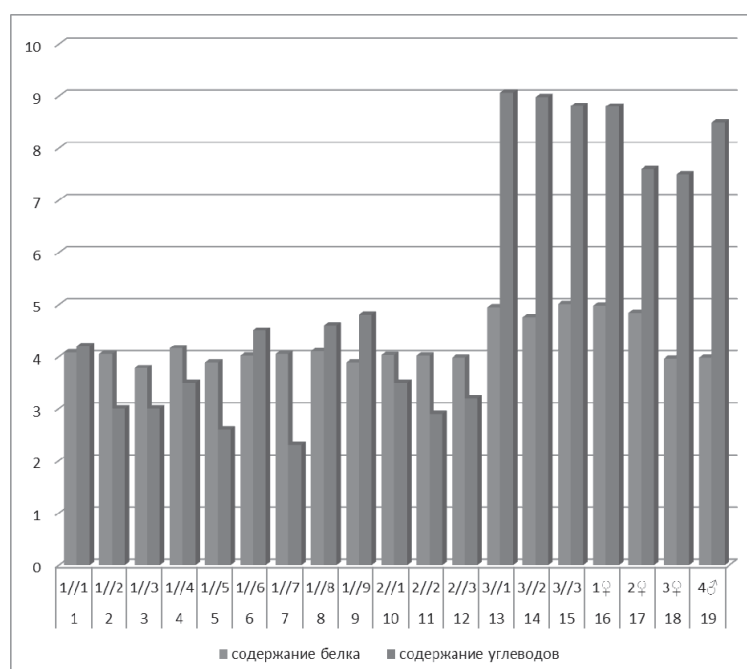


Рис. 1. Количественное определение общего белка и растворимых углеводов в листьях гибридных растений лисохвоста и родительских форм

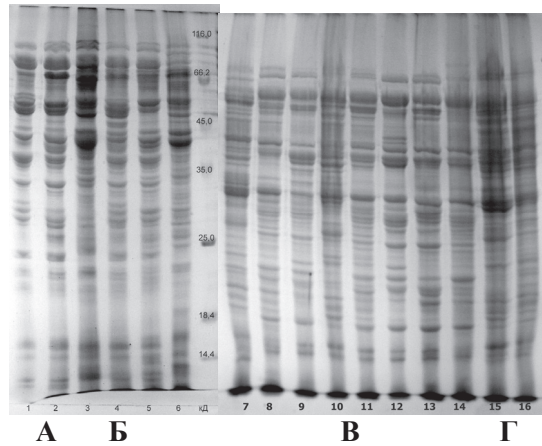


Рис. 2. Электрофоретическое разделение общих растворимых белков из семян гибридных растений лисохвоста: А (1-2) третья комбинация скрещивания; Б (3-5) материнские формы лисохвоста лугового Донской 20, Piolet, Обский, (6) – отцовская форма лисохвоста вздутого Довский; В (7-14) – первая комбинация скрещивания; Г (15-16) – вторая комбинация скрещивания

Для количественной оценки уровня изменчивости, использовались коэффициенты сходства, вычисляемые по форме: $K = [N_1 / (N_1 + N_2)] \times 100\%$, где N_1 – число пар гомологичных белковых компонентов; N_2 – число различающихся белковых компонентов. Средний коэффициент сходства ($K_{ср}$) характеризует ее изменчивость – чем меньше значение коэффициента, тем выше изменчивость. Вычисления проводились для каждой пары в трех комбинациях скрещиваний и полному электрофоретическому спектру общих растворимых белков. Сравнение внутригибридной изменчивости в трех комбинациях скрещиваний показало, что самая высокая является у растений первой комбинации скрещивания, для которых среднее значение коэффициентов сходства составляет 47-65%. Низкая изменчивость наблюдается во второй комбинации скрещивания – 86%. Достаточно изменчивыми по значениям коэффициента сходства являются третья

комбинация скрещивания – 74%.

Выводы. Результатом проведенной работы явилось создание межвидовых гибридов лисохвоста лугового (*A. pratensis*) с лисохвостом вздутым (*A. ventricorus*). Дана характеристика гибридным растениям по семенной и кормовой продуктивности, по содержанию общего белка и растворимых углеводов. Выявлена изменчивость полипептидных спектров общих белков между гибридными растениями, подтвержденная коэффициентом сходства. Отдельные гибридные растения лисохвоста имеют свои специфические белковые компоненты, что позволяет дифференцировать внутригибридную изменчивость. Комплексная оценка созданных форм межвидовых гибридов *A. pratensis* с лисохвостом вздутым *A. ventricorus* на анализирующих фонах позволила провести отбор морфотипов с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью.

Литература

1. Васько П.П. Продуктивность многолетних злаковых трав и пути ее повышения // Земледелие и растениеводство: Научные труды. – Минск: Белорусский научно-исследовательский институт земледелия и кормов. – 2000. – Вып. 37. – С. 113-119.
2. Шишлова А.М. Создание дигамплоидов зерновых культур и их использование в селекции / М. П. Шишлов и др // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2007. – №2. – С. 49-58.
3. Кондрацкая, И.П., Столепченко В.А., Фоменко Т.И. Биохимическая характеристика межродовых гибридов райграса пастбищного и овсяницы луговой // «Проблемы и пути повышения эффективности растениеводства в Беларуси»: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию образования Института земледелия. – Минск. – 2007. – С. 124-127.
4. Столепченко В.А., Кондрацкая И.П., Шишлова А.М., Васько П.П., Фоменко Т.И., Козловская З.Г. Полиморфизм хозяйственно-ценных признаков и свойств отдаленных гибридов овсяницы луговой (*Festuca pratensis*) и овсяницы тростниковой (*Festuca arundinaceae*) // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: материалы III Междунар. науч. конф., посвящ. 50-летию отдела биохим. и биотехнол. растений, Минск, 14-16 мая 2008 г. / редкол.: В.И. Решетников [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008. – С. 177-182.

STOLEPCHENKO V.A.², VASKO P.P.², KONDRATSKAYA I.P.¹, FOMENKO T.I.¹

¹ Central Botanical Garden of NAS of Belarus,

² SPS of Agriculture of NAS of Belarus,

Belarus, 220012, Minsk, str. Surganova, 2v, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO SELECTING OF CREATION OF ALOPECURUS INTERSPECIFIC HYBRIDS

Aims. The first attempt to work out genomic technology selection *Alopecurus platensis* L. was made with the purposeful aim to convert genome and to expand gene pool of initial material and increase efficiency of selection. **Methods.** The subject of exploring were parental and hybrid forms *A. platensis* and *A. ventricosus* Pers. **Results.** Hybrid plants were characterized by seed and feed efficiency, by content of total protein and soluble carbohydrates. A variability polypeptide spectrum of total proteins was detected among hybrid plants confirmed by coefficient of similarity.

Key words: *Alopecurus*, hybrid plants, selection, protein.

УРБАНОВИЧ О.Ю.,¹ КУЗМИЦКАЯ П.В.,¹ КОЗЛОВСКАЯ З.А.,² АНОШЕНКО Б.Ю.³

¹ ГНУ "Институт генетики и цитологии НАН Беларуси"

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, Академическая, 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by

² РУП "Институт плодородства"

Республика Беларусь, 223013, Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

³ ЦБС НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

ГОМОЛОГ ГЕНОВ *HcrVf* СЕМЬИ ЯБЛОНИ ИЗ ГЕНОМА ГРУШИ

Парша груши является опасным заболеванием этой культуры. Оно вызывается грибными патогенами рода *Venturia*. Сорты груши могут поражаться двумя видами *Venturia*. Уссурийская груша (*P. ussuriensis* Maxim.), груша Бретшнейдера (*P. bretschnideri* Rehd.) и груша грушелистная (японская) (*P. pyrifolia* Naka) восприимчивы к *V. nashicola*, а европейская груша (*P. communis* L.) – к *V. pirina* Aderh. [1, 2].

На пораженных паршой плодах и листьях возникают темные бархатистые пятна, при сильном поражении дерева его плоды трескаются, а листья осыпаются. Помимо этого, пораженные деревья менее морозостойки. По данным разных авторов, потери урожая груши от парши могут составлять от 50 до 70%.

Большинство возделываемых в Европе сортов груши являются в той или иной степени восприимчивыми к парше [3]. Поэтому в селекции груши приоритетным становится направление по созданию высокопродуктивных сортов, имеющих генетическую устойчивость к парше в сочетании с хорошим качеством плодов [4]. С этой целью ведется направленный поиск аллельных форм генов, обеспечивающих такую устойчивость, с целью последующего их внедрения в геномы вновь создаваемых сортов.

На сегодняшний день число известных генов груши, отвечающих за устойчивость к парше, невелико. Исследование межвидовых гибридов

груши позволило идентифицировать ген *Vn*, обеспечивающий устойчивость к *V. nashicola* [5]. В геноме японской груши сорта Kinchaku обнаружен ген *Vnk*, [6]. Он также обеспечивает устойчивость к *V. nashicola*. как и ген *Rvn2*, картированный в геноме сорта европейской груши Bartlett [7]. Идентифицированный позже у сорта европейской груши Navaга ген *Rvp1* определяет устойчивость к виду к *V. pirina* [3]. В геноме груши обнаружено также два больших QTL локуса на 3 и 7 хромосомах, ассоциированные с устойчивостью к *V. pirina* [8].

О генах яблони, обеспечивающих устойчивость к парше, известно больше [9, 10]. Клонированы и описаны гены-гомологи, получившие название *HcrVf* [11, 12]. Один из этих гомологов является функционально активным и ассоциирован с устойчивостью яблони к парше [13]. Геном груши и яблони имеет много общего в структуре и организации. [14, 15]. Их нуклеотидные последовательности идентичны на 96.35% [16]. Существует высокая вероятность, что геном груши также содержит гены устойчивости к парше, гомологичные *HcrVf* генам яблони, которые могут обладать функциональной активностью. В связи с этим, целью данного исследования являлось выделение из генома устойчивого к парше сорта груши последовательности, гомологичной *HcrVf* генам яблони, и анализ ее структуры.

Материалы и методы

Исследования проводили на двух различных генотипах, один из которых – Память Яковлева – был охарактеризован как устойчивый, в то время как второй – сортообразец № 90-39/65 являлся восприимчивым.

Поиск в геноме груши сорта Память Яковлева последовательностей, гомологичных генам *Vf*-кластера яблони проводили с помощью ДНК-маркеров к *Vf*-генам яблони. Предположительный гомолог одного из генов *Vf*-кластера яблони был найден в геноме устойчивого сорта с помощью праймеров FD5for (5'-ATGGAGAGAACCATGAGAGTTG-3') и FD5rev (5'-TACTGGCATATTCGTCGCAG-3'), амплифицирующих открытую рамку считывания гена *hcrVf2*, отвечающего за устойчивость видов рода *Malus* к возбудителю парши яблони *V. inaequalis* [17]. Амплификацию проводили в соответствии с [17]. У восприимчивого сортообразца отсутствовала одна из полос амплификации данного маркера. Остальные маркеры, использованные в исследовании, не выявили полиморфизма между изучаемыми генотипами (данные не представлены).

Продукты амплификации разделяли в 1% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания этидиум бромидом. В качестве маркера молекулярного веса использовали 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo scientific (EC)).

Полученный продукт амплификации раз-

Результаты и обсуждение

Сорт груши Память Яковлева характеризуется высокой устойчивостью к парше. Он был получен в результате скрещивания сорта Тёма с французским сортом Оливье де Серр. Сорт Тёма представляет собой межвидовой гибрид сорта европейской груши Финляндская желтая с уссурийской грушей.

Для выделения гомологов *HcrVf* семьи из генома груши был использован метод ПЦР-основанного клонирования. В результате амплификации с праймерами FD5, ограничивающими открытую рамку считывания генов-гомологов *HcrVf* семьи, в геноме устойчивого к парше сорта груши Память Яковлева выявлялся фрагмент длиной 3081 п.н. У восприимчивого образца 90-39/65 данный фрагмент отсутствовал. Фрагмент был клонирован и затем секвенирован в прямом и обратном направлении с помощью дополнительных праймеров к его внут-

мером около 3000 п.н. был выделен из геля с помощью GeneJet™ Gel Extraction Kit (Thermo scientific (EC)). Выделенные фрагменты лигировались в плазмиду pTZ57R/T, которой трансформировали штамм *E.coli* DH5α с помощью InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Thermo scientific (EC)) согласно рекомендациям производителя. Клонирование в плазмиду pTZ57R/T и последующую трансформацию *E. coli* DH5α проводили при помощи Plasmid GeneJet™ Miniprep Kit (Thermo scientific (EC)) согласно протоколу производителя. После посева на селективную среду и отбора трансформантов проводили выделение плазмидной ДНК, содержащей исследуемую последовательность, с помощью GeneJet™ Gel Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific (EC)) согласно рекомендованному протоколу. Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, секвенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13 и внутренних праймеров к клонированной последовательности. Для проведения реакции секвенирования использовали BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Амплификацию для секвенирования и очистку полученных продуктов амплификации проводили в соответствии с методикой производителя. Компьютерный анализ полученной нуклеотидной последовательности выполняли с помощью программного обеспечения, предоставленного на сайте NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

ренней части. Последовательность получила название Puvf1.

Сравнение нуклеотидной последовательности Puvf1 с базой данных GenBank показало, что она имеет высокую степень гомологии с последовательностями *HcrVf* семьи яблони. Результат представлен в таблице. В частности, степень идентичности последовательности Puvf1 из генома груши и последовательности *HcrVf2* генам яблони, которая ассоциирована с устойчивостью к парше, составляет 93.1%.

Поиск по базе данных Plant Resistance Genes (<http://www.prgdb.org>), содержащей более 16 000 известных и гипотетических R-генов 192 видов растений, отвечающих за устойчивость к 115 различным патогенам, также выявил гомологию изучаемой последовательности с R-генами других растений.

Таблица. Степень идентичности нуклеотидной последовательности Ruvf1 с последовательностями HcrVf семьи яблони

Номер доступа в GenBank	Название гена	Источник гена	Длина посл-ти, п.н.	% попарной идентичности	E Value
AJ297739	<i>hcrvf1</i>	<i>Malus floribunda</i>	1109	92,5	0
AJ297740	<i>hcrvf2</i>	<i>Malus floribunda</i>	1822	93.1	0
AJ297741	<i>hcrvf3</i>	<i>Malus floribunda</i>	1929	93.1	0

Среди генов, обеспечивающих устойчивость к различным возбудителям, на сегодняшний день наиболее изучен кластер так называемых R-генов. Устойчивость, определяемая этими генами, обеспечивается реакцией гиперчувствительности, ведущей к гибели зараженной клетки, что препятствует дальнейшему распространению патогена. Считается, что продукты R-генов являются рецепторами, взаимодействующими с белками, кодируемыми *Avr*-генами патогена. Такое взаимодействие запускает сигнальный каскад, в результате которого активируется система защиты растений от патогена [18].

По своей структуре R-гены представляют собой достаточно гетерогенную группу. Чаще всего в структуре белков, кодируемых R-генами, отмечают протеинкиназные каталитические домены и переменное число лейцин-богатых повторов (LRR). LRR участвуют в связывании лигандов за счет белок-белковых взаимодействий. Клеточная локализация белковых продуктов R-генов различна. Часть из них является цитоплазматическими белками (некоторые – прикрепленными к цитоплазматической мембране), в то время как другие представляют собой рецептороподобные структуры, имеющими внеклеточный, трансмембранный и внутриклеточный домены [6].

Среди растений первый кластер R-генов, названный *Cf*, был найден у томата [18]. Впоследствии гомологичные области были описаны у многих растений, находящихся довольно далеко от томата в эволюционном отношении. Первичное заключение о функции генов было сделано на основе гомологии с генами *Cf* кластера томата, позже его подтвердили экспериментально [13].

Представленный анализ сиквенированной последовательности позволяет сделать вывод о ее гомологии с R-генами (рис.), в частности, с геном яблони *hcrvf2*, участие которого в формировании устойчивости к *V. inaequalis* было доказано путем трансформации восприимчивого сорта [13]. Последовательность Ruvf1 имеет также высокую степень гомологии с последовательностями генов рецептор-подобных белков видов *M. × domestica*, *M. floribunda*, *M. micro-malus*, *M. baccata* и др., что говорит об общности их происхождения. Однако общность происхождения Ruvf1 и *hcrvf2* не позволяет сделать заключение относительно того, будет ли этот ген обеспечивать устойчивость его носителей к *V. pirina*. Но, тем не менее, изученная последовательность является хорошим кандидатом для последующего анализа на предмет ее функциональности.

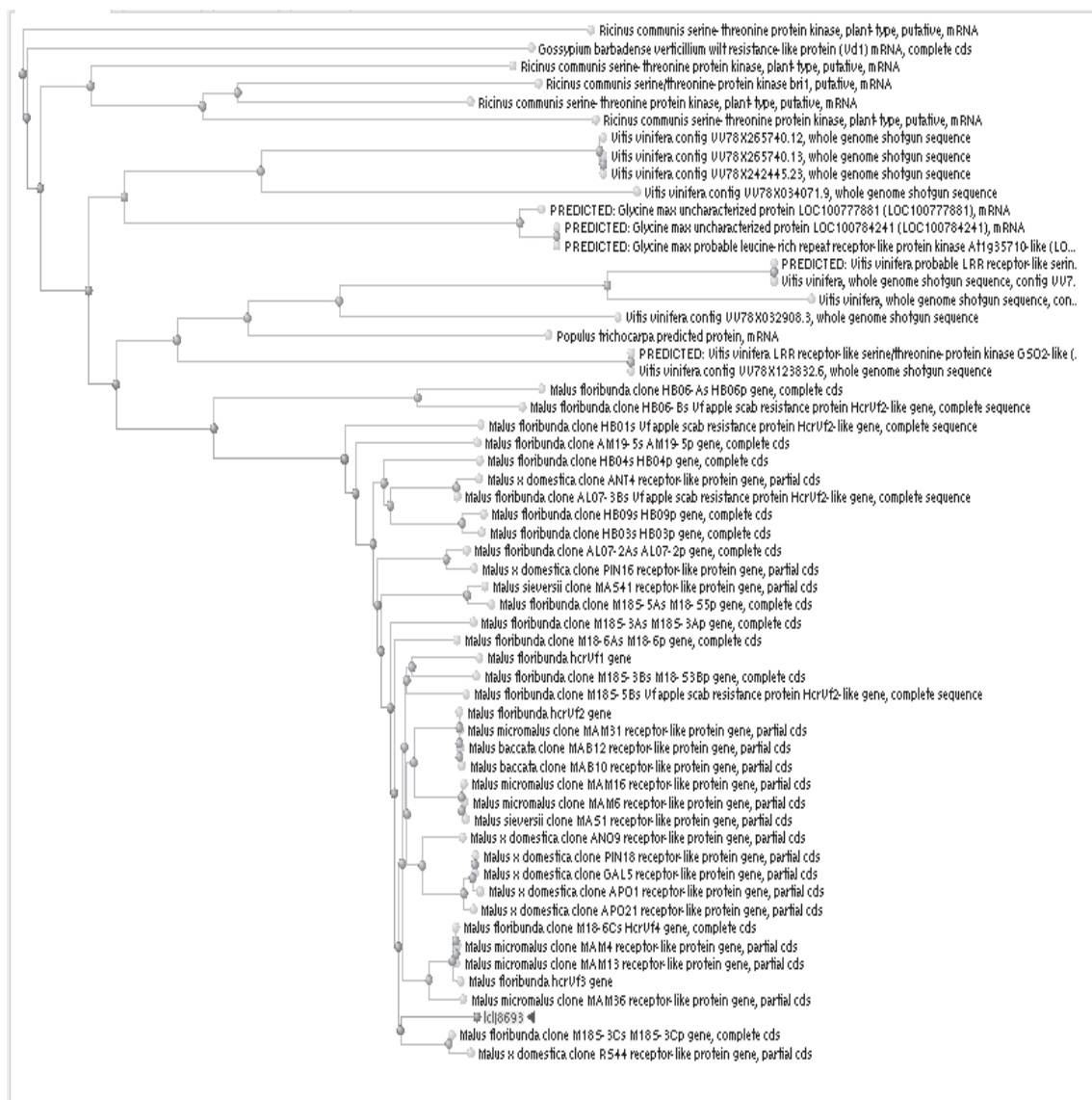


Рис. Дендрограмма сходства нуклеотидной последовательности с аннотированными последовательностями GenBank. Анализируемая последовательность генома груши обозначена lclj8693

Литература

1. Tanaka S., Yamamoto K. Studies in pear scab. II. Taxonomy of the causal fungus of Japanese pear scab // Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. – 1964. – Vol. 29. – P. 128–136.
2. Langford M.H., Keitt E.N. Heterothallism and variability in *Venturia pirina* // Phytopathology. – 1942. – Vol. 32. – P. 357–369.
3. Bouvier L., Bourcy M., Boulay M. et al. A new pear scab resistance gene *Rvp1* from the European pear cultivar 'Navara' maps in a genomic region syntenic to an apple scab resistance gene cluster on linkage group 2 // Tree Genet. and Genom. – 2012. – Vol. 8. – P. 53–60.
4. Lespinasse Y., Chevalier M., Durel C.E. et al. Pear breeding for scab and *Psylla* resistance // Acta Hort. – 2008. – Vol. 800. – P. 475–481.
5. Abe K., Kotobuki K., Sato T. et al. Inheritance of resistance to pear scab from European pears to Asian pears // J. Jpn. Soc. Hortic. Sci. – 2000. – Vol. 1. – P. 1–8.
6. Terakami S., Shoda M., Adachi Y. et al. Genetic mapping of the pear scab resistance gene *Vnk* of Japanese pear cultivar Kinchaku // Theor Appl Genet. – 2006. – Vol. 113. – P. 743–752.
7. Cho K.H., Shin I.S., Kim K.T. et al. Development of AFLP and CAPS markers linked to the scab resistance gene, *Rvn2*, in an inter-specific hybrid pear (*Pyrus* spp.) // J. Hortic Sci. Biotechnol. – 2009. – Vol. 84. – P. 619–624.
8. Pierantoni L., Dondini L., Cho K.-H. et al. Pear scab resistance QTLs via a European pear (*Pyrus communis*) linkage map // Tree Genet. and Genom. – 2007. – Vol. 3. – P. 311–317.

9. Bus V., Rikkerink E., Aldwinckle H.S. et al. A proposal for the nomenclature of *Venturia inaequalis* races // Acta Hort. – 2009. – Vol. 814. – P. 739-746.
10. Patocchi A., Frei A., Frey E. et al. Towards improvement of marker assisted selection of apple scab resistant cultivars: *Venturia inaequalis* virulence surveys and standardization of molecular marker alleles associated with resistance genes // Mol Breed. – 2009. – Vol. 24, №4. – P. 337-347.
11. Vinatzer B., Patocchi A., Gianfranceschi L. et al. Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with Vf apple scab resistance // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2001. – Vol. 14. – P. 508-515.
12. Xu M. L., Korban S. S. A cluster of four receptor-like genes resides in the Vf locus that confers resistance to apple scab disease // Genetics. – 2002. – Vol. 162. – P. 1995-2006.
13. Belfanti E., Silfverberg-Dilworth E., Tartarini S. et al. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety // Proc Natl Acad Sci USA. – 2004. – Vol. 101. – P. 886-890.
14. Yamamoto T., Kimura T., Terakami S. et al. Integrated genetic linkage maps for pear based on SSR and AFLP markers // Breeding Science. – 2007. – Vol. 57. – P. 321-329.
15. Celton J.-M., Chagne D., Tustin D.S. et al. Update on comparative genome mapping between *Malus* and *Pyrus* // BMC Research Notes. – 2009. – Vol. 2. – P. P182.
16. Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J. e.a. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* (Borkh.) // Nature genetics. – 2010. – Vol. 42, №10. – P. 833-841.
17. Brogini G.A.L., Galli P., Parravicini G. et al. *HcrVf* paralogs are present on linkage groups 1 and 6 of *Malus* // Genome. – 2009. – Vol. 52. – P. 129-138.
18. Thomas C.M., Dixon M.S., Parniske M. et al. Genetics and molecular analysis of tomato *Cf* genes for resistance of *Cladosporium fulvum* // Phil. Trans. R. Soc. Lond. – 1998. – Vol. 353. – P. 1413-1424.

URBANOVICH O.Yu.,¹ KUZMITSKAYA P.V.,¹ KAZLOVSKAYA Z.A.,² ANOSHENKO B.Yu.³

¹ Institute of Genetic and Cytology

Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by

² Institute of Fruit Growing

Belarus, 230132, Minsk region, Samokhvalovichi, Kovaleva str., 2

³ Central Botanical Garden of the NAS of Belarus

Belarus, 220012, Minsk, Surganova str., 2v

HOMOLOGUE OF *HcrVf* GENES FROM PEAR GENOME

Aims. The aim of this research was isolation and structure analysis of the sequence homologous to *HcrVf* genes, which associated with resistant to apple scab, from pear genome resistant to scab. **Methods.** The method of PCR-based cloning was used for isolation of the homologue *HcrVf* from pear genome. **Results.** The sequence homologue to the sequences *HcrVf* genes apple was isolated from the pear genome of the variety 'Pamiat Yakovleva' resistant to pear scab. The degree of identity between the isolated sequence and the Genebank database sequence of the gene *HcrVf2* associated with scab apple resistance was 93,1%. The high degree of identity between the pear sequence and homologues apple R genes was also shown. **Conclusions.** The cloned nucleotide sequence of pear is the homologue to the genes of R-type resistance. **Key words:** pear, scab, apple, *HcrVf* genes, nucleotide sequence.

ФОМИНА И.Р.^{1,2}, КРЕСЛАВСКИЙ В.Д.¹, БАЛАХНИНА Т.И.¹, ГЕРЦ С.М.¹, ИВАНОВ А.А.¹, КОСОБРЮХОВ А.А.¹, ЛЮБИМОВ В.Ю.¹, НАЗАРОВА Г.Н.¹, БИЛЬ К.Я.^{1,2}

¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН

Россия, 142290, Московская обл., г. Пуцино, ул. Институтская, 2, e-mail: irafomi@rambler.ru

²Biosphere Systems International Foundation

USA, 85755, Arizona

СТРЕСС РЕАКЦИИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С НАРУШЕННЫМИ АНТИОКСИДАНТНЫМИ ГЕНАМИ

Ранее было показано [1], что при повышенном освещении (300 мкЕ м⁻² с⁻¹) мутанты: *Synechococcus* sp. PCC 7942 (далее PCC 7942) с

нарушенным *sodB* геном [2] и *Synechocystis* sp. PCC 6803 (далее PCC 6803) с нарушенным *katG* геном [3], - растут медленнее, чем их дикие

штаммы. При регистрации световой кривой CO_2 -зависимого выделения O_2 уровень максимальной скорости выделения кислорода у мутанта *sodB* PCC 7942 был ниже, чем у других штаммов. В условиях фотоингибирования (60 мин облучения светом интенсивностью $1200 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ в присутствии 80 мкМ хлорамфеникола или спектиномицина в инкубационной среде) оба мутантных штамма не обнаруживали подавления светолIMITИРОВАННОГО выделения O_2 большего, чем у диких типов, но *sodB* мутант проявлял тенденцию к усиленному подавлению светонасыщенного выделения O_2 [1]. Эти ре-

Материалы и методы

Культуры цианобактерий выращивали в альгологическом культиваторе на жидкой среде BG-11 (Cyanobacteria BG-11 Freshwater Solution 50X, Sigma, США) с добавлением 10 мМ NaHCO_3 , при освещенности $30 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, температуре 28°C и постоянной аэрации воздухом, обогащенным 3% CO_2 , как описано ранее [6]. Рост культур оценивали по изменению оптической плотности при 750 нм (A_{750}) на спектрофотометре Genesys 10uv (ThermoSpectronic, USA). На стадии линейного увеличения роста (A_{750}) клетки осаждали центрифугированием при 1000 g 10 мин, ресуспендировали в свежей среде, доводили до оптической плотности $A_{750} = 0,5$, добавляли (в опытные варианты) метилвиологен в конечной концентрации 0,5 мкМ и регистрировали рост культур в течение 48 час.

Скорость CO_2 -зависимого выделения O_2 определяли с помощью стандартного электрода Кларка в суспензии целых клеток в термостати-

Результаты и обсуждение

Метилвиологен в концентрации 0,5 мкМ вызывал сильный стресс у *sodB*-мутанта PCC 7942, но не оказывал заметного влияния на рост и фотосинтез *katG*-мутанта PCC 6803 и обоих диких штаммов (PCC 7942, PCC 6803). Полное подавление роста (рис. 1), значительное снижение уровня CO_2 -зависимого выделения O_2 (рис. 2) и относительной амплитуды медленной компоненты ЗФ (данные не представлены) наступало у *sodB*-мутанта PCC 7942 в течение 4-6 час инкубации в среде с 0,5 мкМ метилвиологеном. Дикий штамм PCC 7942 оставался мало затронутым в течение 48 час. Нарушение фотосинтетической активности *sodB*-мутанта PCC 7942 не сопровождалось заметным изменением содержания хлорофилла и отношения каро-

зультаты убеждают, что ни один из генов (*sodB* и *katG*) не участвует в защите фотосистемы II (ФС II) от фотодеструкции. Было установлено [2, 4, 5], что *sodB* мутант PCC 7942 чувствителен к окислительному воздействию на участках электрон-транспортной цепи, примыкающих к ФС I.

В настоящей работе для развития представлений о физиологической роли генов *sodB* и *katG* в фототрофных клетках, исследовано влияние 0,5 мкМ метилвиологена на культуры данных мутантов.

рованной (28°C) полярографической ячейке с использованием полярографа LP-7 (Praha). Источником света служил облучатель ЛЭТИ (Россия), измерения проводили при насыщающем освещении $1000 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Перед экспериментом клетки цианобактерий ресуспендировали в свежей среде (BG-11 + 10 мМ NaHCO_3) и доводили до оптической плотности $A_{750} = 0,5$.

Изменение замедленной миллисекундной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла а, часто используемое в качестве быстрого и чувствительного метода оценки активности фотосинтетического аппарата, регистрировали с помощью модифицированного дискового фосфороскопа [6]

Содержание пигментов измеряли в ацетонных экстрактах предварительно осажденных клеток [7].

Активность каталазы определяли в суспензии целых клеток спектрофотометрически [3].

тин/хлорофилл (табл. 1), но сопровождалось значительным увеличением активности каталазы (табл. 2).

Ранее [4,5], изучение *sodB*-мутанта PCC 7942 показало, что циклический транспорт электронов и реакционный центр P700 служат мишенями супероксидрадикала (O_2^-), формирующегося в ФС I, и цитозольная супероксиддисмутаза (Fe-SOD) защищает эти мишени от окислительного повреждения. Первичной мишенью, нарушаемой метилвиологеном в отсутствие *sodB* гена, кодирующего Fe-SOD, является циклический транспорт электронов ФС I. Это наблюдение согласуется с представлениями о чувствительности Fe4S4 кластеров ФС I к O_2^- .

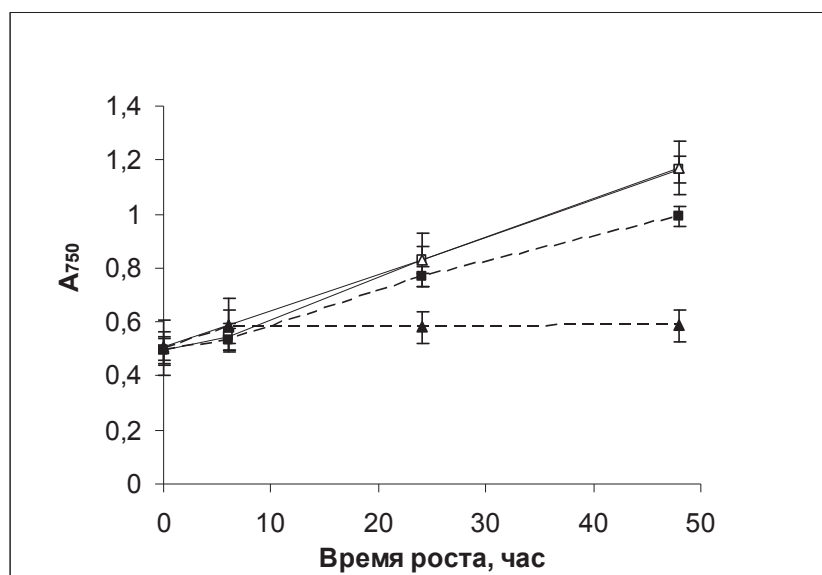


Рис. 1. Рост культур дикого типа (□, ■) и *sodB* мутанта (Δ, ▲) цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 в нормальных условиях (□, Δ) и в присутствии 0,5 мкМ метилвиологена (■, ▲); $n = 7$

Таблица 1. Содержание хлорофилла (Хл) и отношение каротин/хлорофилл в клетках дикого типа и *sodB* мутанта цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 при выращивании культур в нормальных условиях и в присутствии 0,5 мкМ метилвиологена (МВ)

<i>Synecho-coccus</i> sp. PCC 7942	Время роста, час	Хл, мкг·10 ⁻⁶ клеток (среднее ± SD; $n = 5$)		Каротин/хлорофилл (среднее ± SD; $n = 5$)	
		Контроль	0,5 мкМ МВ	Контроль	0,5 мкМ МВ
Дикий тип	6	0,163 ± 0,027	0,167 ± 0,001	5,75 ± 0,13	5,76 ± 0,06
	24	0,161 ± 0,011	0,155 ± 0,003	5,97 ± 0,38	5,87 ± 0,31
	48	0,151 ± 0,003	0,166 ± 0,002	5,92 ± 0,36	5,90 ± 0,11
<i>sodB</i> мутант	6	0,136 ± 0,012	0,121 ± 0,027	6,26 ± 0,44	6,12 ± 0,25
	24	0,130 ± 0,019	0,098 ± 0,011	5,84 ± 0,69	5,78 ± 0,39
	48	0,131 ± 0,009	0,105 ± 0,021	5,74 ± 0,19	5,67 ± 0,23

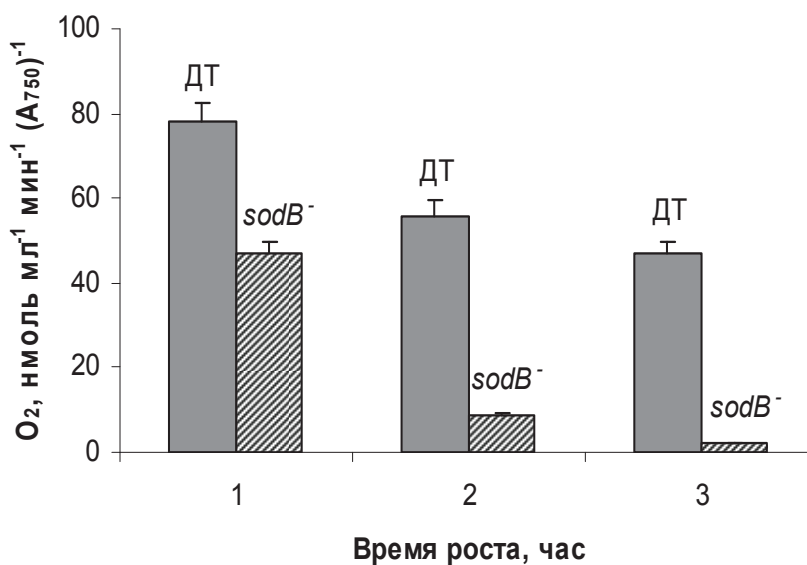


Рис. 2. Скорость светонасыщенного (1000 мкЕ м⁻² с⁻¹) CO₂-зависимого выделения O₂ клетками дикого типа (ДТ) и *sodB*- мутанта (*sodB*-) цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 после роста культур в присутствии 0,5 мкМ метилвиологена

Таблица 2. Активность каталазы в клетках дикого типа и *sodB*⁻ мутанта цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942 при выращивании культур в нормальных условиях и в присутствии 0,5 мкМ метилвиологена

<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Время роста, час	Активность каталазы, мкмоль мин ⁻¹ 10 ⁻⁶ клеток (среднее ± SE; n = 5)	
		Контроль	0,5 мкМ МВ
Дикий тип	4	12,40 ± 0,66	14,39 ± 0,78
	6	12,68 ± 0,67	11,15 ± 0,15
	30	12,35 ± 0,15	16,91 ± 0,22
	50	11,56 ± 0,59	11,39 ± 0,63
<i>sodB</i> ⁻ мутант	4	13,54 ± 0,35	35,63 ± 0,43
	6	12,85 ± 0,36	37,89 ± 0,76
	30	11,89 ± 0,22	36,42 ± 0,46
	50	15,53 ± 0,22	38,30 ± 0,46

Выводы

Потеря активности каталазы у *katG*⁻ мутанта цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 не усиливает чувствительность к метилвиологену, поскольку Fe-СОД остается активной. Однако если Fe-СОД отсутствует, как у *sodB*⁻ мутанта

цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7942, активация каталазы служит адаптивным ответом на окислительный стресс, индуцированный метилвиологеном, позволяющим выжить, если не продолжать рост.

Литература

1. Fomina I.R., Balakhnina T.I., Hertz S.M., Ivanov A.A., Ivanova E.P., Kosobryukhov A.A., Lyubimov V.Yu., Nazarova G.N., Serdyuk O.P., Smolygina L.D., Bil' K.Y., Herbert S.K. Effects of high light on growth and photosynthesis in *Synechocystis* and *Synechococcus* mutants deficient in antioxidant genes / Материалы V Международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». – Москва-Пушино: Издательство Российского университета дружбы народов, 2003. – Т. 3. – С. 162–164.
2. Herbert S.K., Samson G., Fork D.C., Laudenbach D.E. Characterization of damage to photosystems I and II in a cyanobacterium lacking detectable iron superoxide dismutase activity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 8716–8720.
3. Tichy M., Vermaas W. *In vivo* role of catalase-peroxidase in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P.1875-1882.
4. Thomas D.J., Avenson T.J., Thomas J.B., Herbert S.K. A cyanobacterium lacking iron superoxide dismutase is sensitized to oxidative stress induced with methyl viologen but is not sensitized to oxidative stress induced with norflurazon // Plant Physiol. – 1998. – Vol. 116. – P. 1593–1602.
5. Thomas D.J., Thomas J.B., Prier S.D., Nasso N.E., Herbert S.K. Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC 7942 // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 120. – P. 275–282.
6. Креславский В.Д., Фомина И.Р., Кособрюхов А.А., Херберт С.К., Бабыкин М.М., Биль К.Я. Действие индукторов окислительного стресса на фотосинтетический аппарат клеток устойчивого к метилвиологену мутанта Ptc20 цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Биофизика. – 2007. – Т. 52. – С. 277–286.
7. Myers J., Graham J.R., Wang R.T. Light harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants // Plant Physiol. – 1980. – Vol. 66. – P. 1144–1149.

FOMINA I.R.^{1,2}, KRESLAVSKI V.D.¹, BALAKHNINA T.I.¹, HERTZ S.M.¹, IVANOV A.A.¹, KOSOBRYUKHOV A.A.¹, LYUBIMOV V.YU.¹, NAZAROVA G.N.¹, BIEL K.Y.^{1,2}

¹*Institute of Basic Biological Problems RAS*

Russia, 142290, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya str. 2, e-mail: irafomi@rambler.ru

²*Biosphere Systems International Foundation*

USA, 85755, Arizona

STRESS REACTIONS IN CYANOBACTERIA LACKING ANTIOXIDANT GENES

Aims. To improve understanding of the roles of antioxidant genes in phototrophic cells the effects of 0,5μM methyl viologen (MV) on the *sodB*⁻ mutant of *Synechococcus* sp. PCC 7942 and the *katG*⁻ mutant of

Synechocystis sp. PCC 6803 were examined. *Methods.* Cultures were grown in liquid BG11 medium at $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. *Results.* $0,5 \mu\text{M}$ MV inhibited growth and photosynthetic activity in the *sodB*⁻ mutant within 8 hr. The PCC 7942 wild type as well the PCC 6803 wild type and its *katG*⁻ mutant remained nearly unaffected for 48 hr. The oxidative damage to the *sodB*⁻ mutant was not accompanied by essential changes in pigment content but was accompanied by greater catalase activity. *Conclusions.* Lack of catalase activity in the *katG*⁻ mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 does not sensitize to MV because iron superoxide dismutase (Fe-SOD) is active. However, if the Fe-SOD is absent, as in the *Synechococcus* sp. PCC 7942 *sodB*⁻ mutant, activation of catalase appears to be an adaptive response to MV that may allow survival.

Key words: *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Synechocystis* sp. PCC 6803, methyl viologen.

ШЕСТОПАЛ О.Л., ЗАМБРІБОРЩ І.С., ТОПАЛ М.М., ЛІТВИНЕНКО М.А., ІГНАТОВА С.О.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: oksana_shestopal@mail.ru

ВИВЧЕННЯ ГАПЛОПРОДУКЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З ПШЕНИЧНО-ЖИТНИМИ ТРАНСЛОКАЦІЯМИ

Селекційна цінність сортів м'якої пшениці, які несуть транслокації 1RS.1BL та 1RS.1AL, обумовлена стійкістю цих рослин до абіотичних та біотичних чинників. Ділянка хромосоми, що несе транслокацію 1RS.1BL містить гени стійкості до грибних патогенів: бурої іржі (Lr26), стебловий іржі (Sr31), жовтої іржі (Yr9) і борошністої роси (Pm8), а 1RS.1AL транслокація від жита *Insave* (сорт *Amigo*) несе ген стійкості до двох біотипів тлі *Schizaphis graminum*, кліща *Aceria tosicheilla* (Keifer) та ген стійкості до борошністої роси *Pm17* [1]. Слід відмітити, що транслокація 1RS.1BL значно знижує показники хлібо-

пекарської якості, тоді як присутність 1RS.1AL не призводить до такого різкого зниження цих показників у твердозерних форм пшениці [2, 4]. Для прискорення селекційного процесу необхідне використання сучасних біотехнологічних методів, зокрема, отримання гомозиготних ліній шляхом гаплоїдії. Одним із яких є культура ізольованих пиляків [4]. Отже, робота з тестування гаплопродукційної здатності озимої м'якої пшениці та отримання серед регенерантів подвоєних гаплоїдів, які містять транслокації 1RS.1BL та 1RS.1AL, є актуальною та важливою.

Матеріали і методи

Дослідницький матеріал наданий відділом селекції та насінництва пшениці СГІ-НЦНС. У роботу було залучено 16 гібридних популяції F₁ та 9 батьківських сортів. Сорти Золотоколоса, Княгиня Ольга, що містять транслокацію 1RS.1AL, і сорти Легенда Миронівська, Калинова, Колос Миронівщини – транслокацію 1RS.1BL, були залучені в схрещування с сортами місцевої селекції – Годувальниця Одеська, Дальницька, Куяльник, Антонівка, що характеризуються, як високоадаптивні до кліматичних умов Півдня України. Також досліджували 11 складних гібридів від схрещувань із трансгресивними лініями: Tr-1, Tr-3, Tr-4, Tr-5, що містять 1RS.1BL транс локацію.

Рослини вирощували в 2012 р. на дослідних польових ділянках СГІ-НЦНС. Пагони з пиляками зрізали з донорних рослин, коли вакуолізовані мікроспори знаходились у середньо-пізній фазі розвитку. Попередню обробку зрізаних пагонів проводили у водному розчині АБК (0,5 мг/л) протягом 3-5 діб при +2 – +4 °C у

темряві [4, 5]. Колосся поверхнево стерилізували насиченим розчином гіпохлориту кальцію за прийнятою методикою [6]. Ізольовані пиляки висаджували на індукційне поживне середовище 190-2 [6] у модифікації [7]. Висаджені пиляки культивували перші 3 доби у темряві за температури +30 °C, далі при + 24 °C до появи новоутворень. Сформовані калюсні макроструктури пересаджували на середовище MS у модифікації [7] і культивували у темряві 3–4 тижні до появи центрів регенерації, далі – за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення – 10 тис. люкс, температурі + 24 °C до формування рослин-регенерантів. Зелені рослини пересаджували на безгормональне поживне середовище MS та яровизували 45 діб за температури +2-4 °C, 16-годинному фотоперіоді, інтенсивності освітлення 3000–3500 люкс. Потім отримані рослини-регенеранти висаджували у ґрунтову суміш у маленькі 200 мл пластикові стакани, накривали агроволокном (для кращої адаптації до

умов *ex vitro*) і вирощували в умовах штучного клімату. Надалі адаптовані рослини пересаджу-

Результати та обговорення

Результати тестування гаплопродукційної здатності в культурі пиляків *in vitro* 27 гібридних популяцій F₁ та 9 сортів озимої м'якої пшениці, наданих відділом селекції та насінництва пшениці СГП, наведені в табл. 1 і 2. Слід зазначити, що за даних умов експерименту лише 3 генотипи з 36 виявились не чутливими до андрогенезу *in vitro* – сорт Антонівка, та два гібриди – 516 і 528.

Показано, що серед сортів найвищими показниками гаплопродукційної здатності (кількість новоутворень та кількість зелених рослин-регенерантів) характеризувався сорт Куяльник (8,61 шт. та 9,43 шт. на 100 пиляків відповідно). Високий рівень формування новоутворень показав і сорт Золотоколоса – 8,05 шт./100 пиляків, однак він характеризувався значно нижчим показником «кількість зелених рослин-регенерантів» – 1,22 шт./100 пиляків (табл. 1).

Другу групу за рівнем індукції новоутворень склали сорти Княгиня Ольга, Легенда Миронівська, Колос Миронівщини (2,12, 2,58. та 2,49 шт. на 100 пиляків відповідно). Проте регенерація в цієї групи сортів була невисокою, а самі регенеранти характеризувались низькою життєздатністю та погано перенесли яровизацію.

Сорти Калинова, Дальницька, Годувальниця показали відповідно 0,31 шт., 0,84 шт. та 0,91 шт. новоутворень на 100 пиляків. Не дивлячись на таку низьку частоту формування новоутворень, регенеранти сортів Дальницька, Годувальниця мали велику життєздатну силу й властивість до збільшення кількості центрів регенерації на материнському калюсі отриманих рослин-регенерантів (табл. 1).

Стосовно гібридів F₁ (табл. 1), то в більшості випадків, вони мали вищий за батьківські сорти рівень формування новоутворень. Даний результат ми прогнозовано й очікували, спираючись на результати наших попередніх досліджень та дані літератури [7 - 10]. Виявлено відмінності між показниками гаплопродукційної здатності простих реципрокних гібридів. Показано, що в гібридних популяціях, де за батьківську форму залучали сорт Княгиня Ольга (транслокація 1RS.1AL), рівень індукції новоутворень був вищим, у порівнянні з гібридами,

вали у великі посудини, де їх вирощували до одержання зерен.

де даний сорт виступав як материнський компонент.

Аналіз чотирьох складних гібридних комбінацій: F₁ [Куяльник х Золотоколоса] х Куяльник; F₁ [Куяльник х Золотоколоса] х Золотоколоса; F₁ [Куяльник х Княгиня Ольга] х Куяльник, F₁ [Куяльник х Княгиня Ольга] х Княгиня Ольга показав, що рівень формування новоутворень усіх форм був достатньо високим (2,11 шт., 3,44 шт., 3,61 шт. і 5,94 шт. на 100 пиляків відповідно), але достовірно (p<0,05) нижчим за такий у сортів Куяльник та Золотоколоса. Тобто показано регресивний характер прояву ознаки «індукція новоутворень» у F₁ гібридів між сортами Куяльник та Золотоколоса.

Відомо, що для підвищення гаплопродукційної здатності різних генотипів озимої пшениці доцільно залучати у схрещування «донори гаплопродукції» – форми пшениці, що характеризуються високим рівнем формування новоутворень в культурі ізольованих пиляків [7-10]. Тому, виявлений ефект негативного впливу на показники гаплопродукції у міжсорткових гібридів між двома сортами потенційними «донорами», має теоретичний та практичний інтерес та підтверджує необхідність проведення обов'язкового тестування властивостей донора гаплопродукції у конкретних комбінаціях схрещувань.

За культивування пиляків *in vitro* складних гібридів сортів із лініями, що містять 1RS.1BL транслокацію, виявили, що дев'ять з них є чутливими до наданих умов культури *in vitro* (табл. 2). Найвищими показниками гаплопродукції серед усіх генотипів м'якої пшениці характеризувався номер 504 ([F₇, Куяльник х Тг-5] х Княгиня Ольга): новоутворень – 10,11 шт./ на 100 пиляків та регенерантів – 7,79 шт./ на 100 пиляків. Слід зазначити, що морфогенні калюси цього гібриду вирізнялися здатністю до збільшення кількості точок регенерації в процесі культивування. Так, після 45 добової яровизації – рослин-регенерантів на етапі висадки їх у ґрунт кількість рослин збільшилась понад 1,5 рази (з 37 до 61 шт.). Тобто регенераційний потенціал новоутворень гібриду 504 був надвисокий.

Таблиця 2. Ефективність гаплопродукції в культурі пиляків *in vitro* складних гібридів озимої м'якої пшениці зі трансгресивними формами

№	Генотип	Кількість пиляків	Кількість новоутворень		Кількість регенерантів		
			шт.	шт./ на 100 пиляків	шт.	шт./ на 100 пиляків	після яровизації, шт.
504	[F ₇ , Куяльник х Tr-4] х Заграва	403	9	2,23 ± 0,74	0	0	-
507	[F ₈ , Альбатрос х [(Обрий х <i>Ae. cylindrica</i>)] х Tr-1] х Писанка	418	13	3,11 ± 0,85	11	2,63 ± 0,78	3
510	[F ₇ , лінія 309/106 х Tr-3] х Княгиня Ольга	571	10	1,75 ± 0,55	7	1,23 ± 0,46	3
513	[F ₅ , Селянка х лінія з рекомбінантним Glu-D1] х Вікторія	431	2	0,46 ± 0,33	1	0,23 ± 0,23	-
516	[F ₈ , Альбатрос х [(Обрий х <i>Ae. cylindrica</i>)] х Tr-1] х Вдала	399	0	0	0	0	-
519	[F ₅ , Куяльник х [(Ацтек Франція х амфіплоїд-синтетик ES6)] х Сирена	383	28	7,31 ± 1,33	0	0	-
522	[F ₉ , Селянка х Aligre Франція + варіант Gli/Glu] х Ластівка	371	4	1,08 ± 0,54	1	0,27 ± 0,27	1
525	[F ₈ , Альбатрос х [(Обрий х <i>Ae. cylindrica</i>)] х Tr-1] х Місія	454	6	1,32 ± 0,54	3	0,66 ± 0,38	2
528	[F ₈ , Альбатрос х [(Обрий х <i>Ae. cylindrica</i>)] х Tr-1] х Антонівка	194	0	0	0	0	-
531	[F ₈ , Альбатрос х [(Обрий х <i>Ae. cylindrica</i>)] х Tr-1] х Землянка	524	17	3,24 ± 0,77	14	2,67 ± 0,70	15
540	[F ₇ , Куяльник х Tr-5] х Княгиня Ольга	475	48	10,11 ± 1,38*	37	7,79 ± 1,23*	61

* - генотип з найбільшим показником в порівнюваних вибірках на рівні значущості $p < 0,05$

Аналізуючи результати досліджень п'яти гібридів (номери 507, 516, 525, 528, 531), які мають одну спільну материнську форму – [F₈, Альбатрос х [(Обрий х *Ae. cylindrica*)] х Tr-1] та різні батьківські, ми мали можливість оцінити вплив саме останніх на кількісні показники гаплопродукції. Показано (табл. 2), що сорти Писанка, Землячка та Місія (в меншій мірі) позитив-

но впливали на досліджувані ознаки, тоді як гібриди із сортами Антонівка і Вдала взагалі виявились нечутливими до культури пиляків. Варто зазначити, що в цьогорічні умови повітряної та ґрунтової посухи дуже негативно вплинули на чутливість до андрогенезу *in vitro* самого сорту Антонівка та його гібридів, де він був за батьківську форму (табл. 1, 2).

Висновки

1. У культурі *in vitro* пиляків озимої м'якої пшениці отримано 333 зелених рослин-регенеранти.

2. У даних умовах експерименту три генотипи м'якої пшениці з 36 виявились не чутливими до андрогенезу *in vitro* – сорт Антонівка та дві гібридні комбінації 516 і 528. Найвищими показниками гаплопродукційної здатності (кількість новоутворень та кількість зелених рослин-регенерантів) характеризувались сорт Куяльник

(8,61 шт. та 9,43 шт. на 100 пиляків відповідно) та гібрид ([F₇, Куяльник х Tr-5] х Княгиня Ольга (10,11 шт. та 7,79 шт./ на 100 пиляків).

3. Виявлений ефект негативного впливу на показники гаплопродукції *in vitro* у гібридів пшениці між двома сортами, що є потенційними «донорами гаплопродукції», підтверджує необхідність проведення обов'язкового тестування властивостей «донора» у конкретних комбінаціях схрещувань.

Література

- McIntosh R.A., Hart G.E., Devos K.M., Gale M.D., Rogers W.J. Catalogue of gene symbols for wheat // Proc. 9th Intern. Wheat Genetics Symp. – Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 1998. – Vol. 5. – P. 123–145.

Таблиця 1. Ефективність гаплопродукційного процесу в культурі пиляків *in vitro* сортів та гібридів озимої м'якої пшениці

Генотип	Кількість пиляків в, шт.	Кількість новоутворень		Зелені рослини-регенеранти		Кількість регенерантів, що висаджені у ґрунт після яровизації, шт.
		шт.	шт./ на 100 пиляків	шт.	шт./ на 100 пиляків	
F ₁ Антонівка х Легенда Миронівська	1199	66	5,50 ± 0,66	39	3,25 ± 0,51	41
F ₁ Легенда Миронівська х Антонівка	1136	61	5,37 ± 0,67	17	1,50 ± 0,36	20
F ₁ Легенда Миронівська х Княгиня Ольга	924	47	5,09 ± 0,72	22	2,38 ± 0,50	28
F ₁ Княгиня Ольга х Легенда Миронівська	1115	14	1,26 ± 0,33	4	0,36 ± 0,18	5
F ₁ Княгиня Ольга х Антонівка	469	1	0,21 ± 0,21	1	0,21 ± 0,21	1
F ₁ Антонівка х Княгиня Ольга	335	7	2,09 ± 0,78	4	1,19 ± 0,59	5
F ₁ (Калинова х Годувальниця) х Легенда Миронівська	624	10	1,60 ± 0,50	9	1,44 ± 0,48	9
F ₁ (Калинова х Годувальниця) х Годувальниця	493	2	0,41 ± 0,29	3	0,61 ± 0,35	1
F ₁ (Колос Миронівщини х Годувальниця) х Годувальниця	735	9	1,22 ± 0,41	10	1,36 ± 0,43	5
F ₁ (Колос Миронівщини х Годувальниця) х Легенда Миронівська	644	28	4,35 ± 0,80	19	2,95 ± 0,67	19
F ₁ (Колос Миронівщини х Дальницька) х Дальницька	457	26	5,69 ± 1,08	21	4,60 ± 0,98	26
F ₁ (Колос Миронівщини х Дальницька) х Легенда Мир	460	5	1,09 ± 0,48	0	0,00	0
F ₁ (Куяльник х Княгиня Ольга) х Куяльник	527	19	3,61 ± 0,81	17	3,23 ± 0,77	14
F ₁ (Куяльник х Княгиня Ольга) х Княгиня Ольга	589	35	5,94 ± 0,97	30	5,09 ± 0,91	31
F ₁ (Куяльник х Золотоколоса) х Куяльник	332	7	2,11 ± 0,79	3	0,90 ± 0,52	1
F ₁ (Куяльник х Золотоколоса) х Золотоколоса	378	13	3,44 ± 0,94	4	1,06 ± 0,53	3
Легенда Миронівська	503	13	2,58 ± 0,71	4	0,80 ± 0,40	2
Калинова	319	1	0,31 ± 0,31	0	0,00	0
Колос Миронівщини	401	10	2,49 ± 0,78	3	0,75 ± 0,43	0
Княгиня Ольга	377	8	2,12 ± 0,74	1	0,27 ± 0,26	0
Золотоколоса	410	33	8,05 ± 1,34*	5	1,22 ± 0,54	8
Куяльник	244	21	8,61 ± 1,80*	23	9,43* ± 1,87	16
Годувальниця	662	6	0,91 ± 0,37	3	0,45 ± 0,26	5
Дальницька	477	4	0,84 ± 0,42	4	0,84 ± 0,42	8
Антонівка	304	0	0	0	0	0

* - генотип з найбільшим показником в порівнюваних вибірках на рівні значущості p<0,05

2. Собко Т.А., Хохлов А.Н. Изучение селекционной ценности пшенично-ржаной транслокации 1AL-1RS сорта озимой мягкой пшеницы Amigo // Тез. докл. межд. конф. «Агробиотехнология растений и животных». – Киев, 1997. – С. 71–72.
3. Graybosch R.A., Peterson C.J., Hansen L.E., Worrall D., Shelton D.R. Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL/1RS and 1AL-1RS wheat-rye translocation lines // J. Cereal Sci. – 1993. – Vol. 17. – P. 95–106.
4. Лобанова К.І., Шестопап О.Л., Ігнатова С.О. Абсцизова кислота як екзогенний фактор підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків м'якої пшениці // Вісник Харків. націон. аграрного ун-ту. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 102-110.
5. Пат. 21988 України МПК (2006) А01Н1/06 Спосіб підвищення регенераційного потенціалу в культурі пиляків озимої м'якої пшениці / Ігнатова С. О., Лобанова К. І., Шестопап О. Л.; заявник і патентовласник Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН. – № у 200611658; заявка 6.11.06 ; опубл. 10.04.07, Бюл. № 4.
6. Ігнатова С.О., Жосонар М.В., Лобанова К.І., Шестопап О.Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків. Методичні рекомендації / Півден. біотехнолог. центр в рослин-ві УААН. – Одеса, 2008. – 12 с.
7. Лобанова К.І., Жосонар М.В., Ігнатова С.О. Шляхи реалізації регенераційного потенціалу в культурі пиляків у різних генотипів озимої м'якої пшениці // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, №1. – С. 52-57.
8. Martinez Garcia C., Martin Sanchez J.A., Sin Casas E. Plant regeneration from anther culture in six hexaploid triticales varieties and their F₁ hybrids // In: Livre des Resume de Posters. Book of Poster Abstracts. XIIIth EUCARPIA Congress. – Angers-France, 1992. – P. 189–190.
9. Chu C.C., Hill R.D. An improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryooids in *Triticum aestivum* L. // Plant Sci. – 1988. – Vol. 55. – P. 175–181.
10. Ігнатова С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*: [монография] – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.

SHESTOPAL O.L., ZAMBRIBORSHCH I.S., TOPAL N.N., LYTVINENKO N.A., IGNATOVA S.O.
Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road 3, e-mail: oksana_shestopal@mail.ru

INVESTIGATION OF HAPLOID PRODUCTION ABILITY OF SOFT WHEAT WITH WHEAT-RYE TRANSLOCATION

Aims. Testing haploproduction ability of soft winter wheat and obtaining their lines by *in vitro* anther culture. **Methods.** Obtaining of wheat double haploid lines by anther culture *in vitro*. The statistical methods. **Results.** The 333 pcs. green plant-regenerants were obtained by anther culture from 27 F₁ hybrid populations and 9 varieties of winter wheat which were granted the Department of selection and seed wheat of Plant Breeding & Genetics Institute. **Conclusions.** In these experimental conditions, sensitivity to androgens in 33 among 36 wheat genotypes have been detected. The lower figures of haploid production of wheat hybrids than these figures in parental varieties that are potential "donors haploid production" was obtained. This fact confirms the need for obligatory testing properties "donor" in certain combinations of crosses.
Key words: soft wheat with wheat-rye translocation, anther culture *in vitro*, double haploid, hybrids.

ЩЕРБАК Н.Л.¹, КУРЧЕНКО И.Н.², ЮРЬЕВА Е.М.², КУЧУК Н.В.¹

¹*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины*
Украина, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: natasha@iicb.kiev.ua

²*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины*
Украина, Д 03680, Киев, ГСП, ул. Академика Заболотного, 154

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ И САЛАТА, НЕСУЩИХ ГЕН СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II

В течение долгого времени было принято считать, что сладкий вкус для человека ассоциируется с присутствием сахаров, так как рецепторы сладкого вкуса реагируют на присутствие моносахаров (глюкозы), дисахаров (сахарозы),

хотя подобные вкусовые ощущения вызывают также заменители сахара сахарин и аспартам, а так же полиолы – сорбит, ксилит. В то же время относительно недавно были открыты белковые молекулы, которые благодаря взаимодействию с

вкусовыми рецепторами высших приматов, вызывают ощущение сладкого вкуса. К этим белкам относятся бразеллин, куркулин, монеллин, тауматин и др. [1, 2]. В современном мире искажение привычек питания с избыточным потреблением сладких углеводов приводит к формированию различного рода болезней и натуральные сахарозамещающие препараты – это разумный компромисс при желании снизить калорийность рациона, а потребление сладкого уже рефлекторно закреплено, или же если употребление сахаров должно быть ограничено по медицинским показаниям. Сладкий белок тауматин был получен из кожуры плодов Западноафриканского растения *Thaumatococcus daniellii* [3] и уже более десяти лет используется в странах Европы и США как пищевая добавка. Известно по крайней мере пять очень сладких форм этого белка: тауматин I, тауматин II, а также тауматин a, b и c. В пищевых продуктах тауматин используется для подслащивания, а также усиления ароматических качеств. Поскольку для получения этого белка из естественных источников имеются определенные ограничения, продукция рекомбинантного тауматина методами современной биотехнологии не теряет своей актуальности. налажен синтез этого белка в бактериальных системах [4, 5] и дрожжах [6], а также получены трансгенные растения нескольких съедобных видов, в которых подтверждена экспрессия гена тауматина. В результате трансформации растений *Agrobacterium rhizogenes* были получены линии трансгенных корней картофеля [7] и табака [8], в которых наблюдали продукцию тауматина. Рекомбинантный ген, кодирующий непосредственно сладкий белок (тауматин II), был

Материалы и методы

Растительный материал. Для работы были использованы асептические растения салата, полученные из семян, после их последовательной стерилизации в 70% этиловом спирте (1 мин.) и 40% растворе промышленного отбеливателя «Domestos» (10 мин.). Введение в культуру *in vitro* земляники садовой «Альбион» проводили методом стерилизации побегов (усов) тепличных растений в тех же условиях. **Векторные конструкции и бактериальные штаммы.** В нашей работе для генетической трансформации растений использовали вектора pCB169 и pCB171, содержащие рекомбинантный ген тауматина II под контролем CaMV 35S промотора, для пластидного таггертинга шитый с транзитным пептидом малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксылазы петунии. Для создания би-

использован для генетической трансформации таких видов овощных культур как томаты [9] и огурец [10], что привело к улучшению вкусовых качеств и аромата плодов этих растений. Кроме того, в работе по генетической трансформации садовой земляники этим геном [11], также было показано, что полученные трансгенные растения обладают повышенной устойчивостью к фитопатогенному грибу *Botrytis cinerea*.

Целью нашей работы было получение трансгенных растений ремонтантной садовой земляники (*Fragaria x ananassa*) (к которой часто применяют традиционное название клубника) сорта «Альбион», а также растений салата (*Lactuca sativa*) сортов «Одесский кучерявец» и «Гранд Рапидс». Ремонтантный сорт садовой земляники для наших экспериментов был отобран в связи с тем, что он имеет несколько волн плодоношения с мая по октябрь. И хотя изначально сорт характеризуется насыщенным вкусом, ягоды, собранные в осенний период, менее сладкие, также в этот период погодные условия способствуют поражению ягод гнилью. Микроскопический гриб *Botrytis cinerea*, поражающий растения садовой земляники, вызывает также серую гниль растений салата и является причиной гибели молодых сеянцев, особенно в теплицах. Этот факт и послужил причиной выбора второго объекта наших исследований. Поскольку устойчивость к этому фитопатогену возросла у трансгенных растений садовой земляники [11], в нашей работе мы рассчитываем получить растения салата, которые будут характеризоваться новыми вкусовыми и ароматическими качествами, а также повышенной устойчивостью к заболеваниям.

нарного вектора pCB169 за основу был взят вектор pICBV19, содержащий ген фосфинотрицин-ацетилтрансферазы (*bar* ген). Вектор pCB171 был создан на основе вектора pICBV16 и содержит ген неомецинфосфотрансферазы (*nptII*). Также, в нашей работе был использован вектор pICH16350 любезно предоставленный компанией Icon Genetics GmbH (г. Халле, Германия). В этом векторе ген тауматина II содержит сигнальную последовательность, направляющую белок в эндоплазматический ретикулум. Бинарные вектора переносили в *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101 путем электропорации с использованием MicroPulser Electroporator (BioRad). Для трансформации растений использовали ночную культуру агробактерии, выращенную на жидкой среде LB при 24 °C на рота-

ционном шейкере (200 об./мин.). Генетическая трансформация растений с помощью *Agrobacterium tumefaciens*. Для трансформации растений салата использовали семядоли семидневных проростков, сокультивацию которых с ночной культурой агробактерии проводили в течение суток, после чего экспланты переносили на среду для регенерации. Регенерация растений салата проводилась на среде B5R-3 (среда B5, дополненная 3 мг/л кинетина, 0,4 мг/л НУК, 400 мг/л поливинилпиралидона, 500 мг/л цефотаксима, а также 5 мг/л фосфинотрицина или 100 мг/л канамицина для селекции). Для трансформации земляники в качестве эксплантов использовали листья и черешки асептических растений, которые предварительно культивировали

тауматина: 5'GCATGCCACCTTCGAGATCG3'
 5'GCTTGCATGCCTCTAGACTGCAGTT3';
nptII гену: 5'CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA3'
 5'GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG3'
bar гену: 5'-CCGTACCGAGCCGCAGGAAC-3'
 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'

Анализ антифунгальной активности. Определение антифунгальной активности растительных экстрактов проводили с использованием штамма фитопатогенного гриба *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. из коллекции микроскопических грибов отдела физиологии и систематики микромицетов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Для этого 1 мл инокулюма гриба (суспензии конидий в концентрации 1×10^6 /мл) размешивали в 100 мл охлажденной до 30°C агаризованной среды (картофельно-глюкозного агара). Такой подход позволяет соз-

дать условия для равномерного роста патогена на поверхности среды [14]. Для тестирования экстрактов на чашках Петри с агаризованной средой были сформированы лунки 1,0 см в диаметре. Экстракты листьев растений (100 мкл) вносили в лунки, контролем служил экстракционный буфер. Чашки Петри с экстрактами и буфером сначала инкубировали 24 часа при 4°C, затем – при $28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов. По истечении этого времени оценивали наличие и величину зон угнетения роста грибного мицелия.

Анализ с помощью полимеразной цепной реакции. Наличие трансгенов в трансформированных растениях подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции. Суммарную растительную ДНК экстрагировали СТАБ-методом [13]. Как положительный контроль для реакции амплификации использовали плазмидную ДНК векторов, с помощью которых проводили генетическую трансформацию растений. Реакцию амплификации проводили с использованием праймеров специфичных к гену

дать условия для равномерного роста патогена на поверхности среды [14]. Для тестирования экстрактов на чашках Петри с агаризованной средой были сформированы лунки 1,0 см в диаметре. Экстракты листьев растений (100 мкл) вносили в лунки, контролем служил экстракционный буфер. Чашки Петри с экстрактами и буфером сначала инкубировали 24 часа при 4°C, затем – при $28 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов. По истечении этого времени оценивали наличие и величину зон угнетения роста грибного мицелия.

Результаты и обсуждение

Рекомбинантный ген, кодирующий сладкий белок (тауматин II), был использован для генетической трансформации нескольких видов овощных [2, 7, 9, 10] и ягодных [11] культур, что приводило к улучшению их вкусовых и ароматических свойств, кроме того, такие растения характеризовались повышенной устойчивостью к грибным инфекциям. Однако в литературе мы не встречали данных о трансгенных растениях салата с геном тауматина.

Векторные конструкции, которые были использованы в нашей работе, содержат ген сладкого бека тауматина II, а также селективные гены *bar* (pCB169) и ген *nptII* (pCB171 и pICH16350), которые обуславливают устойчивость растений к гербициду фосфинотрицину и антибиотику канамицину соответственно. Рече-

нерация растений происходила на среде, которая содержала селективные агенты: канамицин, в концентрации 25 мг/л для растений салатов и 50 мг/л для растений земляники, или фосфинотрицин, в концентрации 5 мг/л (Рис.1 А, В). В результате проведенных экспериментов были отобраны растения устойчивые к соответствующим селективным агентам. Анализ с помощью ПЦР подтвердил наличие селективного гена и гена тауматина у двух линий земляники, 14 линий салата «Гранд Рапидс» и 9 линий салата «Одесский кучурявец» (рис.1 С, D).

Трансгенные растения земляники культивируются *in vitro*, в дальнейшем мы планируем высадку в почву и изучение свойств полученных растений. Трансгенные растения салата были высажены в почву в условиях теплицы. Тести-

рование этих растений органолептически не выявило значительных изменений вкусовых качеств, хотя у двух линий можно было отметить слабое сладкое послевкусие. Был проведен анализ антифунгальной активности растительных экстрактов салата (трансформированных векторами pCB169 и pCB171) с использованием

штамма фитопатогенного гриба *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. В наших экспериментах подавления роста грибного мицелия *in vitro* отмечено не было. Мы планируем продолжить тестирование антифунгальной активности растительных экстрактов полученных трансгенных линий с другими видами фитопатогенных грибов.

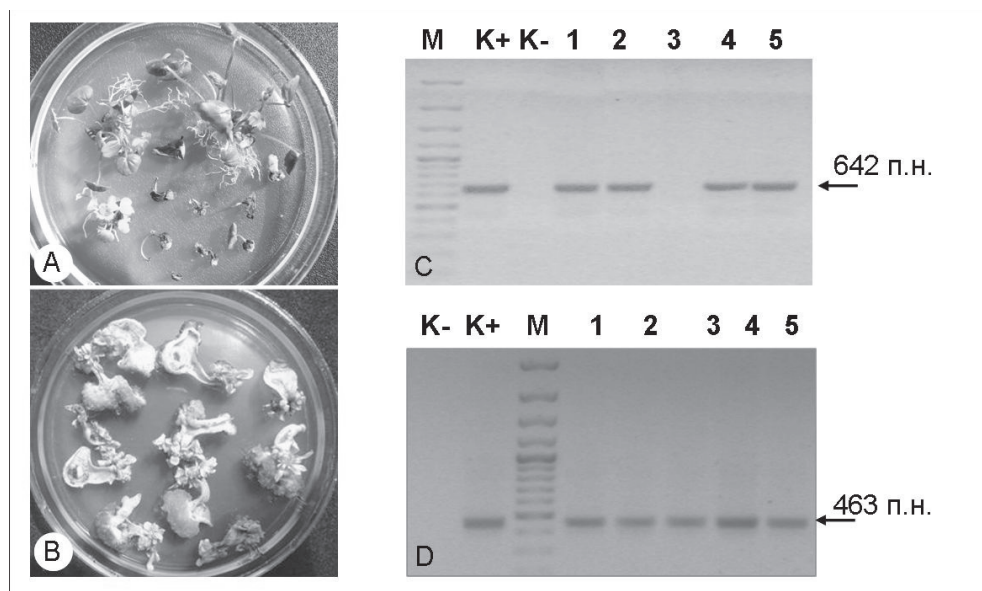


Рис. 1. Получение трансгенных растений салата и земляники:

А, В – регенерация растений земляники (А) салата (В) на селективной среде; С, D – электрофоретическая диаграмма результатов ПЦР с использованием праймеров к гену тауматина (С) и к гену *bar* (D): М – ДНК маркер, O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder («Fermentas»), К- – негативный контроль, ДНК нетрансформированного растения салата; К+ – позитивный контроль, плазмидная ДНК pCB169, 1-5 – ДНК растений, которые регенерировали на селективной среде после трансформации вектором pCB169

Выводы

Получены трансгенные растения салата *Lactuca sativa* сортов «Одесский кучерявец» и «Гранд Рапидс», а также земляники садовой (*Fragaria x ananassa*) сорта «Альбион» с геном сладкого белка тауматина под контролем CaMV 35S промотора. Анализ с помощью ПЦР под-

твердил наличие селективных генов и гена тауматина II в геноме растений. Растительный экстракт из листьев трансгенных растений салата не показал угнетения роста грибного мицелия *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. в условиях *in vitro*.

Литература

1. Temussi PA. Natural sweet macromolecules: how sweet proteins work // *Cell Mol Life Sci* – 2006. – Vol. 63. – P. 1876–1888.
2. Szwacka M., Burza W., Zawirska-Wojtasiak R., Gośliński M., Twardowska A., Gajc-Wolska J., Kosieradzka I, Kielkiewicz M. Genetically modified crops expressing 35S-thaumatin II transgene: sensory properties and food safety aspects // *Food Science and Food Safety*. – 2012. – Vol. 11. – P. 174–186.
3. Van der Wel H., Loeve K. Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth // *Eur. J. Biochem.* – 1972. – Vol. 31. – P. 221–225.
4. Faus I., Patiño C., Río J.L., del Moral C., Barroso H.S., Rubio V. Expression of a synthetic gene encoding the sweet-tasting protein thaumatin in *Escherichia coli* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996 – Vol. 229. – P. 121–127.
5. Illingworth C., Larson G., Hellekant G. Secretion of the sweet-tasting plant protein thaumatin by *Streptomyces lividans* // *J. Ind. Microbiol.* – 1989. – Vol. 4. - P 37–42.
6. Edens L., Bom I., Ledebouer A.M., Maat J., Toonen M.Y., Visser C., Verrips C.T. Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast // *Cell.* – 1984. – Vol. 37. – P. 629–633.

7. Witty M., Harvery W.J. Sensory evaluation of transgenic *Solanum tuberosum* producing rthaumat II. NZ. J. Crop Hort. Sci. – 1990. – Vol. 18. – P. 77-80.
8. Pham N.B., Schäfer H., Wink M. Production and secretion of recombinant thaumatin in tobacco hairy root cultures // Biotechnol J. – 2012. – Vol. 7. – P. 537-545.
9. Bartoszewski G., Niedziela A., Szwacka M., Niemirowicz-Szczytt K. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth // Plant Breeding. – 2003. – Vol. 122. – P. 347-351.
10. Szwacka, M., Krzymowska M., Osuch A., Kowalczyk M. E., Malepszy S. Variable properties of transgenic cucumber plants containing the thaumatin II gene from *Thaumatococcus daniellii*. // Acta Physiol. Plant. – 2002. – Vol. 24. – P. 173-185.
11. Schestibratov K.A., Dolgov S.V. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea* // Sci Hortic. – 2005. – Vol. 106. – P. 177-189.
12. Hanhineva K., Kokko H., Siljanen H., Rogachev I., Aharoni A., Karenlampi S.O. Stilbene synthase gene transfer caused alterations in the phenylpropanoid metabolism of transgenic strawberry (*Fragaria ananassa*) // J. Exp. Botany. – 2009. – Vol. 60. – P. 2093-2106.
13. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. – 1990. – Vol. 12. – P. 13-15.
14. Klochenko P.D., Elanskaya I.A., Shevchenko T.F., Sokolova E.V. Antifungal activity of freshwater cyanobacteria // Algological Studies. – 2001. – Vol. 103. – P. 143-149.

SHCHERBAK N.L.¹, KURCHENKO I.N.², YURIEVA E.M.², KUCHUK M.V.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str. 148, e-mail: natasha@icb.kiev.ua*

²*D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnoho St. 154*

OBTEINING OF LETTUCE AND STRAWBERRY TRANSGENIC PLANTS CARRYING SWEET-TASTE PROTEIN THAUMATIN II

Aim. According to the published data protein thaumatin II of *Thaumatococcus daniellii* is capable to induced sweet taste and antifungal resistant phenotype. A possible application of thaumatin II properties is to produce transgenic disease resistant crop plants with modified fruit taste. **Methods.** Transgenic plants were obtained via *Agrobacterium* mediated transformation method. Presence of the target and selective genes was confirmed by PCR analysis. Antifungal activity of the extracts from green-house grown lettuce plants was tested. **Results.** We report here the development of transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants with thaumatin II gene under control of CaMV 35S promoter. **Conclusion.** The leaf extract from transgenic lettuce plants carrying thaumatin II gene had no inhibiting effect on mycelium growth *in vitro* of the plant pathogenic fungus *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

Key words: thaumatin II, *Lactuca sativa*, *Fragaria x ananassa*, transgenic plants.

ЯМСКОВА В.П.¹, КРАСНОВ М.С.², РЫБАКОВА Е.Ю.¹, КУЛИКОВА О.Г.², ИЛЬИНА А.П.², ЯМСКОВ И.А.²

¹*ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26, e-mail: yamskova-vp@yandex.ru*

²*ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, 28, e-mail: embmsk@mail.ru*

НОВАЯ ГРУППА МЕМБРАНОТРОПНЫХ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ

В середине прошлого века были сформулированы следующие положения: в основе пространственной организации ткани лежит позиционное положение формирующих ее клеток; строго фиксированное пространственное расположение каждой клетки обусловлено разнообра-

зием морфогенетических реакций ее поверхности, среди которых определяющими являются контактные и адгезионные взаимодействия; точная адгезия играет принципиальную роль в регуляции таких жизненно важных биологических процессов, как миграция, пролиферация и

дифференцировка, апоптоз клеток, геновая экспрессия, сигнальная трансдукция и морфогенез. Эти представления о значении клеточной адгезии в процессах биорегуляции стимулировали активное изучение молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий. Основной экспериментальный подход к исследованию этой проблемы заключался в идентификации молекул адгезии как антигенов межклеточного пространства с помощью методов биохимии, иммунохимии и микроскопии. Таким образом были открыты и изучены компоненты и архитектура ультраструктур межклеточных контактов (плотные; щелевые контакты, десмосомы и др.), внеклеточного матрикса, различные семейства адгезивных белков, система универсальных рецепторов в плазматической мембране (ПМ) клеток – интегринов. Нами был применен совершенно

Материалы и методы

МГТБ экстрагировали из тканей по разработанной методике при пониженной температуре в физиологическом растворе. Полученные тканевые экстракты фракционировали в условиях насыщенного раствора сернокислого аммония. Надосадочную жидкость и осадок собирали, диализовали и исследовали методом биотестирования. Фракцию супернатанта изучали методами изоэлектрофокусирования, обращенно-фазовой ВЭЖХ, электрофореза в ПААГ, кругового дихроизма, MALDI-TOF масспектрометрии, лазерного динамического светорассеивания, атомно-силовой микроскопии [2, 4]. Детекцию фракций белков проводили спектрофотометрически при 280 нм. Биотестирование фракций биорегуляторов проводили с помощью ранее разработанного адгезиометрического метода на органотипической культуре печени мышей и оценивали параметр, отражающий мембранотропную активность. Определение мембрано-

Результаты и обсуждение

В настоящее время МГТБ обнаружены нами в различных тканях животных и растений [4]. Показана их локализация в межклеточном пространстве (рис. 1).

С помощью физико-химических методов исследования было показано, что МГТБ проявляют высокую Ca^{2+} -связывающую активность ($K_d=10^{-4}-10^{-6}$ мг/мл); в водных растворах присутствуют в виде наноразмерных частиц (50-200 нм), причем активность биорегуляторов зависит от их наноразмерного состояния; они ре-

иной подход к исследованию молекул адгезии. В его основе лежал поиск молекул межклеточного пространства, оказывающих влияние на вязкоупругие свойства ПМ. Были разработаны адгезиометрические методы, в которых ПМ рассматривалась как квазиупругое тело при деформационных воздействиях на ткань [5, 6]. С помощью данного экспериментального подхода были открыты молекулы адгезии, которые в последствии получили название *мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов* (МГТБ).

В настоящей статье представлены результаты исследования МГТБ, выделенных из различных тканей животных и растений, а именно их физико-химических свойств и биологического действия.

тропной активности МГТБ проводят на органотипической культуре печени мыши. Фрагменты ткани культивировали в опытной серии в среде, содержащей МГТБ; в контрольной серии в культуральную среду ничего не добавляют. После 2-х часов культивирования каждый фрагмент ткани подвергают стандартному деформационному воздействию и подсчитывают количество выделившихся ядер, которое в присутствии МГТБ выделяется на 25-60% меньше, чем в контроле. Для исследования специфической биологической активности биорегуляторов был разработан ряд новых моделей органотипического культивирования тканей позвоночных животных [3, 4]. Локализацию в тканях биорегуляторов проводили с помощью поликлональной кроличьей антисыворотки, полученной к соответствующим МГТБ и последующей иммуногистохимической реакции на срезах тканей [4].

зистентны к воздействию ряда химических и физических факторов (изменению температуры от -70°C до $+100^{\circ}\text{C}$, ионного состава и pH среды, действию органических растворителей, протеаз и др.). [2]. Биорегуляторы данной группы имеют сложное строение: они содержат гликопептиды (менее 10 кДа), ответственные за биологическое действие МГТБ, и белки-модуляторы (15-70 кДа), которые влияют на активность регуляторных пептидов [7, 8].

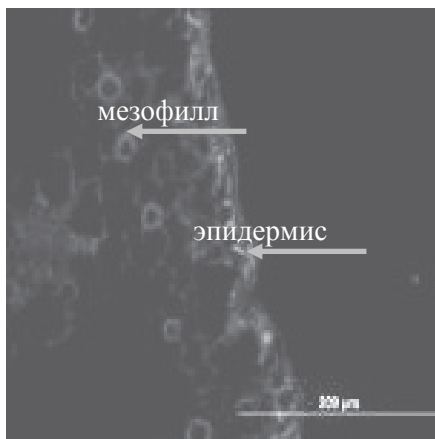


Рис. 1. Локализация биорегулятора, выделенного из лукович чеснока, на поверхности клеток эпидермиса и округлых клеток губчатого мезофилла в отростке чеснока (указано стрелками). Ув. Ок.х10, об.х20. Функция овальных клеток в мезофилле не изучена

Изучение состава компонентов биорегуляторов данной группы показало, что регуляторные пептиды содержат остатки маннозы и N-ацетилглюкозамина, которые, очевидно, N-гликозидной связью присоединяются к N-концевому остатку аспарагина пептида. Секвенирование по Эдману регуляторных пептидов,

входящих в состав МГТБ, провести не удалось из-за блокирования N-концевой аминокислоты. После дегликозилирования трифторметансульфо-кислотой гликопептида, входящего в состав сывoroточного МГТБ, удалось определить его аминокислотную последовательность:

Asp-Thr-Pro-Lys- Leu-Glu-Ile-Ala-Ala-Ala-Phe-Lys [4].

Первичная структура фрагмента регуляторного пептида, входящего в состав биорегулятора, выделенного из лука репчатого, была установлена другим способом: с помощью карбок-

сипептидазы Y был проведен последовательный гидролиз остатков аминокислот с C-конца пептида:

-Gly-Phe-Gly-Glu-Gly-Ala-Tyr-Thr-Gly-Ala-Val-Ala-Ala-Gly-Thr-Glu-Gly-Arg- [1].

Изучение белков-модуляторов, входящих в состав МГТБ животного происхождения показало, что они представлены белками суперсемейства сывoroточного альбумина. Причем в состав каждого МГТБ, выделенного из ткани соответствующего органа, входит определенная изоформа альбумина, которая взаимодействует только со «своим» регуляторным пептидом. Был изучен белок-модулятор сывoroточного МГТБ [7]. Его вторичная структура представлена высоким содержанием α -спиралей – 79%, а также β

– складчатой структурой – 2% и статистическим клубком – 19%; третичная структура – глобула (данные дифференциальной сканирующей калориметрии); изоэлектрическая точка pI 3,90±0,03 (данные ИЭФ); обнаружена высокая гомология с сывoroточным альбумином быка – изоформа (поиск гомологов по алгоритму PROSEARCH, база данных SwissProt). Тем не менее N-концевая аминокислотная последовательность молекулы сывoroточного белка-модулятора:

Ala – Pro – Lys – Lys – Ser – Glu – Ile – Ala – Leu – Phe-
отличается от N-концевой последовательности БСА (Sigma).

Результаты исследования механизма взаимодействия регуляторных пептидов и их белков-модуляторов показали, что в основе самосборки биорегулятора, которая осуществляется на поверхности клеток, лежит углевод-белковое взаимодействие, причем сывoroточный альбумин «узнает» как лектин углеводную компоненту регуляторного пептида. Ионы кальция играют

большую роль в организации этого комплекса. Образовавшийся комплекс всегда проявляет как мембранотропную, так и специфическую биологическую активность в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих (10^{-8} – 10^{-15} мг). Следует отметить, что регуляторные пептиды, выделенные, например, из тканей заднего отдела глаза быка (сетчатки, пигментного эпителия, радужной обо-

лочки, стекловидного тела) проявляли мембранотропную активность в существенно более высоких дозах (10^{-3} – 10^{-4} мг), а кроме того, не оказывали выраженного влияния на состояние ткани при культивировании [8]. И только комплекс, образовавшийся после взаимодействия пептида и белка-модулятора (изоформы альбумина) прояв-

лял мембранотропную активность в СМД и оказывал яркое протекторное действие на ткани заднего отдела глазного бокала в этих дозах. Методом кругового дихроизма удалось обнаружить конформационные изменения в молекуле белка-модулятора, после взаимодействия с регуляторным пептидом (рис. 2).

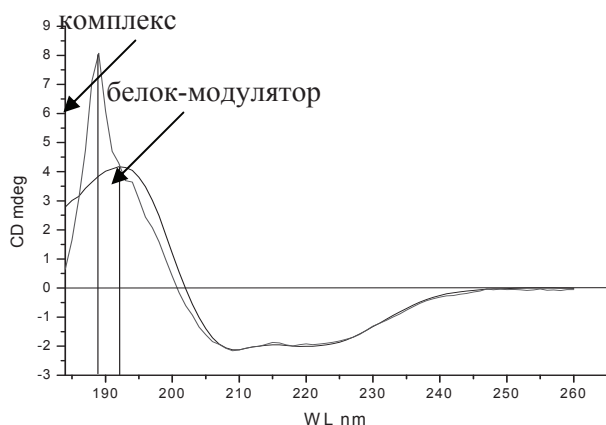


Рис. 2. КД-спектры белка-модулятора и его комплекса с регуляторным пептидом

Согласно нашим представлениям, взаимодействие между РП и белками-модуляторами лежит в основе самосборки структуры МГТБ, которые являются «тонкими настройщиками» органо-тканевого гомеостаза, то есть обеспечивают регуляцию биологических процессов, проявляя свойства тканевой, но не видовой специфичности действия. Следует отметить особую роль изоформ альбумина сыворотки крови, которые были обнаружены как белки-модуляторы, входящие в состав нескольких МГТБ. Известно, что семейство сывороточного альбумина включает в себя несколько десятков членов. До сих пор их функция оставалась совершенно не изученной. Согласно предложенной нами концепции, многочисленные изоформы сывороточного альбумина могут быть ответственны за регуляцию процессов органо-тканевого гомеостаза, входя в состав МГТБ и функционируя как шапероны в межклеточном пространстве соответствующей ткани. Такое поведение сывороточного альбумина (подобно шаперону) показано в литературе [9]. Мы полагаем, что изоформы альбумина могут проникать избирательно в межклеточное пространство соответствующего органа через гемато-органные барьеры, которые пропускают только специфический для данного органа альбумин. Это предположение подкрепляется результатами исследования альбуминов, входящих в состав МГТБ. Так, например, методами масс-спектрометрии было показано, что альбумины, входящие в состав нескольких

МГТБ, имели различные значения молекулярных весов [7, 8].

Для исследования специфической активности МГТБ были разработаны и использованы различные модели органо-типического культивирования тканей позвоночных животных (крыса *Wistar*, тритон *Pl. waltl*, лягушка *Xenopus laevis*), в том числе задний отдел глаза, хрусталик, роллерные культуры роговицы, склеры, целого глаза, кожи, печени, регенераты конечностей [3]. Некоторые опыты были выполнены на экспериментальных моделях некоторых патологий *in vivo*: кожные раны и ожоги, травмы глаза, костной и хрящевой тканей, ампутация конечностей, острый панкреатит у млекопитающих. В результате проведения этих исследований установлено, что МГТБ в СМД оказывают влияние на миграцию, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз клеток, увеличивают жизнеспособность клеток при культивировании, стимулируют восстановительные и репаративные процессы в патологически измененных тканях за счет дополнительной активации клеточных источников регенерации в ткани [4]. Активность МГТБ характеризуется отсутствием видовой, но наличием тканевой специфичности. Результаты этого исследования объясняют также уникальное свойство биорегуляторов данной группы дополнительно активировать клеточные источники регенерации, вызывая тем самым стимуляцию процессов восстановления и репарации [4].

Выводы

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что на поверхности клеток присутствуют определенные макромолекулярные структуры, участвующие в адгезии клеток и в регуляции основных биологических процессов. В состав этих самособирающихся структур входят биологически активные пептиды и белки,

относящиеся к суперсемейству сывороточного альбумина, которые модулируют активность пептидов. Эти компоненты взаимодействуют по механизму углевод-белкового взаимодействия, причем альбумины выполняют функцию лектинов, узнающих углеводную компоненту пептидов.

Литература

1. Куликова О.Г., Ямскава В.П., Ильина А.П. и др. Идентификация в луке репчатом нового биорегулятора, действующего в сверхмалых дозах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, №4. – С. 1-5.
2. Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С. и др. Физико-химические свойства биологически активных в микродозах регуляторных белков, выделенных из различных тканей млекопитающих // Изв.АН Сер. Хим. – 2009. – №3. – С. 623-628.
3. Ямскава В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения. – М.: Изд. Макс Пресс, 2009. – 84 с.
4. Ямскава В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 136 с.
5. Ямскава В.П., Модянова Е.А., Левенталь В.И. и др. Тканевоспецифические макромолекулярные факторы из печени и легкого: очистка и действие на механическую прочность ткани и клеток // Биофизика. – 1977. – Т. 22. – С. 168-174.
6. Ямскава В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. Высокоактивные тканевоспецифические адгезионные факторы печени и легкого // Молекулярная биология. – 1978. – Т. 11, №5. – С. 1147-1154.
7. Ямскава В.П., Рыбакова Е.Ю., Виноградов А.А. и др. Исследование белка-инактиватора адгезивного гликопротеина из сыворотки крови млекопитающих // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, №4. – С. 407-413.
8. Ямскава В.П., Скрипникова В.С., Молявка А.А. и др. Структурно-функциональные особенности нового биорегулятора, выделенного из ткани пигментного эпителия глаза быка // Биохимия. – 2009. – Т. 74, №9. – С. 1195-1203.
9. Marini I., Moschini R., A Del Corso, Muka U. Chaperone-like features of bovine serum albumin: a comparison with alpha-crystallin // Cell. Mol. Life Sci. – 2005. – Vol. 62. – P. 3092-3099.

YAMSKOVA V.P.¹, KRASNOV M.S.², RYBAKOVA E.Yu.¹, KOULIKOVA O.G.², IL'INA A.P.², YAMSKOV I.A.².

¹ N. K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences
Russia, 119334, Moscow, Vavilov str., 26, e-mail: yamskova-vp@yandex.ru

² A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement compounds, Russian Academy of Sciences
Russia, 119991, Moscow, Vavilov str., 28, e-mail: embrmsk@mail.ru

STUDY OF A NEW GROUP OF MEMBRANE-ACTING TISSUE-SPECIFIC HOMEOSTATIC BIOREGULATORS

Aim. The study of a new group of tissue-specific homeostatic membranotropic bioregulators isolated from various tissues of animals and plants. **Methods.** Physical and chemical properties of a new bioregulator have been studied by isoelectric focusing, reversed-phase HPLC, polyacrylamide gel electrophoresis, circular dichroism, MALDI-TOF mass spectrometry, laser dynamic light scattering, atomic force microscopy. **Results.** The bioregulators of this group consist of a biologically active peptides and proteins related to the superfamily of serum albumin, which modulate the activity of these peptides. These components interact through the mechanism of carbohydrate-protein interactions, and albumin function as lectins that recognize carbohydrate component peptides. **Conclusions.** Our results indicate that the cells are present on the surface of certain macromolecular structures involved in cell adhesion and in the regulation of basic biological processes.

Key words: bioregulators, cell adhesion, serum albumins.

МАЛЕЦКИЙ С.И.

Институт цитологии и генетики СО РАН

Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Акад. Лаврентьева, 10, e-mail: stas@bionet.nsc.ru

ГЕНО- И ОРГАНИЗМОЦЕНТРИЧЕСКИЕ ПАРАДИГМЫ В БИОЛОГИИ

В биологии (совокупность наук о живой природе, о природных сообществах, о строении и функциях живых существ) проблемы наследственной изменчивости относятся к числу фундаментальных, хотя взгляды на природу изменчивости время от времени изменяются либо постепенно, либо радикально, что обозначается историческими сменами парадигм. Например, методология современных представлений об изменчивости базируется на геноцентрической парадигме (ГЦП), сменившей более раннюю – организмоцентрическую парадигму (ОЦП). Согласно ОЦП (вторая половина XIX в.), наследственность – это воспроизводство потомками признаков родителей («подобное рождает подобное»), т.е. наследственность – это онтогенетический процесс, формирующий ткани, органы и другие структуры, из которых состоит целостный организм – растение или животное. ОЦП рассматривала наследственность как слитное свойство, присущее организму как целому, а не его отдельным частям.

Согласно же ГЦП наследственность – это свойство, которое детерминируется дискретными единицами наследственности (генами), которые определяют не только формирование отдельных признаков у растений или животных, но и весь ход их развития от рождения до смерти. Считается, что именно изменения в генах (мутации) или их комбинации в геномах, а также хромосомные рекомбинации определяют не только наследственность и внутривидовую изменчивость, но и определяют основные тенденции эволюции всего живого на Земле посредством естественного отбора. «Основной единицей отбора служит не вид, не группа и даже, строго говоря, не индивидуум. Основная единица – это ген» [5].

Своими успехами ГЦП обязана бескомпромиссному редуccionизму, основанному на использовании в исследованиях методов химии и физики. «По мнению ряда исследователей, решающим фактором успехов классической генетики явилось сознательное сужение исследователями поля своего зрения. <...> Идеологи

молекулярной биологии <...> имели обыкновение с нескрываемым презрением относиться к классической биологии как к "описательной", противопоставляя ей свою, которая, по их мнению, позволяла неизмеримо глубже проникнуть в "суть" <...> биологических явлений» [2]. Далее Л. В. Белоусов добавляет: «Главное ... – это понимание того, что в биосистемах любого уровня элементарные структуры и/или процессы приобретают сколько-нибудь определенное значение только в рамках <...> целостного контекста. Последний же является весьма сложным, трудно расчленимым образованием, ассоциирующимся в гуманитарной сфере с целым кругом понятий, таких как язык, алфавит, набор общественных договоренностей или же культура в целом. Очевидно, что ни бумажные деньги, ни слова, ни звуки, ни буквы и, тем более, ни молекулы типографской краски ничего не означают вне круга этих понятий» [2]. «Слепой редуccionизм, олицетворяемый в наши дни, например, программой "Геном человека", несомненно, скоро себя исчерпает. <...> Если подходить к научной программе осознанно, необходима существенная переориентировка внимания на более верхние структурные уровни и на межуровневые отношения, которые и образуют тот регулирующий контекст, что придает смысл более элементарным структурам и процессам» [2]. Говоря другими словами, ГЦП должна быть дополнена другими представлениями, в частности, организмоцентрической парадигмой.

Несмотря на методологическое несоответствие двух парадигм в понимании природы изменчивости, в сознании биологов полное размежевание между этими парадигмами никогда не происходило, т.е. в одних вопросах исследователи опирались на одну парадигму, а в других – на другую. Это было связано с тем, что предмет биологии – «изменчивость» – относится к признакам различного организационного уровня, которые удовлетворительно удастся описать в рамках либо одной, либо другой парадигм, либо предмет не поддается анализу в рамках обоих методологий.

Классификация признаков у растений в рамках ГЦП и ОЦП. Для осознания парадигмальных пропорций в постижении феномена наследственности и изменчивости рассмотрим классификацию признаков, сложившуюся на протяжении последних двух столетий в биологических исследованиях. Для понимания различия двух парадигм обозначим базовые понятия – «ген»¹ и «признак»². Признак – понятие общебиологическое и его используют в исследованиях как в рамках ОЦП, так и ГЦП, так как признаки могут быть как молекулярного, так и надмолекулярного уровней. Понятие же «ген» – употребляется преимущественно в рамках ГЦП.

Общепринятое понятие признака сформировалось задолго до рождения генетики, например, в биометрии³, возникшей в рамках ОЦП еще в XIX в. [10]. Различают две группы признаков – *дискретные* (прерывные) и *континуальные* (непрерывные), которые регистрируются числовыми значениями, относимыми либо к арифметическим значениям, либо описываются в рамках трехмерной евклидовой геометрии. В свою очередь, дискретные признаки делятся на две подгруппы – *альтернативные* и *счетные* [8].

Альтернативные признаки регистрируются как наличие двух или большего числа состояний у предмета (например, окраска цветков – белая, розовая и красная и т.д., множественные формы одного фермента – изоферменты и др.), и, как следует из многочисленных наблюдений, обычно эти признаки наследуются в соответствии с правилами Менделя (ГЦП). К альтернативным относятся и все признаки, связанные со свойствами отдельных молекул клеток – ДНК, РНК, белков, сахаров и пр. Если альтернативный признак контролируется одним или небольшим числом генов, то в гибридологических экспериментах можно наблюдать четкое соответствие между поведением наследственных детерминантов (генов) и детерминируемого этими генами признаком. Этот раздел теории наследования можно было бы обозначить как *феноменальный* (феномен – явление постигаемое чувствами – зрение, слух и пр.), т.е. наследование, наблюдаемое и регистрируемое в гиб-

ридологических экспериментах за счет связи между генами и признаками [7].

Счетные признаки характеризуют число частей растения или число частей какого-либо органа (например, число листьев, соцветий, цветков, семян и плодов на растении, а также число структурных элементов в цветках и др.). Изменчивость счетных признаков подчиняется биномиальному закону (закону Кэтле) [6, 10]. В отличие от альтернативных, наследование счетных признаков, как правило, не подчиняется правилам Менделя (ОЦП). Среди счетных, есть признаки, относимые к таксономическим (архетипическим), которые идентифицируют один таксон (род или вид) от другого: их реализация наследственно детерминирована и они относительно стабильны.

Другую группу признаков составляют *континуальные*, к числу которых относят все или почти все линейные, поверхностные или объемные (весовые) признаки растений или отдельных их частей, получаемые путем измерений. Селекцию преимущественно интересуют именно континуальные признаки, для которых установить соответствие селекционируемого признака с активностью отдельного гена или определенного числа генов, как правило, не представляется возможным. В рамках менделевской парадигмы постулируется, что континуальные признаки контролируются большим числом генов, и потому их сегрегация в ряду поколений репродукции носит сложный (полигенный) характер и описывается уже не в частотах гено- и фенотипов, как при сегрегации альтернативных признаков, а на языке математической статистики [10]. Этот раздел теории наследования можно было бы обозначить как *ноуменальный* (умопостижимый), который не опирается на зависимость между активностью генов и реализацией признаков.

В последние десятилетия особый взгляд на наследственность развивается в рамках эпигенетической⁴ парадигмы (ЭГП), которая связана с открытием третьего типа изменчивости. В рамках ГЦП до середины 1920-х гг. считали, что фенотип особи напрямую определяется ее генотипом (одномерность связи «ген – признак»), хотя и признавалась возможность модификации фенотипа условиями среды. Другими словами,

¹ Ген – специфическая последовательность нуклеотидов в ДНК, детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК, или рибосомных РНК, или последовательность аминокислот в белках – структурные гены.

² Признак – любая черта, особенность или свойство, присущее отдельной особи или их группе.

³ Биометрия – совокупность приемов планирования и обработки данных биологического исследования методами математической (вариационной) статистики.

⁴ Эпигенетическими называют такие изменения в геноме и пластомере клеток, которые не связаны с изменениями в нуклеотидных последовательностях ДНК. Частоты эпигенетических изменений всегда бывает на несколько порядков выше, чем частоты генетических (мутационных) изменений [6, 7, 29, 68]. Эпигенетика – изменчивость в наследственном аппарате клетки (например, репрессия или дерепрессия генов), не связанная с изменениями (мутациями) в молекулах ДНК.

различали два типа изменчивости – наследственную и ненаследственную (модификационную). В 1927 г. Б.Л. Астауровым был открыт третий тип изменчивости, который он обозначил как «асимметричная» или «случайная» изменчивость [1]. Позднее этот тип изменчивости стали обозначать как «эпигенетическая» изменчивость [4].

Отдельную группу признаков у растений можно обозначить как морфологические. Как известно, общепринятой теории морфогенеза растений в целом не существует. Справедливо утверждение, что «геном и морфогенез — сущности совершенно разного порядка. <...> 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 самими, а <...> эпигенетическими факторами, прямо или косвенно связанными с морфогенезом» [3].

В рамках эпигенетической парадигмы (ЭГП) выделяются новые группы признаков – морфогенетические и репродуктивные, которые имеют специфическую изменчивость. Обозначим эти признаки как *фрактальные*, которые формируются в ходе морфогенеза растений или животных и потому не могут контролироваться отдельными генами напрямую. Например, процессы морфогенеза у растений описываются древовидными фракталами [9], а к числу фрактальных признаков у растений относят признаки сосудистых систем (ксилемы и флоэмы растений), признаки корневой системы, эмбриональные признаки растений и др.

Рассмотрим триаду признаков – *дискретные – континуальные – фрактальные* – и оценим их сходство и различие с математической точки зрения. Признаки этой триады четко различаются их геометрической размерностью – D^5 . Дискретные признаки с геометрической точки зрения это одномерные признаки, тогда как континуальные могут быть одно-, двух- или трехмерными, а фрактальные – всегда имеют *дробную* размерность [9]. Возвращаясь к репродуктивным признакам растений, отметим, что они

⁵ Размерность (D) любого геометрического объекта рассчитывается исходя из зависимости увеличения "размера" объекта S от увеличения его линейных размеров L. $D = \log(S)/\log(L)$. Для линии $D = \log(2)/\log(2) = 1$; для плоскости $D = \log(4)/\log(2) = 2$; для объема $D = \log(8)/\log(2) = 3$. В отличие от фигур евклидовой геометрии, фракталы – это геометрические объекты с дробной размерностью [9].

могут быть дискретными (число цветков, семян, плодов на растениях), счетными и фрактальными (эмбриональные структуры и др.). Счетные таксономические признаки растений, обычно находятся под жестким контролем генов (число частей и отдельных структур цветков). Изменчивость другой группы счетных признаков (число цветков, семян и плодов на растениях) контролируется внешними сигналами (например, плотностью размещения растений в фитоценозе), т.е. они по своей природе эпигенетические. Эмбриональные же признаки, и связанные с ними признаки клеток и тканей зародышевого пути, относятся к группе фрактальных и контролируются ходом морфогенеза (эпигенетически).

Столь же четко различаются понятия «признак» и «процесс». Процесс – это смена состояний во времени, т.е. совокупность последовательных действий по достижению некоего результата, конечного итога (например, онтогенез растения, производственный процесс и пр.). Подчеркнем, что онтогенез – это процесс, идущий вдоль оси времени, а изменчивость любого морфологического признака регистрируется в один из моментов времени, поэтому размах изменчивости этого признака, измеренный на разных этапах онтогенеза, всегда ортогонален оси времени.

С методологической точки зрения селекция отчасти опирается на четкие представления о наследовании отдельных признаков, и потому ее, с одной стороны, характеризуют как науку (опора на феноменологию наследственности), а с другой, селекцию рассматривают как искусство: опора на ноуменальные представления, где значительную роль играет интуиция селекционера.

Эпигенетика и репродуктивная биология растений. ЭГП открыла новые механизмы изменчивости, одним из замечательных результатов этого направления – открытие новых признаков и свойств, наследование которых возможно лишь в рамках ЭГП. Например, с эпигенетической изменчивостью связаны системы воспроизводства семян и процессы морфогенеза у растений. В частности, апогамные виды растений с теоретической точки зрения представляют особый интерес в том отношении, что функция пыльцы у этой группы не связана с донорством отцовского генома, а, следовательно, и с передачей генов от отца потомству. С одной стороны, цветки у апогамных (агамоспермных) видов по морфологии неотличимы от цветков гамоспермных видов. С другой стороны, пыльцевые зерна и трубки у апогамных видов выступают не как

доноры отцовского генома, но как сигналы (индукторы), активирующие запуск партеногенетического развития эмбрионов. Другими словами, пыльца и пыльцевые трубки выступают не в качестве донора отцовского генома, а в качестве «полового партнера» или в качестве сигнала, запускающего развитие эмбриона [11]. Понятие «половой партнер» указывает, что у агамных видов хорошо выражена прогамная фаза оплодотворения и отсутствует гаметогамная фаза оплодотворения (слияние мужских и женских гамет), однако партеногенетические семена у таких растений образуются в достаточно большом количестве. По нашему мнению, партеногенетическое развитие эмбрионов относится к эпигенетической изменчивости, и связано с получением клетками зародышевых мешков или семяпочек цветка внешних или внутренних сигналов, позволяющих перейти от одной программы развития (репродукции) к другой [7].

В ботанической литературе можно найти достаточно большое число примеров, в которых описаны иные, отличные и от гороха и от ястребинок (классические объекты исследований, введенные в эксперимент Г. Менделем), системы репродукции семян. Это приводит к тому, что у этих видов растений со специфической системой репродукции в гибридных потомствах

реализуются иные численные пропорции генотипов, отличные от пропорций, открытых Г. Менделем на горохе. Более того, способы репродукции семян у разных видов растений можно экспериментально регулировать, меняя сигналы из внешней или внутренней среды, т. е. осуществлять эпигенетическую регуляцию размножения.

Весьма вероятно, что виды растений можно классифицировать не только по морфологии, но и по репродуктивным стратегиям, связанным с их онтогенезами, которые могут быть похожими или отличными от репродуктивной стратегии репродукции семян у гороха и ястребинок, и не связанные с активностью отдельных генов. Репродуктивные признаки и процессы вполне попадают в круг проблем биологии развития, охватываемых рамками гомологической изменчивостью по Н.И. Вавилову. Все это указывает, с одной стороны, на различия онтогенетических программ развития, а с другой, на цикличность способов полового воспроизводства семян у растений. С теоретической точки зрения, это позволяет ставить вопрос о том, каким путем эволюционируют системы репродукции семян у растений – генетическим (мутационным и рекомбинационным) или эпигенетическим?

Настоящая работа выполнялась при финансовой поддержке гранта Президиумов СО РАН и НАНБ №3 (2012-2014 гг.), грантов РФФИ № 12-04-90000-Бел-а, №13-04-00012 и №13-04-90403.

Литература

1. Астауров Б.Л. Исследование наследственного изменения галтеров у *Drosophila melanogaster* // Журн. экпер. биологии. – 1927. – Т. 3, Вып. 1–2. – С. 1–61; Вып. 3–4. – С. 199–201.
2. Белоусов Л.В. Возможна ли общебиологическая научная программа? Философия биологии. Вчера сегодня, завтра. – М.: ИФРАН, 1996. – С. 109–115.
3. Белоусов Л.В. Морфогенез, морфомеханика и геном // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13, №1. – С. 29–35.
4. Васильев А.Г., Васильева И.А., Большаков В.Н. Феногенетическая изменчивость и правило Б.Л. Астаурова // Феногенетическая изменчивость и методы ее изучения. – Екатеринбург: изд-во Уральского ун-та, 2007. – С. 8–18.
5. Докинз Р. Эгоистичный ген // Пер. с англ. – М.: Мир, 1993. – 318 с.
6. Малецкий С.И. Биномиальные распределения в генетических исследованиях на растениях. – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2000. – 163 с.
7. Малецкий С.И. Семантическая структура понятий «наследственность» и «эволюция» // Информационный вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13., №4. – С. 820–852.
8. Малецкий С.И., Левитес Е.В., Батулин С.О., Юданова С.С. Репродуктивная биология покрытосеменных растений. Генетический словарь. – Новосибирск, ИЦиГ СО РАН, НГАУ МСХ РФ, 2004. – 106 с.
9. Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. – Москва, Ижевск, Ижевский инст. компьютерных исследований. НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2002. – 656 с.
10. Филиппенко Ю.А. Индивидуальная изменчивость // Изменчивость и методы ее изучения. Основы биологической вариационной статистики. – Ленинград, 1926. – С. 5–32.
11. Urbanska K.M. Pollen, mating and paternity in agamosperous angiosperms // Plant Species Biology. – 1994. – Vol. 9. – P. 57–67.

S.I. MALETSKII

*Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of Russian Academy of Science.
Russia, 630090, Novosibirsk, av. Lavrenteva, 10; e-mail: stas@bionet.nsc.ru*

GENO-AND ORGANISM-CENTRIC PARADIGMAS IN BIOLOGY

A connection of theoretical conceptions of the heredity and variability nature with replacement of paradigms in biology was considered in historical context. In the paper three complementary paradigms (organismocentris, genocentric and epigenetics) were discussed.

Key words: geno-and organismcentric paradigmas, biology.

ПІСКУН Р.П., КОЛОМІЄЦЬ Н.Г., ЛИСА Н.А., ВАЩУК А.А., ПОЛЕСЯ Т.Л.

*Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова
Україна, 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru*

ІСТОРІЯ БІОЛОГІЇ В ДАТАХ ТА ІМЕНАХ – ДО 80-РІЧНОГО ЮВІЛЕЮ КАФЕДРИ БІОЛОГІЇ ВІННИЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ім. М. І. ПИРОГОВА

Кафедра була організована в 1934 році в рамках фармацевтичного інституту, і тому була достатньо забезпечена наочними посібниками, препаратами, колекціями, реактивами, таблицями тощо. Першим завідуючим кафедрою був професор Севастьянов А., а першими асистентами кафедри були: А.У Новицький (вивчав молюски річки Південний Буг), М.І. Ельперина, яка займалась вивченням опісторхозу, М.В. Івасик, який виконував роботу «Практикум з фармакогнозії» (для фармінститутів) і В.Н. Пихтіна, яка в 1940 році захистила дисертацію на ступінь кандидата біологічних наук на тему: «Роль кори наднирників у розвитку рефрактерного стану щитоподібної залози» і після звільнення м. Вінниці від німецько-фашистських окупантів у 1944 році була призначена завідуючою кафедрою. Єдиного напрямку наукової роботи на кафедрі не було, хоча дослідження проводились досить цікаві в напрямках тогочасної лікувально-профілактичної медицини. Так, асистент О.О. Власенко вивчала біологію цвітіння первоцвіту і умови накопичення в ньому вітаміну "С". Разом з доц. А.Д. Бейкіною і ас. М.В.Івасиком брала участь в створенні фізико-географічного опису м.Хмільника і його околиць у зв'язку з відкриттям там підземних джерел радонової води. Пізніше колектив кафедри починає досліджувати питання паразитології. Асистент М.В.Івасик вивчав умови поширення глистних інвазій серед населення м. Вінниці. Асистент С.А. Худа вивчала поширення підвидів звичайного і малярійного комарів у Вінницькій області. До 1949 року були виконані дві наукові роботи, які мали медичне значення: "Глистні інвазії у дітей дитя-

чих закладів м. Вінниці" і "Дія екстрактів кори наднирників на нормальну щитоподібну залозу".

З 1952 року до вересня 1958 року кафедрою завідувала доцент А.Д.Бейкіна; нею були виконані роботи по вивченню джугу довгоплідного. Асистент П.Т. Зозуля проводив санітарно-гідробіологічне вивчення річки Південний Буг на ділянці Хмільник-Сабарів. На території інституту кафедрою була створена ділянка лікарських рослин площею 0,2 га. На ній було представлено до 20 груп лікарських рослин, серед яких відхаркуючі, вітамінні, сечогінні, блювотні, кровозупиняючі, інсектицидні, гіркі, глистогінні, потогінні, в'язучі та інші – всього більше 130 видів у відкритому ґрунті і більше 60 видів, розміщених в навчальних кімнатах та коридорі кафедри.

У 1957-1958 навчальному році кафедра отримала нове приміщення, де створюється біологічний музей. У ньому було зосереджено багато рідкісних рослин: гінґо, женьшень, тис, соромлива мімоза, живородна папороть, араукарія, криптомерія, монстери, різні види кактусів, агав, пальм і ін. Крім рослин у біологічному музеї були представлені колекції тварин у вигляді опудал, муляжів, скелетів та вологих препаратів. Тварини розміщувалися в еволюційному порядку у виставкових шафах. Тут, крім представників місцевої фауни, були наявні морські форми, що були завезені з інших країн та континентів. Окремо був створений куточок з медичної паразитології, де були представлені гельмінти людини: ціп'яки, стьожакі, котячий і печінковий сисун, ехінокок, гострики, аскариди, трихіNELI та ін. В ті роки музей поповнювався багатьма екс-

понатами. З молюсків, крім прісноводних форм, були каракатиці, восьминоги, тридакна, морське вушко, мурекс, морські гребінці. З членистоногих – різноманітні ракоподібні, особливо цікаві краби – самурайський, камчатський розміром до 60 см., та ще отруйні тварини і переносники захворювань: скорпіони, павуки, кліщі, сколопендри та ін. Нижчі хордові були представлені в музеї ланцетниками і асцидіями. З хребетних викликали особливий інтерес варани, біла чапля, глухарі, альбатрос, єнотовидний собака, опосум (сумчаста тварина). Доглядала і оберігала музей препаратів М.П. Дорошкевич, але активну участь у створенні музею і поповненні його новими експонатами брали всі співробітники кафедри і студенти. В музеї проводились не лише заняття зі студентами, екскурсії зі шкіл, але й семінари вчителів-біологів, рибоводів міста і області. Біологічний музей і ділянка лікарських рослин стали свого роду допоміжним навчальним пунктом для студентів 1-го курсу по біології і 3-го курсу по фармакогнозії і фармакології. Були розпочаті роботи по паркових насадженнях на присадибній ділянці морфологічного корпусу (оксамитове дерево, платани, клени, горіхи та ін.).

У зв'язку з переслідуванням учених, які були не згодні з поглядами академіка Т.Д. Лисенка, доцент А.Д. Бейкіна була звільнена з інституту і обов'язки завідуючого кафедрою біології в 1958-1959 навчальному році виконував асистент П.Т.Зозуля, який працював на кафедрі з 1939 року. Він і доц. К.Д. Пилипенко (з Київського медичного інституту) читали лекційний курс.

У 1959 році завідуючим кафедрою біології було обрано професора, доктора біологічних наук Г.А. Машталера, який на цій посаді працював 4 роки. Під його керівництвом колектив кафедри займався розробкою питань вегетативної гібридизації тварин. Досліджувався вплив ембріональної тканини організмів на зміни морфогенезу, загоєння ран та ін. Проф. Г.А. Машталер працював над темою «Морфогенетичні зміни сільськогосподарських птахів під впливом тканин зародків інших видів». Проводились роботи по вивченню взаємодії щитоподібної і прищитоподібної залоз, вплив пантокрініоду на загоєння ран та ін. До підручника "Дарвінізм" під редакцією П.Л. Іванченка проф. Г.А. Машталер написав три розділи: «Досягнення мічурінської біології за кордоном», «Головні напрямки еволюційного процесу» і «Походження життя на Землі». В 1961 році на кафедру прийшла асистентом Н.А. Лиса, яка розробляла тему: "Біологічна дія

радіоактивної води Хмільницького курорту на організм деяких безхребетних". Асистент П.Т. Зозуля виконав дослідження по темі: «Морфологічні зміни у курей під впливом тканин зародка інших порід». Були отримані особини з морфологічними ознаками інших порід. Ним також проводились експерименти по заміні частини білка яєць різних порід курей, качок. Були отримані особини з морфологічними ознаками, характерними для породи донора, вони відрізнялись більшим зростом. Професор Машталер Г.А. до переїзду у Вінницю певний час перебував на посаді директора інституту марксизму-ленінізму в м. Москві. Наукові погляди професора не співпадали з поглядами Т. Д. Лисенка. Професор Машталер Г. А. приймав участь у дискусії між класичними генетиками і мічурінськими, про що в 1936-1939 р.р друкувалось в політичному журналі «Под знаменем марксизма», який після 1945 року був перейменований в «Вопросы философии». Ім'я професора Машталера Г.А. належить до тих вчених, які пройшли мужній шлях битви за збереження і розвиток генетики у нашій країні. Дух боротьби за матеріалістичну генетику він підтримував і у нас в інституті, виступаючи з програмними доповідями на засіданнях Вченої ради. До нього прийнятними можуть бути слова Ернеста Хемінгуея з повісті «Старий і море»: «Людина не для того створена, щоб терпіти поразку; людину можна знищити, але не можна перемогти.». На основі доносів і критики з боку партійного керівництва за ідеологічну і наукову направленість поглядів професора Машталера Г.А. в 1963 році було звільнено з медичного університету. З 1963 до 1964 року обов'язки завідуючого кафедрою виконувала к.мед.н. Н.П. Лізогуб.

З 1964 року кафедрою завідував доцент М.А.Палій, який вніс новий напрямок в наукову роботу кафедри по вивченню найнебезпечніших гельмінтозних захворювань людини і тварин (опісторхозу, ехінококозу, трихінельозу), паразитофауни риби, санітарно-гідробіологічного дослідження водойм і різностороннього дослідження осередку опісторхозу в басейні р. Південний Буг. Асистент П.Т.Зозуля вивчав фіто- і зоопланктон ставків рибгоспів Вінницької області і їх санітарний стан. Асистент С.Д. Волощук досліджувала ехінококоз тварин і людини Вінницької області. В 1966 році асистентом кафедри була зачислена кандидат біологічних наук Н.Г. Коломієць, яка захистила дисертацію «Вплив позакореневого живлення мікроелементами на фізіологічні та біохімічні процеси гороху», навчаючись в аспірантурі Харківського

сільськогосподарського інституту ім. Докучаєва. Н. Г. Коломієць ще в студентські роки мала можливість спостерігати Т.Д. Лисенка на засіданнях наукового гуртка, куратором якого він був, та на обходах дослідних ділянок і лабораторій інституту генетики і селекції ім. академіка Лисенка в м. Одесі і завжди дивувалася його малослівності і відсутності оцінок того, що йому представляли. Наукова робота за методами Т.Д. Лисенка в 1959– 963 р.р почала викликали сумніви у можливостях досягти намічених перспектив. Міжвидове схрещування рослин спричинювало такі зміни у нащадків, що унеможливило їх конкурентоздатність. Після 1964 р. почалося виправлення помилок догматизму в біологічних науках, а, починаючи з 1966 р., у програму біології всіх вузів СРСР був введений курс «Генетика». В 1972 році асистент Н.А. Лиса захистила кандидатську дисертацію на тему: "Розповсюдження стовбняка і сибірської виразки у зв'язку з ґрунтово-кліматичними умовами лісостепової і Поліської зон України". Робота була виконана під керівництвом завідувачого лабораторією особливо небезпечних інфекцій Київського інституту епідеміології і мікробіології професора Коротича С. С (батька Віталія Коротича – лікаря, поета, громадського діяча, пізніше головного редактора журналу «Огонёк»). Лабораторія на той час була провідною у вивченні епідеміології сибірки, де вперше була експериментально доведена можливість розмноження збудника сибірки за певних умов в ґрунті, а відтак тривалий час збереження осередків не лише завдяки спорам збудника. Колективом співробітників лабораторії була створена атмосфера доброзичливості, допомоги, поваги до пошукувачів. Особливо чуйним був старший науковий співробітник Щербак Юрій – професор, письменник, громадський діяч, пізніше посол України в США, який рецензував дисертаційну роботу Лисої Н.А. Кафедра поповнюється новими викладачами: з 1969 року прийшла асистент Р.В. Балевська, з 1974 року – асистент Богачук Г.П., з 1976 року – асистент Л.В.Тіндаре. З 1975 року викладацьку роботу на кафедрі біології розпочав асистент А.А.Ващук вже маючи трьохрічний досвід роботи в медінституті на кафедрі нормальної фізіології. В цей час він не тільки освоював новий предмет і формувався як фахівець з біології, але і працював над кандидатською дисертацією по радіобіології, особливу роль в закінченні і захисті якої відіграли консультативна і практична допомога головного радіолога України д. мед. н., професора Кіндзельського Л. П., а також використання досвіду

таких визначних біологів з Київського медичного інституту як професора Дишлового В. Д та доцентів Геніна Д. І. і Пилявської С. М.

З 1977 року, після виходу доцента М.А.Палія на пенсію, завідувачим кафедрою було обрано доцента М.Г.Поливоду. Наукова робота з того часу на кафедрі виконувалася по кількох темах. До 1983 року велися дослідження з вивчення впливу вібрації і шуму на організм, який росте, а з 1984 до 1989 року вивчалися питання схильності до дерматомікозів на основі кореляції з генетичними маркерами. В 1978 році доцент А.А.Ващук захистив кандидатську дисертацію на тему: "Застосування пониженого барометричного тиску для виявлення наслідків променевого ураження", в 1987 році Л.В.Тіндаре – на тему: "Морфофункціональна перебудова печінки імбредних щурів при дозованих фізичних навантаженнях в умовах гіпокінезії". У цей час на кафедрі почали працювати молоді викладачі: О.Л. Северова, В.О. Беньямінов, О.В.Паламарчук. Кафедру в 1987 році перевели в учбовий корпус № 2.

У 1993 році завідувачою кафедрою обрано доктора біологічних наук, професора Раїсу Петрівну Піскун, яка з 1972 року працювала в медичному інституті спочатку на кафедрі фармакології, а потім на кафедрі гістології, де під керівництвом відомого фармаколога, заслуженого працівника освіти, д. мед. н., професора, А. А. Столярчука в 1980 р. захистила кандидатську дисертацію на тему: «Морфологічне дослідження впливу деяких похідних бензофурана при експериментальному атеросклерозі в порівнянні з клофібратом», а в 1992 р. – докторську дисертацію «Функціональна морфологія внутрішніх органів при експериментальному холестеринозе и его коррекции препаратами разного механизма действия». Професор Піскун Р.П. є автором і співавтором понад 300 наукових праць, у т.ч. монографії «Вінборон – лікарський засіб з політропними фармакологічними ефектами», підручника «Медична біологія», 10 посібників та 5 практикумів, має 5 патентів на винаходи. Очолює обласне товариство клітинних біологів, працює членом спеціалізованої вченої ради із захисту кандидатських та докторських дисертацій при Тернопільському державному медичному університеті імені І.Я. Горбачевського, є членом редакційної колегії фахових журналів «Вісник Вінницького національного медичного університету» та «Вісник морфологія», членом правління міжнародної асоціації паразитологів. Брала участь в міжнародних наукових зібраннях у Тель-Авіві, Санкт-Петербурзі, Москві,

Кишеневі, Любліні. Піскун Р. П. – заслужений працівник освіти України, лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки.

В 1994 році на кафедрі прийшла к. б. н. Полєся Т. Л., яка захистила кандидатську дисертацію на тему „Экспериментальное исследование гипополипидемического действия и безвредности энтеросорбента полисорба” у Московському науково-дослідницькому інституті фармакології, де в 1992 році разом з співробітниками цього інституту (керівник проекту – д. мед. н. професор Яворський А.М., який в ті роки очолював редколегію журналу «Экспериментальная и клиническая фармакология») брала участь у складанні методичних рекомендацій по доклінічному вивченню сорбентів нового покоління по заказу Фармкомітету МОЗ Росії, а в 1993 і 1995 р.р. брала участь у підготовці та оформленні документації для подачі в Фармкомітет МОЗ Росії (Москва), та МОЗ України (Харків) для отримання дозволу на використання сорбента багатопланової дії «Полісорб», «Силлард П», «Силікс» для аплікаційного та ентерального застосування у дорослих і дітей.

На даний час на кафедрі працюють: доцентами – Н.А. Лиса, Н.Г. Коломієць, А.А. Ващук, Т.Л. Полєся, Т.І. Шевчук, С.М. Горбатюк; асистентами – кандидати біологічних наук Шкарупа В.М і Гринчак Н.М, кандидат педагогічних наук Хлєстова С.С., Білошицька А.В., Мусатова К.В., Спрут О.В., Климчук І.М.; старшими лаборантами Скрибан Т.В., Міньковська Н.Є. і лаборантами Борисенко Г.І, Корнійчук В.І. У зв'язку з переходом на нову програму і кредитно-трансферну накопичувальну форму вивчення предмета основні зусилля співробітників спрямовані на учбово-методичну роботу. Удосконалення навчального процесу іде різними напрямками: як шляхом підвищення якості викладання, так і шляхом технічного оснащення навчального процесу. На кафедрі обладнані 2 комп'ютерні класи із виходом в «Інтернет» для самопідготовки студентів та контролю їх рівня знань. Велика увага приділяється індивідуальній роботі зі студентами. Особливо це стосується розділу "Генетика", де до кожного заняття для студентів розроблені індивідуальні завдання, куди входять як теоретичні питання, так і задачі, що мають конкретну клінічну спрямованість. Виходячи з того, що за останні 20 років учбова програма кафедри змінювалася 4 рази і викладачі кафедри нагромадили немалий досвід у методичній роботі за поточні роки, кафедрою розробляються науково-методичні матеріали та створюються методи-

чні вказівки, посібники, рекомендації, а також інші дидактичні і методичні матеріали для вітчизняних і іноземних студентів українською, російською та англійською мовами.

Щодо науково-дослідної роботи, то вона проводиться під керівництвом проф. Р.П. Піскун у рамках прикладної морфології і останні десять років по темі: «Морфофункціональний стан кровоносного русла та клітинних елементів органів і тканин при експериментальному атеросклерозі в умовах фармакокорекції та генної терапії» при взаємозв'язках з науково-дослідним інститутом молекулярної біології і генетики (м. Київ) з медичним університетом №2 (м. Москва), кафедрою клінічною імунології, генетики і медичної біології (м. Одеса). За цей час виконано і захищено 5 кандидатських дисертацій:

Паламарчук О. В – «Особливості морфофункціональних змін печінки щурів під впливом парацетамолу і алілового спирту та при застосуванні антиоксидантів» (2003);

Шевчук Т. І – «Структурно-функціональні зміни серця при експериментальній дисліпопротеїдемії та за умов корекції різними препаратами» (2007);

Горбатюк С. М – «Морфофункціональні особливості головного мозку при експериментальній дисліпопротеїдемії» (2008);

Гринчак Н. М – «Особливості структурно-функціональних змін в серці при експериментальному атеросклерозі та за умов генної корекції» (2012);

Піскун І. І – «Морфофункціональна характеристика щитоподібної залози при експериментальному атеросклерозі та за умов генної терапії» (2013);

Готуються до захисту ще дві дисертаційні роботи:

Білошицька А. В – «Структурно-функціональні зміни печінки при експериментальному атеросклерозі та за умов генної корекції»;

Ромашкіна О. А – «Структурна організація нирок за умов експериментального атеросклерозу і його корекції».

З 1948 року на кафедрі працює студентський науковий гурток. Члени гуртка виступали на засіданнях і загальноінститутських студентських конференціях нашого інституту та інших вузів України з доповідями з різних питань досягнень біологічної науки і з результатами власних досліджень по гіпотермії, гелмінтах та інших темах під керівництвом викладачів кафедри.

Література

1. Основные этапы и направления деятельности Винницкого медицинского института им. Н. И. Пирогова (Материалы юбилейной научной конференции ВМИ), «Здоров'я», Киев, 1969. – С. 47–49.
2. Вінницький державний медичний університет ім. М. І. Пирогова: матеріали з історії університету / під ред. В.М. Мороза. – Вінниця, 1994. – С. 28–31.
3. Професор Піскун Раїса Петрівна (до ювілейного дня народження) // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2011. – Т. 10, №1. – С. 110–111.
4. Науково-освітній потенціал України. Відомі імена в освіті і науці. Піскун Раїса Петрівна. – Київ, 2012. – С. 228.

PISKUN R., KOLOMIETC N., LISAYA N., VASCHUK A., POLESYA T.

Vinnitsa National Medical University n.a. by M. Pirogov

Ukraine, 21018, Vinnitsa, Pirogov str., 56 e-mails: piskyn2006@mail.ru

HISTORY OF THE BIOLOGY DEPARTMENT IN DATES AND NAMES – TO THE BIOLOGY DEPARTMENT 80th ANNIVERSARY OF VINNITSA NATIONAL M. PIROGOV MEDICAL UNIVERSITY

The Aim is to investigate the stages of the biology department development in higher medical institution of Ukraine in the aspects of the political system conception change. **Methods.** Searching and descriptive methods have been used which allowed to determine the basic steps in the history of the biology department in the chronological order. **Results.** The main directions of activity and names the department co-workers, contacts with other universities and research establishments of Ukraine and the Soviet Union have been determined. **Conclusions.** The history of the biology department reflects the history of biology science in our country in dates and names.

Key words: history, biology department, Vinnitsa national M. Pirogov medical university.

РУБАН Ю. Д.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Украина, 62341, Харьковская обл., Дергачевский р-н, пгт. Малая Даниловка, ул. Академическая, 1, e-mail: zoovet@zoovet,kharkov.ua

ИСТОРИЧЕСКИЙ МЕТОД В ИЗУЧЕНИИ МАКРОЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

В современной практике селекции животных преобладают интенсивные методы для получения максимальной продуктивности. Это имеет отношение ко всем видам животных, в том числе и к крупному рогатому скоту. В связи такими методами селекции в молочно-мясном скотоводстве возникли проблемы, приведшие к резкому снижению качества продукции, продолжительности продуктивного долголетия животных, увеличению количества заболеваний.

Такая односторонняя селекция в животноводстве не отвечает научным требованиям, так как она не учитывает на протяжении длительной эволюции особенностей определенного вида.

Биологические особенности животных – результат макроэволюции, которые можно уста-

новить при помощи исторического и других методов исследования. За последнее время значительно возросло внимание к историческому методу исследования, так как он позволяет изучить биологические особенности, которые надо учитывать в селекции животных. По каждой науке, в том числе и по зооинженерии, ведутся исследования и защищаются кандидатские и докторские диссертации по истории наук. Впервые исторический метод в биологии был предложен К. А. Тимирязевым (1843-1920 гг.), которому в этом году исполняется 170 лет со дня рождения.

Вот те основания, которые послужили для написания настоящей статьи и издания монографии на вышеназванную тему в 2013 году.

Материалы и методы

Материалом для написания статьи и издания монографии стали результаты моих исследований с использованием палеонтологии и дру-

Результаты и обсуждение

Основой исторического метода в животноводстве должна стать эволюция пород и их типов на протяжении длительного времени. Типы животных, их конституцию определяют селекцию и технологию самого технологического процесса.

Эволюционные изменения животных происходят на макро- и микроуровнях.

Макроэволюционные процессы можно проследить у млекопитающих на протяжении сотен миллионов лет. Так, эволюцию европейского тура можно проследить по данным палеонтологии за 220 млн. лет.

На основании указанных данных млекопитающие резко изменились, особенно вся их конституция, и особенно пищеварительная система, при помощи которых осуществляется тесная связь организма с внешней средой.

Для автора статьи первоначальными были лекции по зоологии профессора Е. И. Лукина, которые я слушал будучи студентом I курса Харьковского зоотехнического института. На этих лекциях у меня сформировалось общее представление об эволюции органического мира.

Далее консультации заведующего отделом происхождения млекопитающих Московского палеонтологического института, старшего научного сотрудника Б. А. Трофимова. Эта консультативная помощь имела отношение к конкретной проблеме – происхождению млекопитающих.

Важным этапом было сотрудничество с моим научным руководителем по кандидатской диссертации академиком Н. Д. Потемкиным и его рекомендательное письмо профессору Московского института морфологии и экологии животных имени А. Н. Северцова.

С. Н. Боголюбскому и его консультации мне. Помог мне разобраться в важных вопросах эволюции профессор Киевской сельскохозяйственной академии Н.Н. Колесник. Большая моя благодарность всем им и возможность вспомнить их добрыми словами.

В системе селекционной и технологической работы надо учитывать макроэволюционные процессы на уровне всего вида животных за период возможный для такого изучения. Чем более тщательней селекционер учитывает эво-

гих наук, прежде всего исторического метода исследования.

люционные изменения на макроуровне, тем научно обосновываются современные методы и приемы при работе с уже созданными породами и в пороодообразовательном процессе.

В монографии А. И. Бобков, А. С. Бобкова [1] убедительно доказана в современных условиях значение макроэволюционных процессов для выяснения перспектив развития.

Первыми живыми организмами на Земле были бактерии и водоросли, которые могли существовать автотрофно за счет усвоения неорганических веществ.

Условия для возникновения животных организмов появились тогда, когда образовался свободный кислород в атмосфере и в водной среде, а также запасы корма для животных.

Возникнув, животный мир в дальнейшей эволюции, был тесно связан с теми кормами, которые ему обеспечивали растения. Это один из непосредственных и важнейших факторов эволюции для животного мира.

Нами на основании изучения данных о происхождении млекопитающих разработана филогения крупного рогатого скота. Используя данные палеонтологии [2–4, 8, 9], были установлены этапы филогении млекопитающих [6] и определены признаки для оценки селекционного процесса [5].

Так, данные палеонтологической науки подтверждают определяющую значимость в длительной макроэволюции млекопитающих (вид – собственно крупный рогатый скот) специализации организма к поеданию растительной пищи, приобретение сложного четырехкамерного желудка и жвачного типа пищеварения.

Характерными для животных жвачного типа пищеварения и сложного желудка были медленные темпы эволюции и ускорение ее в связи с усложнением организма. В рубце таких животных до 85% переваримого сухого вещества рациона трансформируется в высокоценные продукты питания, что определяет в селекции направленность работы по созданию животных желательного типа.

На различных этапах развития селекция животных, как и растений, превратилась из искусства в стройную и сложную науку – составную часть технологического сельскохозяйственного процесса. В этом превращении работы Ч.

Дарвина, П. Н. Кулешова, М. Ф. Иванова, Н. Д. Потемкина и других выдающихся ученых в животноводстве имели решающее значение.

В настоящее время селекция животных стала отраслью сельскохозяйственного производства, о чем уже отмечал Н. И. Вавилов. Было установлено, что макроэволюционные процессы включают такие элементы, связанные с селекцией животных:

- этапы и темпы филогенеза животных;
- эволюцию типа пищеварения и других систем организма;
- стадийность и критерии эволюционного процесса;
- взаимосвязь макро- и микроэволюционных процессов;
- глобальный эволюционизм;
- сальтационизм (скачкообразность) в эволюционном процессе;
- монофилию таксонов и параллельную эволюцию организмов;
- прерывистое равновесие в макроэволюции.

В этих сложных процессах макроэволюции стали основными критериями происхождения и тип животных. Нами были определены типы конституции по использованию животных (деградирующий, неперспективный и перспективный), которые устанавливаются оценкой по комплексу признаков.

Оценка адаптационной способности животных дали основание на устранение стресс-факторов, разработку и внедрение технологий с оптимальным режимом использования животных, разработку новых типов помещений, исключающих развитие стресса, селекцию на стрессоустойчивость, внедрение антистрессовых рационов, разработку методов фармакотерапии и фармакоприфактики на тех этапах технологического цикла, на которых невозможно устранить стрессовые факторы.

Продолжительность хозяйственного использования животных приобрело в системе племенной работы большое значение, что связано с племенными, хозяйственными и экономическими показателями стад и хозяйств в целом.

Значительно возросло значение комплексных научных подходов к оценке негативного влияния разрушительных биологических, технологических, селекционных и других факторов, ведущих к безвозвратной потере ценных генотипов животных, что ставит безотлагательную задачу сохранения здорового и высокоценного

генофонда сельскохозяйственных животных.

В этом процессе обозначилась проблема ресурсосбережения производства в системе: земля – растения – корм – животные – продукция.

На конкретном примере молочного скотоводства можно показать сложность селекционных и других факторов на показатели продуктивности коров.

Для этих целей взяты следующие показатели: величина удоя и живая масса коров, расход кормов на продукцию и на корову, состав сухого вещества корма в рационах коров и др. Если за 100% принять средний удой коров за год 5000 кг молока, то затраты корма (в сухом веществе) повышаются на единицу продукции на 21,4% при годовом удое 2500 кг, тогда как при удое 10000 кг молока – 65,3% по сравнению с 5000-ным удоем. Однако с таким разным повышением продуктивности значительно уменьшается продолжительность продуктивного долголетия коров. Так, в США на молочных комплексах такая продолжительность менее 3-х лактаций (2,8 года), что ведет к значительному повышению затрат на выращивание и содержание телок и нетелей. При таком резком повышении продуктивности снижаются защитные функции у животных (увеличиваются заболевания маститом, болезни конечностей и др.), а также ухудшаются качественные показатели молока (жир, белок).

Поэтому, в Швейцарии и других странах интенсивно стали вести селекцию на продолжительность продуктивного долголетия коров и достижения 100000 удоя за все лактации. В Швейцарии по данным 2012 года указанные показатели были достигнуты в 11-15 лет коров [10].

Как показывает длительная селекционная практика, односторонняя селекция по молочнойности без учета крепости конституции организма приводила к пагубным последствиям. Классическим примером тому может быть селекция западно-европейского молочного скота на начало XX века, когда изнеженность конституции по односторонней молочности привела к поголовному туберкулезу животных. Таким образом, селекционное плато (предел) ограничивает возможность селекции по односторонней молочности животных, необходима комплексная оценка с обязательным учетом крепости конституции организма.

Выводы

1. Большое значение в изучении макроэволюции животных принадлежит палеонтологии, используя данные которой можно определить основные этапы эволюционного процесса.

2. Установление этапов филогении млекопитающих (крупного рогатого скота) дало возможность определить наиболее важные селекционные признаки, среди которых специализация организма к поеданию растительной пищи, приобретение сложного четырехкамерного желудка и жвачного типа пищеварения.

3. Макроэволюционные процессы подтверждают, что определяющими для современной селекции жвачных являются типы конституции организма с установлением перспективного, неперспективного и деградирующего типов.

4. Односторонняя селекция на максимальную молочность коров без учета крепости конституции организма и продолжительности продуктивного долголетия должна быть заменена на учет комплекса признаков с обязательным включением крепости конституции животных.

5. При планировании структуры рационов коров надо повышать требования к учету биологических особенностей, в том числе и типа пищеварения животных.

Литература

1. Бобков А.И. Бобкова А.С. Тайное и явное в эволюции жизни и сознания: Размышления о главном. – М.: «Элит – 2000», 2003. – 624 с.
2. Боголюбовский С.Н. О путях к овладению эволюцией домашних животных // Сб.: Проблемы происхождения эволюции и пороодообразования домашних животных. – М. Л., 1940. – С. 7–52.
3. Боголюбовский С.Н. Проблемы эволюционной морфологии домашних животных // Известия АН СССР. Серия биологическая. – 1936. – № 2–3. – С. 317–374.
4. Боголюбовский С.Н. Происхождение и преобразование домашних животных. – М.: Советская наука, 1959. – 593 с.
5. Рубан Ю.Д. Биология и эволюция в селекции животных и технологии производства – К.: Аграрная наука, 2005. – 224 с.
6. Рубан Ю.Д. Происхождение крупного рогатого скота и селекционный процесс. – К.: Аграрная наука, 2003. – 292 с.
7. Тимирязев К.А. Исторический метод в биологии. 10 общедоступных чтений. Сочинения. – Т. VI. – М.: Сельхозгиз, 1939. – С. 9–237.
8. Трофимов Б.А., Решетов В.Ю. Азия как центр развития млекопитающих // Природа. – 1975. – №8. – С. 32–43.
9. Трофимов Б. А. Происхождение, история и некоторые закономерности развития жвачных (*Ruminantia*) // Сб. В.О. Ковалевской: Собр. науч. Трудов. – Т. 2. – М.: Изд. АН СССР, 1956. – С. 287–299.
10. Nene 100000 er Kuhe im 3. Quartal / Swiss hezdbook, bulletin. – 8/2012. – P. 33–36.

RUBAN Y.D.

Kharkiv State Academy of Animal Health

Ukraine, 62341, Kharkov region, Dergatchovskiy district, settlement Malaya Danilovka, Academic street, 1, e-mail: zoovet@zoovet.kharkov.ua

HISTORICAL METHOD BY INVESTIGATION OF MACROEVOLUTIONS PROZESSES IN ANIMAL BREEDING

Aims. Main aim was the definition of direction in selection animals in modern and future pedigreg works on basis macroevolutions prozesses in mammalias (cattle). **Methods.** Historical and analytical methods, permissible the defeniting macroevolutions changes concerning modern condition of selection to dairy cattle. **Results.** On basis of paleontological facts has been determined most important spezialisation of animals to eating vegetable feed, development polygastric stomach and ruminant type of digestion, that requiremented in modern selection and technology use rations to high productivity with higher energy contentation ducto increased consumption of concentrated feeds, above 50% of nutritive value. One- sided selection for milking of dairy cattle, not typical fo ruminants results to excessive tender of body – constitution, limiteu productive longevity, that connected with varions diseases (mastitis, acidosis, laminites and other) and low quality of production. In these conditions importante to raise demands to strength of body constitution and take into account of biological peculiaritys of organism including digestive system. **Conclusions.** By study macroevolution of animals the facts of paleontology gives a possibility to determine the stages of philogeneses of

mammalias (cattle). One- sided selection on maximum productivity must take into account the strength of organisms constitution.

Key words: macroevolutions processes, animal breeding, historical method.

СТЕЛЬМАХ А.Ф., ФАЙТ В.І.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України

Україна, 65036, Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: stegen@ukr.net; faygen@ukr.net

ІСТОРІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ З ГЕНЕТИКИ РОСЛИН У СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНОМУ ІНСТИТУТІ ПРОТЯГОМ 100 РОКІВ

Історія біологічної науки взагалі і генетичних досліджень зокрема на теренах колишніх Російської імперії і Радянського Союзу включає особливий 30-річний період панування так званої мічурінської біології (точніше «лисенківщини»), нехарактерний для світової науки в цілому. У становленні та розвитку цього напрямку (а пізніше і в подоланні його наслідків у науководослідних установах аграрного профілю) далеко не останню роль відіграв саме Селекційно-генетичний інститут (СГІ) в Одесі. Теперішнє покоління науковців майже не обізнане з особливостями тих періодів розвитку генетичних досліджень сільськогосподарських культур. Це вимагає здійснити спробу ретроспективного аналізу хоча б основних аспектів їх еволюції не стільки з метою опису негативних або позитивних рис, скільки для розвінчування деяких міфів, які упродовжуються у свідомість молоді окремими (навіть і сучасними) спеціалістами.

Засноване в 1895 р. Південне товариство сільського господарства створило в 1912 р. Комітет керування Одеським дослідним полем, який 8 березня 1912 р. доручив започаткувати селекційну роботу Андрію Опанасовичу Сапегіну. І саме відтоді бере свій початок історія Селекційно-генетичного інституту як наукової установи. На базі селекційного відділу Одеського дослідного поля в 1918 р. було створено Одеську селекційну станцію, яку з 1 жовтня 1928 р. перетворено на Український генетико-селекційний інститут (пізніше – Всесоюзний селекційно-генетичний інститут, а нині з часів незалежності України – Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення НААН України). Непростий шлях, що його довелося пройти інституту за цей час, детально викладено в публікаціях академіка НААН Лифенка С.П. [1, 2]. Історія ж відділу генетики як самостійного наукового підрозділу розпочинається з 1928 р., тобто саме з часу за-

снування Українського генетико-селекційного інституту. На той час у відділі під керівництвом виконуючого обов'язки завідувача працювало 2 наукових співробітників та 2 техніки.

Як керівник наукової установи один з видатних учених свого часу А.О.Сапегін з самого початку її заснування повністю усвідомлював, що досягнення в селекційній роботі нерозривно пов'язані з генетичними дослідженнями як основою для розробки методів селекції. Вже в 1912 р. він чітко заявив про це опублікованими книжками [3, 4]. Протягом усіх років селекційної роботи він (пізніше разом з сином Л.А.Сапегіним та рядом співробітників) інтенсивно займався генетичними дослідженнями, що засвідчують й окремі його публікації [5]. Експериментальна робота була спрямована на вирішення питань генетичного та цитогенетичного аналізів, досліджень внутрішньовидової та віддаленої гібридизації пшениць, розробку методу беккросів, застосування вперше у світі рентгєнівських променів з метою мутагенезу рослин, вивчення особливостей природного добору в гібридних популяціях. Загалом цей початковий період діяльності інституту характеризувався чітким усвідомлюванням, що генетичні дослідження (на тогочасному рівні) передують і мають бути основою майбутніх селекційних досягнень, що й підтвердила подальша історія інституту, незважаючи навіть на явні відхилення від класичної генетики.

У 1929 р. в інституті старшим спеціалістом відділу фізіології (морфології рослин) почав працювати Трохим Денисович Лисенко, інститут поступово стає осередком прихильників так званої «мічурінської біології». Розбіжності у поглядах директора інституту з командою «яровизаторів» (так в одній з книг В.Сойфера визначено прибічників Т.Д.Лисенка [6]), поступовий тиск обласного адміністративно-партичного апарата, особисті сімейні негаразди співпали із

запрошенням від М.І.Вавилова і змусили на від'їзд у 1933 р. Сапегіна до Ленінграду. Фактичне наукове керівництво інститутом переходить до Лисенка (при директорстві Ф.С.Степаненка), який згодом стає і юридичним директором. Досліди з класичної генетики призупиняються, і вся експериментальна робота переорієнтовується на рейки «мічурінської біології».

Цей період розвитку біологічної науки в країні було неодноразово описано з різних точок зору дослідниками як у Радянському Союзі, так і за його межами. З останніх публікацій зазначимо статтю Д.Урсу [7] і 2 розділи у вже названій книзі (стор. 25–43, 56–65) С.П.Лифенка [2]. Сумарно ці дві публікації можуть дати майже повне уявлення, що діялося з біологічною наукою та сільськогосподарським виробництвом протягом 3 десятиріч. Але кожна з них окремо, як і більшість попередніх робіт, не позбавлена суттєвих недоліків. Головними з них є суб'єктивний підхід до опису фактичного матеріалу і недооцінка (або замовчування) головних причин розповсюдження «лисенківщини» як явища державного масштабу.

На наш погляд, «лисенківщина» 30-60-х років як явище в біологічній науці повністю відповідає відомому багатьом явищу «распутінщини» наприкінці занепаду Російської імперії. Тільки роль Распутіна грав Лисенко, а ролі родини царя та пропагандистів першого для останнього виконував увесь державний партійно-адміністративний апарат на чолі з Й.В.Сталіним (а потім і М.С.Хрущовим, тобто **система!**) та прибічники і послідовники, які «знаходили» фальшиві докази для помилкових ідей. При наявності обставин для вільних наукових дискусій і об'єктивних методично бездоганних експериментальних перевірок явище «лисенківщини» не мало б ніяких підстав для панування в науці. Але ж лише одного висловлювання Сталіна на з'їзді колгоспників у 1935 р. («Браво, товарищ Лысенко, браво!») виявилось достатнім не тільки для припинення будь-яких дискусій і критик. Послідовники класичної генетики (=прибічники хромосомної теорії спадковості) з ярликом «вейсманісти-морганісти» піддаються повній обструкції та запроваджуються їх масові репресії. Для напряму «мічурінської біології» підводять «ідеологічне (філософське) обґрунтування соціалістичної науки», що розв'язує руки апарату **системи**. А далі було те, що було! І провина в цьому не тільки (скоріше не стільки) Лисенка, скільки **системи!**

Головною вихідною помилкою Лисенка було несприйняття ним хромосомної теорії спа-

дковості, заперечення матеріальних її носіїв, що можуть змінюватися мутагенезом або рекомбіногенезом. Спадковість розглядалася як комплексна властивість організму, яка здатна змінюватися (=«**виховуватися!**») безпосередньо під впливом змін умов середовища, адекватно (=відповідно) останнім. Тобто, не потрібно ніяких змін матеріальних структур (які різноманітні, а при мутагенезі й ненаправлені), не потрібно ніяких дій добром, а пристосованість «формується» одразу зміненими умовами при «**формуванні**» зміненої спадковості. Ця головна помилка мала не тільки генетичні наслідки, але й змінювала погляди на механізми природної еволюції взагалі.

У той час в інституті призупиняються всі генетичні роботи, дослідження виконуються під впливом «мічурінської біології». Основним напрямом в роботі стає обґрунтування «**спрямованих**» змін спадковості шляхом «**виховання**» рослин у невластивих умовах, зокрема перетворення ярих жита, пшениць м'якої та твердої, ячменю і навіть гороху, соняшнику, льону в зимостійкі озимі та навпаки. Запроваджується вивчення ефектів внутрішньосортного схрещування, «**вегетативної гібридизації**» шляхом щеплення та пересадки зародків одного виду на ендосперм того ж або іншого виду тощо. І саме цікаво й трагічне, що в роботах щодо «**переробок**» ярих культур в озимі шляхом посівів перших восени («виховування спадковості») «яровизатори» отримують потрібний результат не тільки в інституті, а й у багатьох установ країни. А тим часом подібні досліди з «виховування» набувають анекдотичний вигляд, наприклад, для селекційного підвищення рівня олійності насіння соняшнику «виховують» дослідні посіви при поливі їх соняшником олією! З подібними комедіями, а в більшості й трагедіями читач може ознайомитися в спеціальній літературі. Свою ж задачу ми бачимо в доведенні фактів, коли і як припинялася така вакханалія та здійснювався перехід науки на рейки класичної генетики.

Наприкінці 1964 р. від керівництва країною був усунутий М.С.Хрущов і незабаром були прийняті відповідні Постанови й Рішення щодо подолання відставання в біологічній науці. На Всесоюзному семінарі викладачів генетики в лютому-березні 1965 р. була розроблена обов'язкова для виконання всіма вищими навчальними установами нова програма курсу генетики, і цей процес у ВНУ розпочався вже наступного семестру. У науково-дослідних же установах біологічного і аграрного профілю подібний перехід здійснювався повільніше через ін-

рційність їх багаторічних планів роботи, відсутність відповідних кваліфікованих кадрів, а місцями й через опір та ін. У СГІ відродження генетики частково розпочалося вже з 1966 р.

Поряд з деякими кадровими змінами у відділі генетики започатковуються окремі цитологічні роботи, дослідження з хімічного мутагенезу та ін. Разом з тим залишаються й розділи досліджень з «перероблювання спадковості» та «вегетативної гібридизації» (зокрема «ін'єкцій рослинних гомогенатів у недостигли зерна гороху»). Докорінна ж цілеспрямована робота щодо вдосконалення наукових планів та впровадження генетичних методів розпочалася практично з 1969 р. після призначення на посаду нового завідувача відділу генетики вихованця беларускої школи М.В.Турбіна, першочерговою задачею якого стало підвищення генетичної грамотності співробітників інституту взагалі та переведення досліджень на генетичну основу [8].

Протягом трьох років у СГІ та в Одеському сільськогосподарському (навчальному) інституті читаються лекції з курсу загальної генетики, для аспірантів і всіх бажаючих співробітників інституту провадяться спеціалізовані семінарські заняття, на окремі засідання виносяться наукові доповіді щодо тогочасних питань генетики сільськогосподарських рослин. А тим часом, з метою переконання науковців СГІ в дійсності хромосомної теорії спадковості у відділі розпочинаються дослідження з використанням анеуплоїдних ліній пшениці (силами аспірантів), коли під мікроскопом можна було бачити відсутність у конкретній лінії окремої хромосоми, а на ділянках у полі спостерігати ефект її відсутності на деякі ознаки. І це було переконливо! Одним з розділів робіт з анеуплоїдними лініями пшениці була аспірантська тема щодо вивчення моносомним аналізом генетичного контролю різноманіття за електрофоретичними спектрами запасних білків ендосперму гліадинів і глютенінів. Ця робота сприяла переведенню досліджень лабораторії якості зерна на генетичну основу, розробці та поширенню напряму так званої біохімічної генетики (точніше, генетики біохімічних ознак або маркерів). І згодом ця просто лабораторія якості переросла у відділ генетичних основ селекції, який у цей час очолює (після О.О.Созінова і Ф.О.Поперелі) той самий у минулому аспірант, а нині доктор біологічних наук О.І.Рибалка.

Роботи з «переробок ярих культур в озимі» не були припинені, а піддані перевірці в методично бездоганному досліді: генетична однорідність вихідного матеріалу (дисомні нащадки з

ярих анеуплоїдних ліній, що підтримувалися протягом десятиріч при штучній ізоляції), мінімізація (та урахування інтенсивності) дії добору при укриванні посівів на період морозів, посімейний аналіз нащадків та ін. Цю роботу виконувала співробітниця А.Й.Сінкевич також зі школи М.В.Турбіна. І протягом 3 років таких «виховань спадковості» достовірних «переробок» в озимі отримано не було! Разом з тим було показано, що такі екстремальні «невластиві» умови можуть виступати як мутагенний фактор (на тесті зворотних мутацій *waхu* ячменю), але ж частоти таких мутацій були на порядки нижче частот «переробок», що завжди констатували «яровизатори». І ще один важливий факт: при інтродукції сортів пшениці з інших регіонів або при посіві їх у невластивих умовах спостерігалося суттєве зростання відкритого цвітіння, що підвищувало можливість для перехресного запилення. Оскільки строки цвітіння висіяних восени ярих ліній пшениці співпадали з такими у звичайних озимих зразків (що розміщувалися як правило поряд), то при відсутності штучної ізоляції у другому поколінні не могло дивувати вищеплення озимих нащадків як результат такої спонтанної гібридизації. І це було підтверджено аналізом спектрів запасних білків у 10 зразків так званої Миронівської ярої, отриманих різними авторами в різних зонах «шляхом переробок» із озимої Миронівської 808: у кожного з них виявлено присутність окремих блоків білків, що зустрічалися в найбільш поширених у тих зонах сортів озимої пшениці. Тобто, головними причинами «отримання результатів при переробках» могли бути як неоднорідність вихідного матеріалу, так і підвищена можливість перехресного запилення (тим більше, що навіть при схрещуванні між собою тільки ярих зразків з неалельними доміантними генами *Vrn* у потомстві вищеплюються озимі нащадки [9]), і тільки з мінімальною імовірністю – мутагенез.

Вказана робота ініціювала подальші дослідження з вивчення генетики різноманіття пшениць за типом (озимі/ярі) і темпами розвитку. Тут слід зазначити, що з точки зору фізіології рослин положення лисенківської теорії стадійного розвитку (хоча він і не був першовідкривачем властивостей яровизації та фоточутливості) були в основному правильними і не заперечуються й дотепер. Після отримання з Австралії від А.Т. Pugsley насіння 5 майже ізогенних за генами *Vrn* ліній сорту Triple Dirk у відділі широким фронтом були розгорнуті роботи в даному напрямі, скеровані в подальшому і на системи генів *Ppd* (фоточутливості), *Vrd* (тривалос-

ті яровизаційної потреби), *Eps* (скоростиглості *per se*). Ці роботи висвітлені в науковій літературі [10], відомі у світі, і тепер продовжуються в плані виявлення ефектів вказаних генів на господарсько цінні ознаки (у т. ч. й на рівень морозо-, зимостійкості).

Аналогічне вивчення причин і механізмів генетичної мінливості після «ін'єкцій» у той час було доручено аспірантці С.Ф. Лук'янюк (знову-таки випускниці кафедри генетики з Мінська). З одного боку було показано, що після «ін'єкцій» суттєво підвищується частота хромосомних порушень і перебудов як мутагенного чинника. Але частоти спрямованих «передач» маркерних ознак донора реципієнту виявлялись ще більшими. І після фракціонування гомогенатів на вуглеводну, білкову і нуклеїнову фракції та введення їх роздільно в насіння реципієнта такий ефект виявлявся тільки у варіанті з нуклеїновою фракцією. Даний факт послужив додатковим обґрунтуванням для організації в інституті Ю.М. Сиволапом (який тільки повернувся зі стажування від Vonner'a) спеціальної лабораторії молекулярної біології, яка згодом стала в країні провідним Біотехнологічним центром у рослинництві.

У подальшому робота з «ін'єкціями» стимулювала ідею переведення досліджень з рівня цілісних організмів на рівень культури клітин *in vitro*. І після стажування у Р.Г. Бутенко в ІФР АН СРСР С.Ф. Лук'янюк розпочала роботу у відділі за даним напрямом (меристемні культури, регенерація, суспензійні культури, добір *in vitro*, гаплопродукція і т. ін.). З часом була організована спеціальна лабораторія у складі відділу, яка стала однією з найкращих в інститутах аграрного профілю. Після передчасного відходу з

життя С.Ф. Лук'янюк дану лабораторію очолює її соратниця доктор біологічних наук Ігнатова С. О.

Так розпочиналося й проходило подолання наслідків «лисенківщини» в інституті. А тим часом у відділі розгортаються інші напрями досліджень. Більш детально ця інформація висвітлена в узагальнюючій статті до 100-річчя інституту [11]. І в цілому, інститут знову стає провідною генетико-селекційною установою на теренах усього СРСР. Починаючи з 1971 р., він являється головним центром керівництва ДНТП з теоретичних основ селекції с.-г. рослин в країні (а після розпаду СРСР і в Україні), координатором міжнародного наукового співробітництва країн РЕВ (КОЦ РЕВ) щодо теоретичних основ селекції зернових культур. Свого розквіту інститут досяг у другій половині 80-х років минулого сторіччя. Наприклад, тільки у відділі генетики на той час працювало 17–18 науковців при загальному штаті не менш 50 осіб.

На жаль, ситуація з генетикою сільськогосподарських рослин суттєво змінюється за часів незалежності України не тільки в інституті, а і в усіх НДУ країни (фінансові обмеження, скорочення штатів і напрямів досліджень у першу чергу з пошукових теоретичних робіт...). Якщо на початку 90-х років ДНТП України з теоретичних основ селекції включала 32 установи-співвиконавці, то в наступні 5-річчя їх становило 23, 11, 7, 6, відповідно! І все ж навіть тепер СГІ зберігає (хай і в урізаному об'ємі) свій теоретичний потенціал, зберігаються школи генетики темпів розвитку, генетики якості, генетики стійкості до хвороб, біотехнології та молекулярної генетики.

Література

1. Лифенко С.П. Нариси з історії Селекційно-генетичного інституту. – Одеса: СГІ, 2002. – 122 с.
2. Лифенко С.П. Селекційно-генетичний інститут, 100 років. – Одеса: Астропринт, 2012. – 130 с.
3. Сапегин А.А. Законы наследственности как основа селекции сельскохозяйственных растений. – Одесса: Тов. с.-х. Южной России, 1912. – 105 с.
4. Сапегин А.А. Этапы менделизма / ред. Сапегин А.А. (.) // Сб. статей по генетике. – Одесса, 1923. – 183 с.
5. Сапегин А.О. Вибрані праці. – К.: Наук. думка, 1971. – 320 с.
6. Сойфер В.Н. Власть и наука. История разгрома генетики в СССР. – М.: Лазурь, 1993. – 706 с.
7. Урсу Д. Генетика в Одессе: сто лет борьбы и поражения // Юго-запад. Одессика, 2012. – Вып. 14. – С. 210–257.
8. Стельмах А.Ф. Вплив ідей М.В.Турбіна на розвиток генетичних досліджень у СГІ // Зб. наук. праць СГІ. – Одеса, 2012. – Вып. 20 (60). – С. 172–177.
9. Стельмах А.Ф., Авсенин В.И. Способ получения озимых форм мягкой пшеницы из яровых / Авт. свидет-во № 1340676, 01.06.1987. – Москва, 1987. – 5 с.
10. Файт В.І., Стельмах А.Ф. та ін. Генетичні системи адаптації та розширення різноманіття зернових колосових культур // Зб. наук. праць СГІ. – Одеса, 2010. – Вып. 15 (55). – С. 83–92.
11. Файт В.І., Стельмах А.Ф. та ін. Становлення та розвиток ген. досліджень у відділі генетики // Зб. наук. праць СГІ. – Одеса, 2012. – Вып. 20 (60). – С. 161–171.

STELMAKH A.F., FAYT V.I.

*Plant Breeding & Genetics Institute – National Center of Seed & Cultivar Investigation
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road 3, e-mail: stegen@ukr.net; faygen@ukr.net*

THE HISTORY OF PLANT GENETICS STUDIES IN PLANT BREEDING AND GENETICS INSTITUTE FOR 100 YEARS

Aims. New generation of scientists is almost not acquainted with the “lysenkoism” period in the home biological science. Here is the attempt to represent some data with the example of PBGI. **Methods.** Analysis of literature and personal experience. **Results.** 30-years period of classical genetics at PBGI was replaced for “lysenkoism” denying the chromosomal theory of heredity. Imputation of that to Lysenko personally would be not justice: the party and state machinery had to be mainly responsible. The studies during that period were directed on “heredity upbringing” by unusual environment and vegetative hybridization. Classical genetics revival started only since late 60-th. Various scientific schools were formed gradually at the institute. The main present-day studies include rate of development genetics, grain quality genetics, genetics of resistance to stresses, *in vitro* culture, molecular biology *etc.* **Conclusion.** At least 3 periods of genetic studies evolution are characteristic for PBGI.

Key words: Sapegin’s period, “lysenkoism”, genetics revival, modern state.

ФОМИНА И.Р.

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН
Россия, 142290, Московская обл., г. Пуццо, ул. Институтская, 2, e-mail: irafomi@rambler.ru
Biosphere Systems International Foundation
USA, 85755, Arizona*

«КОРНИ НАУЧНОГО ЗНАНИЯ ТЕРЯЮТСЯ В БЕСКОНЕЧНОЙ ДАЛИ ВЕКОВ ...» В.И. ВЕРНАДСКОМУ ПОСВЯЩАЕТСЯ

В работах по истории науки В.И. Вернадский писал: «Корни нашей научной мысли ... идут много и глубже вдаль веков, чем думают ... Ясного понятия о сумме эмпирических знаний ... в эти далекие от нас времена мы сейчас, к сожалению, иметь не можем. Нельзя, однако, не отметить, что история знаний начинает со все большей точностью выявлять такой объем этих эмпирических знаний и во многом такое их совершенство, которому не верила наука XIX столетия» [1]. То же самое можно сказать и о современных достижениях по выявлению эмпирических знаний селекционеров каменного века, в которые трудно было поверить в прошлом тысячелетии. Необходимость обновления учебной литературы и лекционных курсов по данному разделу истории биологии наглядно видна на примере замечательных открытий последнего десятилетия об одомашнивании кошки, собаки, лошади.

Цель данного краткого обзора – показать важность совместного применения археологических и генетических методов исследования для выявления центров одомашнивания и времени, когда оно было произведено.

Кошки – мышки

До недавнего времени считалось, что кошку одомашнили в Древнем Египте около 1,900–2,000 лет до н.э. [2]. Но в этот период жители Древнего Египта уже давно выращивали пшеницу. Урожай зерна хранился в специальных постройках и привлекал, не мог не привлекать, большие популяции мышей.

В 2004 году группа археологов под руководством Ж. Гилена (Jean Guilaine) обнаружила на Кипре остатки кота, убитого и захороненного рядом с хозяином 8,000–9,000 лет до н.э. [3]. По словам Ж. Гилена: «Возможно, это был прирученный, но еще не одомашненный кот. Альтернативно, это было, действительно, домашнее животное», – цит. по [3]. Поскольку на Кипре нет аборигенных диких кошек, ученые предположили, что эти животные были завезены туда для охраны собранных или выращенных злаков из регионов с уже развивающимся земледелием.

Примечательно, что с археологическими находками согласуются данные генетиков [4]. Генетический анализ 979 домашних кошек (*Felis silvestris catus*) и их диких предков: *Felis silvestris silvestris* (европейская дикая кошка), *F.*

s. lybica (североафриканская кошка), *F. s. ornata* (азиатская степная кошка), *F. s. cafra* (южноафриканская дикая кошка), и *F. s. bieti* (китайская кошка), – показал, что каждая дикая группа представляет собой отличный от кошки домашней подвид *Felis silvestris*. Дальнейший анализ позволил установить, что кошки были одомашнены на Ближнем Востоке, на территории Плодородного полумесяца, где, по мнению Н.И. Вавилова [5] был один из центров древнего земледелия. При этом домашние кошки произошли по крайней мере от пяти женских особей, чьи потомки затем были расселены человеком по всему миру.

Соратник или скот?

К сожалению, результаты генетического анализа не всегда совпадают с археологическими данными. Самые древние (на сегодня) черепа собак обнаружены в Сибири на Алтае [6] и в пещере Гойе в Бельгии [7]; их датировка радиоуглеродным анализом показывает возраст более 30,000 лет. Возможно, эти древнейшие линии собак не пережили ледниковый период. Авторы [6] полагают, что процесс одомашнивания собаки происходил на протяжении истории несколько раз.

Другого мнения придерживаются генетики [8,9]. Одни [8] приводят доказательства в

пользу одомашнивания волков в Северной Африке, другие [9] – на юге Китая. Причем в последнем случае, животных, по мнению авторов, одомашнивали, как источник мяса, не ранее 16,300 лет назад.

«Конь и всадник»

Одомашнивание лошади обеспечило первых коневодов не только источником мяса и молока, помощью в перевозке грузов и быстрым передвижением скотоводческих племен с одних пастбищ на другие. Лошадь, а точнее конь и всадник, стали на долгие века, основой военных побед.

Одомашнивание этого животного, археология XXI века относит [10] к эпохе энеолита (3,500 лет до н.э.). И произошло это знаменательное событие, не в степях Причерноморья, как полагала автор замечательной книги «Конь и всадник» В.Б. Ковалевская [11], а на территории Северного Казахстана. Подождем, что скажут генетики.

Заключение

Приведенные выше работы сильно меняют устоявшиеся в прошлом веке представления о жизни и знаниях древних людей и ставят много новых вопросов для дальнейших исследований.

Литература

1. Вернадский В.И. Избранные сочинения. – Москва: Изд. АН СССР, 1960. – Т. 4., Кн. 2. – 652 с.
2. История биологии с древнейших времен до начала XX века. – Москва: Наука, 1972. – 563 с.
3. Rincon P. Dig discovery is oldest 'pet cat' // BBC News Online science staff. – 2004. – <http://news.bbc.co.uk/2/hi/science/nature/3611453.stm>
4. Driscoll C.A., Menotti-Raymond M., Roca A.L. et al. The near eastern origin of cat domestication // Science. – 2007. – Vol. 317. – P. 519–523.
5. Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений. – Ленинград: Тип. им. Гутенберга, 1926.
6. Ovodov N.D., Crockford S.J., Kuzmin Y.V. et al. A 33,000-year-old incipient dog from the Altai Mountains of Siberia: evidence of the earliest domestication disrupted by the last glacial maximum // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6(5). – e22821.
7. Germonpré M., Sablin M.V., Stevens R.E. et al. Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes // J. Archaeol. Sci. – 2009. – Vol. 36. – P. 473–490.
8. Boyko A.R., Boyko R.H., Boyko K.M. et al. Complex population structure in African village dogs and its implications for inferring dog domestication history // PNAS. – 2009. – <http://www.pnas.org/content/early/2009/07/31/0902129106.full.pdf+html>
9. Pang J.P., Kluetsch C., Zou X.-J. mtDNA data indicates a single origin for dogs south of Yangtze River, less than 16,300 years ago, from numerous wolves // MBE. – 2009. – <http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2009/09/01/molbev.msp195.full.pdf+html>
10. Outram A.K., Natalie A. Stear N.A., Bendrey R. et al. The earliest horse harnessing and milking // Science. – Vol. 323. – P. 1332–1335.
11. Ковалевская В.Б. Конь и всадник. Пути и судьбы. – Москва: Наука, 1977. – 152 с.

FOMINA I.R.

Institute of Basic Biological Problems RAS

Russia, 142290, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya str. 2, e-mail: irafomi@rambler.ru

Biosphere Systems International Foundation

USA, 85755, Arizona

"THE ROOTS OF SCIENTIFIC KNOWLEDGE IS LOST IN THE ENDLESS VISTAS OF CENTURIES ..." V.I. VERNADSKY DEDICATED

Aims. The purpose of present brief review to show the importance of joint use of archaeological and genetic research techniques to identify the centers of domestication and the time it was made. In his works on the history of science, V.I. Vernadsky wrote: "The roots of our scientific thought ... go much deeper into the distance and ages, than they think ... Clear idea of the amount of empirical knowledge ... in these far away times we, unfortunately, can not have now. One can not, however, be ignored, the history of knowledge begins ... to reveal so big amount of empirical knowledge ... that did not believe the science of XIX century". The same can be said of the latest achievements in identifying empirical knowledge of breeders of the Stone Age, which was hard to believe in the last millennium. **Conclusions.** Need to update this section in textbooks and lectures on the history of biology clearly illustrated by the remarkable discoveries of the last decade of the domestication of cats, dogs, horses.

Key words: domestication, cat, dog, horse.

ЭЙГЕС Н.С., ВОЛЧЕНКО Г.А., ВОЛЧЕНКО С.Г.

Институт биохимической физики им. Эмануэля РАН

Россия, 119334, Москва, ул. Косыгина 4, e-mail: volchenkos@mail.ru

ЯВЛЕНИЕ «ХИМИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ» И.А. РАПОПОРТА – КРУПНЕЙШЕЕ ОТКРЫТИЕ XX ВЕКА К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ



В 2012 году, 14 марта исполнилось 100 лет со дня рождения всемирно известного ученого-генетика Иосифа Абрамовича Рапопорта, лауреата Ленинской премии, Героя социалистического труда, номинанта на Нобелевскую премию

за открытие явления и метода химического мутагенеза. И.А. Рапопорт известен своими героическими подвигами во время Великой Отечественной войны и вкладом в Победу. Дата 100-летия широко отмечалась научной общественностью: в Московском Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, который прежде назывался Институтом экспериментальной биологии, позже Институтом цитологии, гистологии и эмбриологии, где Иосиф Абрамович работал до 1948 года и где им были проведены многие исследования и сделаны выдающиеся открытия. Конференцию проводила О.Г. Строева. В Украине (откуда родом Иосиф Абрамович) в Белоцерковском Аграрном Национальном университете конференцию вел С.П. Васильковский. В.В. Моргун провёл заседание, посвящённое памяти Рапопорта, в Институте физиологии растений и генетики НАН в Киеве. С.П. Васильковский и В.В. Моргун принимали участие в совещаниях по химическому мутагенезу, проводимых И.А. Рапопортом в 50-е – 90-е годы XX века. В Алуште дата отмечалась на съезде Общества генетиков и селекционеров Украины. Также дата отмечалась в Харькове, в Уфе

/Башкортостан/.

Два крупных открытия XX века принадлежат И.А. Рапопорту: один из видов наследственной изменчивости в образе химического мутагенеза и ненаследственной модификационной изменчивости в виде фенотипической активации. Оба открытия исходят из двух основополагающих трудов Иосифа Абрамовича. Они отражены соответственно в двух книгах: «Микрогенетика» [1, 2] и «Феногенетический анализ независимой и зависимой дифференцировки» [3]. После уничтожения этих книг в годы лысенковщины «Микрогенетика» была в 2010 году переиздана О.Г. Строевой, которая внесла неоценимый вклад в анализ и популяризацию трудов И.А. Рапопорта. Книга «Феногенетический анализ независимой и зависимой дифференцировки» была несколько ранее опубликована в номерах журнала «Онтогенез» [3].

Наследственная изменчивость вызывается действием сильных химических мутагенов, открытых И.А. Рапопортом в количестве около 300, более слабых мутагенов им было найдено в несколько раз больше. С последними И.А. Рапопорт также много работал. Из сильных мутагенов в селекционных целях Иосиф Абрамович рекомендовал чаще использовать этиленмин (один из первых, мутагенную активность которого он открыл), нетрозотилмочевину, нитрозометилмочевину, диметилсульфат, диэтилсульфат, нитрозометилбиурет, 1,4-бис-диазоацетилбутан и другие соединения. Эти и другие, наиболее эффективно действующие химические мутагенные вещества Иосиф Абрамович назвал супермутагенами.

Ненаследственная изменчивость была также глубоко изучена И.А. Рапопортом. Им обнаружено большое число химических соединений, вызывающих модификации (морфозы), в частности фенокопии, имитирующие мутации. Среди модификаторов наибольший интерес представляет высокоэффективное физиологически активное вещество антиоксидант парааминобензойная кислота.

Оба метода – химический мутагенез и модификационная изменчивость были широко внедрены ещё при жизни Рапопорта с активным его участием в разные области фундаментальных и прикладных исследований: в изучение эволюционных процессов, генетику и теорию мутагенеза, в сельское хозяйство, лесоводство, медицину, экологию, микробиологию, микробиологическую промышленность, в животноводство. Из прикладных наук Иосиф Абрамович наибольшее внимание уделял сельскому хозяй-

ству.

Каким образом И.А. Рапопорту удалось открыть и разграничить оба вида изменчивости, которые он исследовал – наследственную и ненаследственную – открытия, которые подтвердились на классическом генетическом объекте мухе дрозофиле (*Drosophila melanogaster*), а позже – на широком круге различных сельскохозяйственных культур и на разных других таксономических объектах.

И.А. Рапопорт нашёл путь, по которому он безошибочно обнаруживал интересующие его вещества и относил их к мутагенам или к модификаторам. Он определил, что механизмы их действия на живые организмы различны, но основа действия исходит из одного источника. Благодаря этим исследованиям, Рапопорт мог предсказывать степень эффективности как мутагенов, так и модификаторов. В обнаружении этих соединений и их разграничении решающую роль играли величины их дипольных моментов [4, 5]. У химических мутагенных веществ они составляют 2,4 – 2,7 Д; 1Д – единица измерения дипольного момента. Эта единица названа по имени известного учёного Дебая, изучавшего диэлектрические характеристики молекул. У модификаторов дипольные моменты сильнее и составляют от 4Д и выше этого значения [4, 5]. В этом состоит «ключ», по выражению О.Г. Строевой нахождения химических мутагенов и модификаторов. А именно, среди множества химических соединений – обнаружение химических мутагенов, в том числе супермутагенов органической природы и модификаторов как в основном неорганической, так и органической природы, а также разграничение их функций.

Открытия И.А. Рапопорта в области наследственной и фенотипической изменчивости в большой мере обязаны тому, что он сумел интегрировать основополагающие для этих целей науки: генетику, физику и химию. На данном этапе к этим трем наукам присоединяются ещё физиология и биохимия. На стыке интегрированных наук открываются широкие горизонты для проникновения в глубину явлений, что привело И.А. Рапопорта к открытиям здесь представленным.

Модификаторы с более высоким значением дипольного момента по сравнению с химическими мутагенами, мутаций не вызывают. Однако модификаторы обладают способностью вступать в комплексы с ферментами (без валентных связей), активируя их и реактивируя после воздействия ультрафиолетом и ионизирующей радиацией [6]. Поэтому Рапопорт обо-

значил этот феномен термином «фенотипическая активация». Особое значение среди модификаторов Иосиф Абрамович придавал парааминобензойной кислоте (ПАБК). Активируя фермент ДНК-полимеразу [7] ПАБК вызывает репарации – восстановление хромосом, поврежденных ионизирующей радиацией или высокими дозами химических мутагенов [8]. Поэтому ПАБК является генетически значимым соединением, но не мутагенным с защитным эффектом окружающей среды от радиации. ПАБК экологически чистое вещество, витамин, антиоксидант, участвующий в создании экологически чистой продукции. Морфозы, в особенности вызванные действием ПАБК, часто отличаются положительными свойствами, что используется для повышения урожайности [9, 10], снижения поражения фитопатогенами и повышения адаптивных свойств [11], но уже на ненаследственном фенотипическом уровне.

ПАБК была внедрена в сельское хозяйство в 80 – 90-ые годы на зерновых культурах после производственных испытаний в хозяйствах Московской и Тюменской областей, в которых авторы принимали участие. Во многих областях бывшего Советского Союза, по инициативе Минсельхоза, после того, как было установлено положительное влияние ПАБК на зерновые, овощные и кормовые культуры, картофель, свеклу (кормовую, столовую, сахарную), кукурузу и другие культуры, было уже широкое внедрение ПАБК в сельское хозяйство и она была внесена в соответствующий список Госхимкомиссией в 1993 году. На овощных культурах ПАБК также применяется и в индивидуальных хозяйствах. С помощью ПАБК лечатся глазные заболевания [12]. Она применяется в геронтологии [13]. Положительное влияние ПАБК сказывается на домашних и сельскохозяйственных животных [14, 15]. У них повышается иммунитет, выживаемость, увеличивается вес и плодовитость. ПАБК также используется в лесоводстве, клеточной культуре, культуре ткани.

Такое широкое положительное влияние ПАБК на разные таксономические объекты основано главным образом на активации широкого круга жизненно важных ферментов, которые часто под влиянием неблагоприятных условий оказываются в угнетенном состоянии и на восстановлении поврежденных хромосом. В связи с этим ПАБК особенно эффективна в тех случаях, когда внешние условия неблагоприятны.

Химическими мутациями ещё раньше занимались и другие исследователи. Например, одновременно с открытием И.А. Рапопорта яв-

ления химического мутагенеза в 1946 году [16] появилась публикация по иприту Ауэрбах и Робсона [17]. Иприт – отравляющий горчичный газ, использовавшийся во время Первой мировой войны, не пригоден для получения ценных в хозяйственном отношении мутаций, т.к. этот мутаген отличается жестким действием и вызывает исключительно разрывы хромосом в большом количестве и их перестройки – в 24% случаев, а генных мутаций, представляющих основной интерес с точки зрения возможностей практического использования, не вызывает. Генные мутации, представляющие интерес с точки зрения их практического использования – это прерогатива сильных химических мутагенов – супермутагенов И.А. Рапопорта.

В 30-ые годы 20-го века «химические» мутации были получены В.В. Сахаровым [18] под воздействием йода и других неорганических веществ. Уровень мутаций был низок и только не на много превышал спонтанный уровень. М.Е. Лобашёв пробовал уксусную кислоту [19] и аммиак [20]. Он получил результат сходный с результатом В.В. Сахарова: в опыте с аммиаком частота мутаций была очень низкой. Уксусная кислота мутаций не вызывала.

В.В. Сахаров был первым, кто опубликовал химические мутации и специфичность действия химических веществ неорганической природы в сравнении их действия с действием ионизирующей радиации и спонтанным мутагенезом [21].

Выше изложенные результаты, при которых уровень мутирования был низок, получены на дрозофиле. На других объектах результатов в то время ещё не было. Таким образом, ни иприт, ни йод, ни уксусная кислота и аммиак не могли быть использованы для практических целей. Специфичность характера действия химических мутагенов неорганической природы исследовалась В.В. Сахаровым при очень низкой мутагенной активности и узком мутационным спектром.

Только химические мутагенные вещества органической природы, подобранные И.А. Рапопортом в соответствии с величиной дипольного момента, о чём было сказано выше, проявившие высокую эффективность после испытаний на дрозофиле, вылились в широкие теоретические и практические исследования и были применены в ряде областей биологии: в эволюционных и генетических исследованиях, в сельском хозяйстве, медицине, микробиологии и микробиологической промышленности, в экологии, животноводстве, лесоводстве.

Поэтому И.А. Рапопорт является осново-

положником химического мутагенеза – одного из крупнейших открытий XX-го века. В связи с этим открытием Иосиф Абрамович был номинирован на Нобелевскую премию. Однако получить её ему было не суждено. Иосиф Абрамович не поехал в Стокгольм по принципиальным соображениям, связанным с условием, поставленным перед ним ЦК КПСС о вступлении в партию заново (до 1948 года он был членом партии КПСС, но после сессии ВАСХНИЛ – исключён).

Одним из достижений в области химического мутагенеза было создание разными сельскохозяйственными и биологическими учреждениями за относительно короткий промежуток времени (60-е – 90-е годы XX-го века) около 400 мутантных сортов сельскохозяйственных культур, многие из которых успешно прошли Государственные сортоиспытания. Многие селекционеры страны занимались созданием новых сортов с использованием метода химического мутагенеза и большинство из них – внепланово.

Возникает вопрос: как объяснить столь широкое распространение метода химического мутагенеза, который ещё при жизни И.А. Рапопорта стал массовым, составил эпоху в разных областях биологической науки и был внедрён не только в бывшем Советском Союзе, но и в ряде других стран – Венгрии, Китае, Вьетнаме, Индии, США. В Индии продолжает исследования ученик Иосифа Абрамовича Балрам Шарма.

Широкому распространению метода химического мутагенеза способствовали ежегодные совещания специалистов, использующих в своих исследованиях этот метод. Иосиф Абрамович проводил совещания в Институте химической физики АН СССР, где возглавлял отдел химической генетики, проявляя живой, можно сказать трепетный интерес к исследованиям, здесь обсуждаемым. По сути это была школа. Каждое совещание Иосиф Абрамович предварял своим докладом по теории химического мутагенеза и модификационной изменчивости. Школа во многом помогала специалистам расширять и углублять знания в области генетики (особенно в 50-е годы, вскоре после сессии ВАСХНИЛ 1948г.) и творчески их использовать в своих работах. Совещания сыграли немалую роль в интенсификации генетических и селекционных исследований.

Большую роль в широком внедрении метода играли контакты Иосифа Абрамовича со специалистами и его помощь им в исследованиях. Иосиф Абрамович часто посещал сельскохозяйственные и биологические учреждения, наблюдая вместе со специалистами посевы разных

культур, оценивая материал, советуя, как строить работу в дальнейшем. Таким образом, он работал со специалистами в Краснодарском крае, Сибири, Средней Азии, в Центральном регионе, в Украине, в автономной республике Крым.

Большое значение в научных и практических достижениях имела сама личность Иосифа Абрамовича: его талант, преданность делу, отзывчивость, всегдашняя готовность помочь в постановке опытов, справедливость, бескорыстие, честность, доходящая до щепетильности. Под руководством Иосифа Абрамовича совещания проходили демократично. Каждый мог высказаться. Рапорт не ограничивал докладчиков во времени, проявляя живой интерес к исследованиям, оценивая их, комментируя, глубоко в них вникал. Однако, если работы были слабыми, он был весьма резок в оценках, хотя это бывало не часто.

При создании новых сортов сельскохозяйственных культур методом химического мутагенеза многие селекционеры предлагали И.А. Рапопорту соавторство, однако он неизменно отказывался быть в числе авторов новых сортов. Это вызывало доверие и уважение специалистов и ещё более привлекало многих к работе этим методом.

Иосиф Абрамович отказывался быть в числе авторов при создании сортов озимой пшеницы и у своих сотрудников. Он говорил, что во всех случаях не может включаться в авторы сортов, так как их создавали специалисты, вкладывая интеллект, силы и время, хотя и работая методом химического мутагенеза: «Не становитесь же мне автором такого количества сортов!». Однако он был рад, когда мы предложили назвать хемомутантный сорт озимой пшеницы его именем.

Иосиф Абрамович умел разглядеть творческие возможности специалистов, которые он особенно ценил и умел развить. При этом он говорил: «Ведь Ваша работа козырная!» или «Работа образцовая». Это звучало в его устах как наивысшая оценка данного исследования. Химические супермутагены он раздавал селекционерам бесплатно, всегда с ними беседовал, знакомил с методикой работы.

Деньги своей Ленинской премии Иосиф Абрамович раздал сотрудникам Отдела химической генетики, хотя нельзя сказать, чтобы он не нуждался в деньгах. Одни только неоднократные в течение дня ежедневные деловые поездки на такси отнимали немалую часть зарплаты. Ездить общественным транспортом он не мог, так

как был болен острой формой астмы, которую приобрёл, работая с мутагенами вне лаборатории, будучи отлучённым от исследований в течение более 10-ти лет, начиная с 1948 года. Также тяжёлые ранения во время Великой Отечественной Войны давали о себе знать. Один из однополчан попросил Иосифа Абрамовича не раздавать Ленинскую премию и сохранить её для семьи, на что услышал ответ: «Уже раздал, но одному сотруднику не хватило и я добавил деньги из зарплаты». Семье Иосифа Абрамовича было тяжело также и материально. На работу, даже не по специальности, было устроиться почти невозможно. Временная работа длилась недолго, так как поступало очередное распоряжение об увольнении. Только после 1957-го года он смог продолжить исследования, будучи принятым на постоянную работу в Институт химической физики АН СССР по приглашению Н.Н. Семёнова. Интеллектуальные и душевные силы Иосифа Абрамовича были настолько велики, что крупные теоретические и практические результаты были достигнуты быстро, как бы наверстаны после длительного перерыва.

Основной причиной широкого и быстрого распространения метода химического мутагеназа является его высокая эффективность, во много раз превышающая эффективность дотеле известных неорганических веществ вызывающих мутации [17, 18, 19, 20, 21], в отношении, как их общей частоты, так и широты мутационных спектров. Преимущества химического мутагеназа относятся и к радиационному мутагенезу. На примере озимой пшеницы мы видим, что при правильном подборе трёх составляющих: супермутагена, его оптимальных доз и высокомутабельного исходного сорта общая частота мутаций на порядок выше по сравнению с опти-

мальными дозами редко ионизирующего излучения – гамма лучей [22, 23] и на порядок превышает разнообразие типов наследственных изменений по сравнению с оптимальными дозами плотно ионизирующей радиации – быстрыми нейтронами [24, 25].

В процессе дальнейшего многолетнего изучения метода химического мутагеназа, открываются новые его закономерности и особенности.

Сотрудники Иосифа Абрамовича Рапопорта и другие специалисты в области химического мутагеназа по возможности продолжают и развивают эти исследования.

Интересы Иосифа Абрамовича принадлежали не только науке. Будучи широко образованным высококультурным человеком, он увлекался литературой, театром, живописью, часто бывал на выставках и говорил, что это вдохновляет его на научные исследования.

Всё сказанное об Иосифе Абрамовиче Рапопорте, а также его военные подвиги и стойкая принципиальная гражданская позиция защитника науки генетика в борьбе с лысенковщиной снискали ему исключительно высокий авторитет не только среди специалистов, но и в народе, среди тех, кто его знал, слышал или читал о нём. Можно ещё многое сказать об этом необыкновенном уникальном человеке, его добропорядочности, храбрости на войне, принципиальности, чутком отношении к людям, высокой интеллигентности, а также о крупных открытиях в науке, и не только в области наследственной, но и модификационной, ненаследственной, изменчивости. Обо всём этом можно писать особо. В этом плане много сделала О.Г. Строева, опубликовав книги об Иосифе Абрамовиче и его методах [1, 26, 27, 28, 29, 30].

Литература

1. Рапопорт И.А. Микрогенетика. – М.: Наука, 1965.
2. Рапопорт И.А. Микрогенетика. – М., 2010. – 530 с.
3. Рапопорт И.А. Феногенетический анализ независимой и зависимой дифференцировки // Тр. Ин-та цитологии, гистологии и эмбриологии. – 1948. – Т. 2. Вып. 1. –135 с. // Онтогенез. –1992. – Т. 23. №3/6. Онтогенез. – 1993. – Т. 24. №1/2.
4. Рапопорт И.А. Молекулярный дипольный момент в химическом мутагенезе // Микрогенетика. – М.: Наука, 1965. – С. 67–94.
5. Строева О.Г. Механизм Химического мутагеназа в свете микрогенетической концепции И.А. Рапопорта // Индукований мутагенез в селекції рослин. – Біла Церква, 2012. – С. 6–12.
6. Кожевникова Н.А., Рапопорт И.А., Иваницкая Е.А., Пудрина И.Д. Влияние пара-аминобензойной кислоты на активность дезоксирибонуклеазы интактного и облучённого препарата // Доклады АН СССР. – 1983. – Т. 273, №2. – С. 476–479.
7. Рапопорт И.А., Васильева С.В., Давниченко Л.С. Роль пара-аминобензойной кислоты в репарации повреждений, индуцированных УФ и гамма-излучениями // Доклады АН СССР. – 1979. – Т.247, №1. – С. 231–234.
8. Григорова Н.В. Антимитотический и защитный эффект пара-аминобензойной кислоты в опытах с химическими мутагенами на *Crepis capillaries* // Химический мутагенез и качество сельскохозяйственной продук-

- ции. – М.: Наука, 1983. – С. 262–267.
9. Эйгес Н.С. Влияние ПАБК на сорта озимой пшеницы в условиях производственного опыта // Химические мутагены и пара-аминобензойная кислота в повышении урожайности сельскохозяйственных растений. – М.: Наука, 1989. – С. 38–64.
 10. 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. – М.: Наука, 1989. – С. 99–123.
 11. Эйгес Н.С., Вайсфельд Л.И. Закономерности действия пара-аминобензойной кислоты на зерновые культуры // Химический мутагенез и задачи сельскохозяйственного производства. – М.: Наука, 1993. – С. 191–198.
 12. Акберова С.И., Мусаев П., Магомедов Н.М., Бабаев Х.Ф., Гахраманов Х.М., Строева О.Г. Пара-аминобензойная кислота как антиоксидант // Биоантиоксидант. Тезисы докладов. – М., 1998. – С. 103–104.
 13. Заключение Всесоюзного научно-исследовательского института гигиены и токсикологии пестицидов, полимерных материалов и пластических масс. – К., 1985.
 14. Шангин-Березовский Г.Н., Костин А.В. Развитие и резистентность крупного рогатого скота в зависимости от способа введения биологически активного соединения пара-аминобензойной кислоты // Сельскохозяйственная биология. Серия Биология животных. – 1992. – Т. 6. – С. 128–131.
 15. Свечин Ю.К., Михеева Н.Н. Влияние пара-аминобензойной кислоты на рост и мясные качества свиней // Зоотехния. – 1990. – №1. – С. 53–56.
 16. Рапопорт И.А. Карбонильные соединения и химический механизм мутаций // Доклады АН СССР. – 1946. – Т. 54. №1. – С. 65–68.
 17. Auerbach Ch., Robson I.M. Chemical Production of Mutations. // Letters to Editor Nature. – 1946. – Vol. 157. – P. 302.
 18. Сахаров В.В. Йод как химический фактор, действующий на мутационный процесс у *Drosophila melanogaster* // Биологический журнал. – 1932. – Т.1 (8), Вып. 3–4. – С. 1–8.
 19. Лобашёв М.Е., Смирнов Ф.А. К природе действия химических агентов на мутационный процесс. Сообщение 1. Действие уксусной кислоты на non – disjunction и трансгенации у *Drosophila melanogaster* // Доклады АН СССР. – 1934. – Т. 2(3), Вып. 5. – С. 307–311.
 20. Лобашёв М.Е., Смирнов Ф.А. К природе действия химических агентов на мутационный процесс. Сообщение 2. Действие аммиака на возникновение летальных трансгенаций // Доклады АН СССР. – 1934. – Т. 3(4), Вып. 3. – С. 174–178.
 21. Сахаров В.В. Специфичность действия мутационных факторов // Биологический журнал. – 1938. – Т. 7, №3.
 22. Эйгес Н.С., Валева С.А. Сравнительное изучение действия гамма-лучей и этиленимина // Радиобиология. – 1961. – Т. 1, №2. – С. 304–309.
 23. Эйгес Н.С. Мутагенный эффект этиленимина и гамма-лучей при действии на воздушно-сухие семена озимой пшеницы // Радиобиология. – 1964. – Т.4, Вып. 1. – С. 20–28.
 24. Khvostova V.V., Mozhaeva V.S., Aigaes N.S., Valeva S.A. Mutants, induced by ionising radiations and ethyleneimine in winter wheat // Mutation Research. – 1965. – Vol. 2. – P. 339–343.
 25. Сюй Чень-мань. Получение мутантов у озимой пшеницы под действием быстрых нейтронов // Радиобиология. – 1964. – №3.
 26. Иосиф Абрамович Рапопорт // Биобиблиография учёных. Сер. биол. Генетика. – М.: Наука. – 1993. – Вып. 6. – 91 с.
 27. И.А. Рапопорт // Избранные труды: Открытие химического мутагенеза. – М.: Наука, 1993. – 304 с.
 28. И.А. Рапопорт // Избранные труды: Гены. Эволюция. Селекция. – М.: Наука, 1995. – 249 с.
 29. И.А. Рапопорт – учёный, воин, гражданин: Очерки, воспоминания: Материалы. – М.: Наука, 2001. – 2-е изд. – 2003. – 335 с.
 30. Строева О.Г. Иосиф Абрамович Рапопорт 1912 – 1990. – М.: Наука., 2009. – 213 с.

AIGES N.S., VOLCHENKO G.A., VOLCHENKO S.G.

Emanuel Institute of Biochemical physics RAS

Russia, 119334, Moscow, Kosygina 4., e-mail: volchenkos@mail.ru

OUTSTANDING ROLE OF IOSIPH ABRAMOVICH RAPOPORT IN GENETICS XX CENTURY

Aims. It is to show the discovery of the method chemical mutagenesis by I.A. Rapoport. **Methods.** Method of I.A. Rapoport: the discovery of the key to found chemical mutagenes and modifiers. **Results.** By I.A. Rapoport it was found about 300 supermutagens and many modifiers which were utilized in various regions of biology and agriculture. **Conclusions.** I.A. Rapoport's phenomenon and method of chemical mutagenesis is the largest outstanding discovery of XX century.

Key words: Iosiph Abramovich Rapoport, phenomenon and method of chemical mutagenesis, modifiers.

З М І С Т

ВІД ГОЛОВНОГО РЕДАКТОРА

ДО ЧИТАЧІВ І АВТОРІВ ЗБІРНИКА – 3 НАГОДИ 10-РІЧЧЯ ВИХОДУ В СВІТ
ПЕРШОГО ТОМУ 3

В.І. ВЕРНАДСЬКИЙ: ПОГЛЯД ЧЕРЕЗ СТОЛІТТЯ 7

ЕВОЛЮЦІЯ ТА БІОСФЕРА

БАСКЕВИЧ М.И.

ПРОВЕРКА МОДЕЛИ КАНАЛИЗОВАННОЙ ХРОМОСОМНОЙ ЭВОЛЮЦИИ НА
НОВОМ ТЕРИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ 13

ЖУК О.И.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФОТОСИНТЕЗА 17

ОЛЬКОВА А.С.

ОПЫТ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДНО-ТЕХНОГЕННЫХ СИСТЕМ БИОСФЕРЫ
МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ: ОСОБЕННОСТИ ПРОБЛЕМЫ, ПУТИ РЕШЕНИЯ 22

СУСЛОВА О.С., ГОЛЕМБІОВСЬКА С.Л., МАЦЕ ЛЮХ Б.П., ТАШИРЕВ О.Б.

ПІГМЕНТИ ДРІЖДЖІВ, ВИДІЛЕНИХ З ПЕЧЕРИ МУШКАРОВА ЯМА 26

ЕВОЛЮЦІЙНА ЕКОЛОГІЯ ТА ЕКОГЕНЕТИКА

ВАСИЛЕНКО О. П., РУШКОВСКИЙ С. Р.

ХРОМОСОМНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В ОБЛУЧЁННЫХ ЛИМФОЦИТАХ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
С КЛЕТКАМИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* 31

ДЕРІЙ С.І., БІЛОНОЖКО В.Я., ПЕДЧЕНКО М.О.

ЗАСТОСУВАННЯ КРЕС-САЛАТУ (*LEPIDIUM SATIVUM* L.) ДЛЯ ОЦІНКИ ВМІСТУ
ЙОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ У МОДЕЛЬОВАНІЙ ВОДНІЙ КУЛЬТУРІ 33

ДРАГАВЦЕВ В.А.

О ПУТЯХ СОЗДАНИЯ ТЕОРИИ СЕЛЕКЦИИ И ТЕХНОЛОГИЙ ЭКОЛОГО-
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОВЫШЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ И УРОЖАЯ РАСТЕНИЙ 38

КОЗУБ Н.О., СОЗІНОВ І.О., БІДНИК Г.Я., ДЕМ ЯНОВА Н.О., КАРЕЛОВ А.В.,

БЛЮМ Я.Б., СОЗІНОВ О.О.

ВПЛИВ ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ СУХИХ ЗЕРЕН НА ПРОДУКТИВНІСТЬ РОСЛИН
М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ, ЩО ВІДРІЗНЯЮТЬСЯ ЗА ПРИСУТНІСТЮ ЖИТНЬОЇ 1BL/1RS
ТРАНСЛОКАЦІЇ 42

КОРНИЕНКО А.В., БУТОРИНА А.К., МОРГУН А.В., ТРУШ С.Г., МАНЬКО А.А.

НОВАЯ ПАРАДИГМА ЯВЛЕНИЯ ИЗМЕНЧИВОСТИ И НАСЛЕДСТВЕННОСТИ
ЖИВЫХ СИСТЕМ ОРГАНИЗМОВ 46

КОРШИКОВ И.И., ТКАЧЕВА Ю.А., ЛАПТЕВА Е.В., МИЛЬЧЕВСКАЯ Я.Г.

ЯДЕРНО-ЯДРЫШКОВЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ В КРАЕВЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЧЕТЫРЕХ
ВИДОВ ХВОЙНЫХ 50

МИХАЛЬСЬКА Л.М., РЯЗАНОВА М.Є, ШВАРТАУ В.В. ВПЛИВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ НА АКТИВНІСТЬ ГЕРБИЦИДУ АКсіАЛ У ПОСІВАХ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ	54
МИХЕЕВ А.Н. ЭМЕРДЖЕНТНОСТЬ МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕС СОВ.....	57
ПАРДАЕВА Е.Ю., МАШКИНА О.С., КУЗНЕЦОВА Н.Ф. ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (<i>PINUS SYLVESTRIS</i> L.) В УСЛОВИХ ЗАСУХИ И ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ	62
САФРОНОВА Л.Д., ПЕТРОСЯН В.Г., СЫЧЕВА В.Б. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ Т-КОМПЛЕКСНЫХ ДОМОВЫХ МЫШЕЙ (<i>MUS MUSCULUS</i>) ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БИОИНДИКАЦИИ.....	66
СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В. КАРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ДНК КРАСНО- И ЖЕЛТОПЫЛЬНИКОВОЙ ФОРМ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В БОЛОТНЫХ И СУХОДОЛЬНЫХ ЭКОТОПАХ.....	72
СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., ПИМЕНОВ А.В., ЕФРЕМОВА Т.Т. ХРОМОСОМНЫЕ НАРУШЕНИЯ У СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭДАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ	76
СОКОЛОВСЬКА-СЕРГІЄНКО О.Г. ВПЛИВ РІЗНИХ УМОВ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ АСИМІЛЯЦІЇ СО ₂ , АКТИВНІСТЬ АНТИОКСИДАНТНИХ ФЕРМЕНТІВ ТА ПРОДУКТИВНІСТЬ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ	80
СТРАШНІЮК В.Ю., ШАЛАМОВ Ю.А. ПУФОВАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМ У <i>DROSOPHILA</i> <i>MELANOGASTER</i> В СВЯЗИ С РАЗЛИЧИЯМИ ПО СТЕПЕНИ ПОЛИТЕНИИ И УСЛОВИЯМИ ТЕМПЕРАТУРЫ.....	84
ТАШИРЕВ А.Б., ГЛАДКА Г.В., РОМАНОВСКАЯ В.А. ЭВОЛЮЦИОННАЯ ЭКОЛОГИЯ И СТРАТЕГИЯ ВЫЖИВАНИЯ АНТАРКТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ	88
FOMINA M.O. PHYLOGENETIC FINGERPRINTING OF MICROBIAL COMMUNITIES IN METAL POLLUTED SOILS USING RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS (RISA)	93
ЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМІВ У ПРИРОДІ ТА ЕКСПЕРИМЕНТІ	
АНТОНІЮК М.З., ШТЕФІЮК Т.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К. ПОЛІМОРФІЗМ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА АЛЕЛЯМИ МІКРО САТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ.....	97
ВОРОНОВА Н.В., РИЗЕВСКИЙ С.В., КУРЧЕНКО В.П., БУГА С.В. ОЦЕНКА УРОВНЯ НАСЫЩЕНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА СУБЪЕДИНИЦЫ I ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ С У ТЛЕЙ (<i>HEMIPTERA: STERNORRHYNCHA: ARNIDOIDEA</i>) КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОТНОСИТЕЛЬНОГО ВОЗРАСТА ТАКСОНОВ.....	102

ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., РОЖНОВА Н.А. СКРИНИНГ ГЕНОМНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ГАМЕТОФИТНЫМ АПОМИКСИСОМ У РАСТЕНИЙ <i>VOECHERA HOLBOELLII</i> (СЕМЕЙСТВО BRASSICACEAE).....	107
ГУЛЬКО Т.П., М.В. ДРАГУЛЯН, РЫМАР С.Е., В.А. КОРДЮМ, М.Ю. ЛЕВКИВ, Р.В. БУБНОВ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ У КРЫС ЛИНИИ <i>W1STAR</i> РАЗНОГО ВОЗРАСТА	111
ЄФІМЕНКО Т.С., АНТОНЮК М.З., МАРТИНЕНКО В.С. СТВОРЕННЯ ЧУЖИННО-ЗАМІЩЕНИХ ТА ЧУЖИННО-ДОДАНИХ ЛІНІЙ <i>TRITICUM AESTIVUM / AEGILOPS MUTICA</i>	114
КОВАЛЬЧУК М. В., ГУЛЬКО Т. П. МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ ICR, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОЙ К СПОНТАННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ	119
КОЗЕРЕЦЬКА Д.І., СЕРГА С.В., ДЕМИДОВА А.С., ШКЛЯР С.Є., КОЗЕРЕЦЬКА І.А. <i>НОВО</i> ТРАНСПОЗОН В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> УКРАЇНИ	123
КОЗЕРЕЦЬКА І.А., СЕРГА С.В., ПРОЦЕНКО О.В., ЖУК О.В., АЛЕКСАНДРОВ А.В., ДЕМИДОВ С.В. ЯВИЩЕ «МУТАЦІЙНОГО СПАЛАХУ» У ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> УКРАЇНИ.....	127
КРИЩУК И.А., ЧЕРЕПАНОВА Е.В., ГАЙДУЧЕНКО Е.С., ЗАДЫРА С.В., ЛЕВЕНКОВА Е.С., БАХАРЕВ В.А., БОРИСОВ Ю.М. ХРОМОСОМНАЯ РАСА КИЕВ <i>SOREX ARANEUS</i> В БАССЕЙНЕ ПРАВОБЕРЕЖЬЯ ДНЕПРА (БЕЛАРУСЬ): ПОЛИМОРФИЗМ И КОНТАКТЫ С ДРУГИМИ РАСАМИ	129
ЛЕВИТЕС Е.В., КИРИКОВИЧ С.С. НЕМЕНДЕЛЕВСКОЕ НАСЛЕДОВАНИЕ В ПОЛОВЫХ ПОТОМСТВА	133
ЛИХАЧЕВА Л.И., ШПИЛЕВАЯ С.П., РУБАН Т.А., ГУЛЬКО Т.П., КОРДЮМ В.А К ВОПРОСУ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.....	137
ЛІСОВСЬКА Т.П., КУЗЬМШИНА І.І., КОЦУН Л.О., ВОЙТЮК В.П. МЕЙОТИЧНА МУТАЦІЯ ТОМАТУ ЩО КОНТРОЛЮЄ ВИХІД ІЗ МЕЙОЗУ	140
ЛЫСЕНКО Н.Г., ЛЯН ХАОЮАНЬ, КЛИМЕНКО В.В. ОВОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ И СПОНТАННЫЙ ПАРТЕНОГЕНЕЗ У ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА <i>BOMBYX MORI</i> L.....	144
МАТВЕЕВСКИЙ С.Н., БАКЛУШИНСКАЯ И.Ю., ЛЯПУНОВА Е.А., КОЛОМИЕЦ О.Л. МЕЙОТИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ ХРОМАТИНА В СПЕРМАТОЦИТАХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ СЛЕПУШОНОК РОДА <i>ELLOBIUS</i>	149
ПІДПАЛА О.В., ЛУКАШ Л.Л. ТРНК ПРО- ТА ЕУКАРІОТНОГО ПОХОДЖЕННЯ ЯК СТРУКТУРНІ ОДИНИЦІ МОБІЛЬНИХ ГЕНЕТИЧНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ЕУКАРІОТ	153

ПОТАПОВА Т.В., ЗУБО Я.О., ТАРАСЕНКО В.И., БЕРНЕР Т., КОНСТАНТИНОВ Ю.М. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТРАНСКРИПЦИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ У <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	157
СТЕГНИЙ В.Н. ПРИНЦИПЫ ЭВОЛЮЦИОННОЙ И АДАПТАЦИОННОЙ ЗНАЧИМОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ВИДОВЫХ ГЕНОМОВ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СЕЛЕКЦИИ	161
ТЕРНОВСЬКА Т.К., АНТОНЮК М.З., МАРТИНЕНКО В.С. ГЕНИ – ПРОМОТРИ ОСТИСТОСТІ У ГЕНОМАХ <i>TRITICINAE</i>	164
ХАРЧЕНКО О.О. СЕРГА С.В., ПРОЦЕНКО О.В., ТРЕТЯК О.П., КОЗЕРЕЦЬКА І.А. МУТАЦІЙНІ ПРОЦЕСИ В ПРИРОДНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> З РІЗНИХ ЗА РАДІАЦІЙНИМ ЗАБРУДНЕННЯМ ТЕРИТОРІЙ.....	169
ХОХЛОВ А.М. МИКРОЭВОЛЮЦИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОМА СВИНЬИ В СЕЛЕКЦИИ	172
ЧИРКОВ С.Н., ИВАНОВ П.А, ШЕВЕЛЕВА А.А. ОБНАРУЖЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ НОВОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПЫ СЛИВЫ (<i>PLUM POX VIRUS</i>).....	177
ШПИЛЬЧИН В.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К. ЗАСТОСУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ IRAP ТА RAMAR ДЛЯ ПОЛІМОРФІЗМУ СЕРЕД АМФІДИПЛОЇДІВ, НЕСТАБІЛЬНИХ ЗА ОЗНАКОЮ ВОСКОВА ОСУГА.....	181
КЛІТИННІ, ГЕННІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ	
АНОПРІЄНКО О.В., ВАГІНА І.М., ЗАХАРУК О.А., МОРОЗОВА Л.М. СТРОКОВСЬКА Л.І. ЕКСПРЕСІЯ ІНТЕРФЕРОН-ЧУТЛИВИХ ГЕНІВ ПРИ СУМІСНОМУ КУЛЬТИВУВАННІ КЛІТИН МЕЛАНОМИ І ФЕТАЛЬНИХ ФІБРОБЛАСТІВ МИШІ.....	186
БЛИНСЬКА О. В. ВПЛИВ УМОВ ВИРОЩУВАННЯ ДОНОРНИХ РОСЛИН ТА СКЛАДУ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ЕФЕКТИВНІСТЬ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ РІПАКУ ЯРОГО В КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ <i>IN VITRO</i>	190
БУЛКО О.В., ЛЁШИНА Л.Г. СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ ИЗ ЗИГОТИЧЕСКИХ ЗАРОДЫШЕЙ И КАЛЛУСА ГИНКГО ДВУЛОПАСТНОГО <i>GINKGO BILOBA L.</i>	194
ГЕРАСИМЕНКО И.М., ШЕЛУДЬКО Ю.В. ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ТРАНЗИТНЫЕ ПЕПТИДЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ИМПОРТ РЕПОРТЕРНОГО БЕЛКА В ХЛОРОПЛАСТЫ С РАЗНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ.....	199
ГОНЧАРУК О.М., БАВОЛ А.В., МОРГУН Б.В., ДУБРОВНА О.В. АГРОВАСТЕРІУМ-ОПОСЕРЕДКОВАНА ТРАНСФОРМАЦІЯ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ШЛЯХОМ ІНОКУЛЯЦІЇ БАЗАЛЬНОЇ ЧАСТИНИ ПАГОНА.....	203

ГУЛЯЄВА Г.Б., БОГДАН М.М. ВПЛИВ ОБРОБКИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ РЕЧОВИНАМИ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КОМПОНЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ РОСЛИН ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ	207
ІВАННІКОВ Р.В. ХЛОРОЕМБРИОГЕНІЯ ОРХІДНИХ	212
ЄЛІСЄЄВА Ю. В., МАТВЄЄВА Н. А. ВИКОРИСТАННЯ <i>AGROBACTERIUM RHIZOGENES</i> -ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ВМІСТУ ПОЛІФРУКТАНІВ У КОРЕНЯХ САЛАТУ <i>LACTUCA SATIVA</i> L	216
ЖУК І.В., ДМИТРІЄВ О.П. ІНДУКЦІЯ ЗАХИСНИХ РЕАКЦІЙ ПШЕНИЦІ, ІНФІКОВАНОЇ ЗБУДНИКОМ СЕПТОРІОЗУ	219
ЗАМБРІБОРЦІ І.С., ШЕСТОПАЛ О.Л., ДОБРОВА Г.О., ШПАК Д.В. ОСОБЛИВОСТІ АНДРОГЕНЕЗУ <i>IN VITRO</i> МІЖСОРТОВИХ ГІБРИДІВ <i>ORYZA SATIVA</i> L. УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ	224
ЗАРДИНОВА Г.Р., ЗАЯКИН В.В., НАМ И.Я. ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ ГИПОКОТИЛЯ РАЗНЫХ СОРТОВ УЗКОЛИСТНОГО ЛЮПИНА (<i>LUPINUS ANGUSTIFOLIUS</i>).....	228
ЗЕЛЕНИНА Е.А., МАШКИНА О.С. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛЛЕКЦИИ КЛОНОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ (<i>BETULA PENDULA</i> ROTH VAR. <i>CARELICA</i> MERKL.) В ДЛИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	232
ЗІНЧЕНКО М. О., БАВОЛ А. В., ДУБРОВНА О. В. ГЕНОМНА МІНЛИВІСТЬ КЛІТИННИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ, СТІЙКИХ ДО МЕТАБОЛІТІВ ЗБУДНИКА ОФІОБОЛЬОЗУ, ЗА ДІЇ ОСМОТИЧНОГО СТРЕСУ	236
КАСІЯНЧУК Р.М., А.Р. ВОЛКОВ, І.І. ПАНЧУК ВПЛИВ САХАРОЗИ НА РІВЕНЬ мРНК <i>APX</i> ЗА ДІЇ ПІДВИЩЕНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ	240
КИРПА Т.Н., В.А. РУДАС, О.А. ОВЧАРЕНКО, А.А. КЛЕБАНОВИЧ, И.М. ГЕРАСИМЕНКО, Р.В. ИВАННИКОВ, А.Н. ОСТАПЧУК, И.В. ГОЛДЕНКОВА- ПАВЛОВА, Ю.В. ШЕЛУДЬКО ГЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ Δ9-АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ ЦИАНОБАКТЕРИИ В ОРХИДЕЕ <i>DENDROBIUM LINGUELLA</i> RCHB. F.	244
КОМИСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСКАЯ С.И., АДАМЕНКО Н.И, ТИЩЕНКО Е.Н. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ <i>AGROBACTERIUM</i> -ОПОСРЕДОВАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ПОДСОЛНЕЧНИКА (<i>HELIANTHUS ANNUUS</i> L.) <i>IN PLANTA</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ШТАММА <i>LV44404</i> , НЕСУЩЕГО ПЛАЗМИДУ <i>PV12E</i> С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ РНК-СУПРЕССОРОМ ГЕНА ПРОЛИНДЕГИДРОГЕНАЗЫ	249
КОСТЮКОВА Е.Е., НАМ И.Я., ЗАЯКИН В.В. РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ЛУКОВИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ РЕДКОГО ОХРАНЯЕМОГО РАСТЕНИЯ <i>LILIUM MARTAGON</i> L.....	253

КРУГЛОВА А.Е., КРУГЛОВА Н.Н. БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ <i>OXYTROPIS BASCHKIRENSIS</i> KNJASEV В ЭМБРИОКУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	256
КУЗОВКОВА А.А., МАЗУР Т.В., АЗИЗБЕКЯН С.Г., РЕШЕТНИКОВ В.Н. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА И СЕЛЕНИТА НАТРИЯ НА КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ МНОГОКОЛОСНИКА МОРЩИНИСТОГО	260
ЛЕМЕШ В.А., ГУЗЕНКО Е.В., САКОВИЧ В.И., НИКОЛАЙЧИК Е.А., ЕВТУШЕНКОВ А.Н. СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЬНА (<i>LINUM USITATISSIMUM</i> L.), НЕСУЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ГЕН УСТОЙЧИВОСТИ К ГЛИФОСАТУ, МЕТОДАМИ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ	264
МАЙСТРЕНКО О.М., ЛУЧАКІВСЬКА Ю.С. ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ КУЛЬТУР „БОРОДАТИХ” КОРЕНІВ ТОПІНАМБУРУ (<i>HELIANTHUS TUBEROSUS</i> L.), ЯКІ МІСТЯТЬ ГЕН ЛЮДСЬКОГО ІНТЕРФЕРОНУ АЛЬФА-2В.	268
МАМЕДОВА А.Д. ИНТЕНСИВНОСТЬ СИНТЕЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ОРГАНЕЛЛАХ РАСТЕНИЙ ПРИ ГЕТЕРОЗИСЕ И СТИМУЛЯЦИИ РОСТОВЫХ ПРОЦЕССОВ, ВЫЗЫВАЕМЫХ ДЕЙСТВИЕМ ГИДРАЗИД МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ.....	273
МАРКОВСЬКИЙ О.В., БАННИКОВА М.О., МИХАЛЬЧЕНКО М.В., МОРГУН Б.В. ВИЯВЛЕННЯ <i>CRY</i> ГЕНІВ, ЯКІ ДЕТЕРМІНУЮТЬ СТІЙКІСТЬ ДО КОМАХ, ЗА ДОПОМОГОЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У ТРАНСГЕННОЇ КУКУРУДЗИ.....	276
МАТВЕЕВА А.Ю., КУРЧИЙ В.М., ТИЩЕНКО Е.Н. АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ МЕТАБОЛИЗМА САХАРОЗЫ В ЭНДОСПЕРМЕ МОЛОЧНО- ВОСКОВОЙ СПЕЛОСТИ Т2-РАСТЕНИЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ <i>IN PLANTA</i> С ПОМОЩЬЮ LBA4404 (PBI2E).....	281
МАТВЄЄВА Н.А., КУДРЯВЕЦЬ Ю.Й., ЛІХОВА О. О., КВАСКО О.Ю., ШАХОВСЬКИЙ А.М. ПОРІВНЯННЯ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ З ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ ЦИКОРІЮ, САЛАТУ ТА АЛТЕЯ	285
МЕЛЬНИЧУК М.Д., КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., ЛІХАНОВ А.Ф., АВЕТИСЯН Ю.Ф. СПЕЦИФІЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТКАНИН РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ ТОМАТІВ (<i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i> MILL.) ПІД ВПЛИВОМ ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ	289
ПАРХОМЕНКО А.Л., ПУНИНА Н.В., ЗОТОВ В.С., ПАРХОМЕНКО Т.Ю. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>	293
РОНИН Е.И., МИНКОВА Д.М., МЕСТЕР Д.И., КОРОЛЬ А.Б. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КАРТИРОВАНИЯ НА ОСНОВЕ SNP-МАРКЕРОВ	297

САХНО Л.А., СЛИВЕЦ М.С., ПЕТЕРСОН А.А., КОРОЛЬ Н.А., КАРБОВСКАЯ Н.В., ОСТАПЧУК А.Н., КУЧУК Н.В. ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИСТЬЕВ РАПСА С ТРАНСГЕНОМ <i>CYP11A1</i> В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОГО СТРЕССА	301
СПРАНТ Л.В., ДИКУН М.О., ПОЧИНОК В.М., ЗАВАЛЬНА Г.В. ІДЕНТИФІКАЦІЯ БІЛКОВИХ СПЕКТРІВ ПИВОВАРНИХ СОРТІВ ЯЧМЕНЮ	306
СТЕПАНЕНКО О.В., СТЕПАНЕНКО А.І., МОРГУН Б.В. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ <i>Wx</i> У ЛІНІЯХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ КОДОМІНАНТНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ	309
СТОЛЕПЧЕНКО В.А., ВАСЬКО П.П., КОНДРАЦКАЯ И.П., ФОМЕНКО Т.И. РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ СОЗДАНИЯ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ЛИСОХВОСТА.....	313
УРБАНОВИЧ О.Ю., КУЗМИЦКАЯ П.В., КОЗЛОВСКАЯ З.А., АНОШЕНКО Б.Ю. ГОМОЛОГ ГЕНОВ <i>HcrVf</i> СЕМЬИ ЯБЛОНИ ИЗ ГЕНОМА ГРУШИ	318
ФОМИНА И.Р., КРЕСЛАВСКИЙ В.Д., БАЛАХНИНА Т.И., ГЕРЦ С.М., ИВАНОВ А.А., КОСОБРЮХОВ А.А., ЛЮБИМОВ В.Ю., НАЗАРОВА Г.Н., БИЛЬ К.Я. СТРЕСС РЕАКЦИИ ЦИАНОБАКТЕРИЙ С НАРУШЕННЫМИ АНТИОКСИДАНТНЫМИ ГЕНАМИ	322
ШЕСТОПАЛ О.Л., ЗАМБРІБОРЦ І.С., ТОПАЛ М.М., ЛІТВИНЕНКО М.А., ІГНАТОВА С.О. ВИВЧЕННЯ ГАПЛОПРОДУКЦІЙНОЇ ЗДАТНОСТІ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З ПШЕНИЧНО-ЖИТНІМИ ТРАНСЛОКАЦІЯМИ	326
ЩЕРБАК Н.Л., КУРЧЕНКО И.Н., ЮРЬЕВА Е.М., КУЧУК Н.В. ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ И САЛАТА, НЕСУЩИХ ГЕН СЛАДКОГО БЕЛКА ТАУМАТИНА II.....	330
ЯМСКОВА В.П., КРАСНОВ М.С., РЫБАКОВА Е.Ю., КУЛИКОВА О.Г., ИЛЬИНА А.П., ЯМСКОВ И.А. НОВАЯ ГРУППА МЕМБРАНОТРОПНЫХ ГОМЕОСТАТИЧЕСКИХ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОРЕГУЛЯТОРОВ.....	334

ІСТОРІЯ БІОЛОГІЇ

МАЛЕЦКИЙ С.И. ГЕНО- И ОРГАНИЗМОЦЕНТРИЧЕСКИЕ ПАРАДИГМЫ В БИОЛОГИИ	339
ПІСКУН Р.П., КОЛОМІЄЦЬ Н.Г., ЛИСА Н.А., ВАЩУК А.А., ПОЛЕСЯ Т.Л. ІСТОРІЯ БІОЛОГІЇ В ДАТАХ ТА ІМЕНАХ – ДО 80-РІЧНОГО ЮВІЛЕЮ КАФЕДРИ БІОЛОГІЇ ВІННИЦЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ім. М.І. ПИРОГОВА.....	343
РУБАН Ю. Д. ИСТОРИЧЕСКИЙ МЕТОД В ИЗУЧЕНИИ МАКРОЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ	347

СТЕЛЬМАХ А.Ф., ФАЙТ В.І. ІСТОРІЯ ДОСЛІДЖЕНЬ З ГЕНЕТИКИ РОСЛИН У СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНОМУ ІНСТИТУТІ ПРОТЯГОМ 100 РОКІВ	351
ФОМИНА І.Р. «КОРНИ НАУЧНОГО ЗНАНИЯ ТЕРЯЮТСЯ В БЕСКОНЕЧНОЙ ДАЛИ ВЕКОВ ...» В.И. ВЕРНАДСКОМУ ПОСВЯЩАЕТСЯ	355
ЭЙГЕС Н.С., Г.А. ВОЛЧЕНКО, С.Г. ВОЛЧЕНКО ЯВЛЕНИЕ «ХИМИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ» И.А. РАПОПОРТА – КРУПНЕЙШЕЕ ОТКРЫТИЕ XX ВЕКА	357

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

**ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ
ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ**

**ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ**

**FACTORS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS**

**Збірник наукових праць
ТОМ 12**

Технічні редактори: *М. З. Мосула, О. Ю. Майорова*
Комп'ютерна верстка *О. В. Лохвицький*
Коректура автора
Художнє оформлення *Є. Ю. Музиченка*

Підписано до друку 01.07.2013. Формат 60×84¹/₈. Папір офс. № 1.
Гарнітура “Таймс”. Друк офс. Ум. друк. арк. 43,2 Обл.-вид. арк. 44,8
Наклад 300 прим. Зам. 403.
Віддруковано у видавництві “ЛОГОС” з оригіналів автора.
Свідоцтво ДК № 201 від 27.09.2000 р.
01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-60-03