

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

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

TOPICS IN EXPERIMENTAL
EVOLUTION OF ORGANISMS

Збірник наукових праць

ТОМ 11

*Присвячено:
90-річчю від дня народження Р.Г. Бутенко*

Київ
ЛОГОС — 2011

ББК 28.02я43

Ф18

УДК 578.08+631.52

Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук.
Ф18 пр. / НАН України, НААН України, НАМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.].— К.: Логос, 2003—2011.

Т. 11: присвяч. 90-річчю від дня народження Р. Г. Бутенко.— 2011.— 584 с.: іл.— укр., рос.— бібліогр. В кінці ст.

ISBN 978-966-171- (Т. 11).

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 90-річчю від дня народження Р. Г. Бутенко. В оглядових і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямів вивчення особливостей еволюції в природі та експерименті, молекулярної структури та організації геномів, генетико-біотехнологічного розширення генетичної мінливості живих організмів, сучасних методів біотехнології і генетичної інженерії при створенні нового покоління сортів і гібридів культурних рослин, ДНК-технологій і молекулярних маркерів у селекції рослин і тварин, генетики людини та медичної генетики.

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

ББК 28.02я43

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

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

Затверджено до друку рішенням вченої ради Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (протокол №6 від 5 квітня 2011 р.)

ISBN 978-966-171-413-6 (Т.11)

© Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2011

РАИСА ГЕОРГИЕВНА БУТЕНКО (1920 – 2004)

13 сентября 2010 г. исполнилось 90 лет со дня рождения выдающегося ученого, основателя в СССР биотехнологии растений и научной школы биологии растительной клетки – Раисы Георгиевны Бутенко (годы жизни 13.09.1920–26.03.2004).

Р. Г. Бутенко родилась в г. Белом Тверской обл. Ее отец был продовольственным комиссаром Бельского уезда, а мать – учительницей. В 1924 г. семья переезжает в Смоленск, а через несколько лет – в Москву, где Р.Г. Бутенко заканчивает среднюю школу. В 1937 г. она поступает в Тимирязевскую сельскохозяйственную академию. Получение диплома о высшем образовании приходится на трудные военные годы (1942 г.) и Раиса Георгиевна направляется по распределению на работу агрономом в совхоз, расположенный под Ташкентом. Через полтора года (1944 г.) ей удается вернуться в Москву и она поступает в аспирантуру ТСХА на кафедру ботаники к профессору П.М.Жуковскому. Кандидатскую диссертацию на тему «Эмбриология диплоидных и экспериментально полученных полиплоидных форм капусты» она защитила в 1948 году, практически одновременно с печально знаменитой сессией ВАСХНИЛ. В этом же году Р.Г. Бутенко приходит на работу в Институт физиологии растений АН СССР и остается в его стенах до конца своих дней.



Научная деятельность Раисы Георгиевны в институте началась с должности младшего научного сотрудника в Лаборатории ионизирующих излучений с изучения их влияния на деление клеток. С 1953 г. по 1956 г. она занимает пост ученого секретаря Института, становясь ближайшей помощницей директора – академика А.Л.Курсанова. В 1957 г. А.Л.Курсанов предлагает ей начать исследования по новому для физиологии растений направлению – культивированию клеток и тканей растений в условиях *in vitro*, с которым он ознакомился во время научной поездки во Францию. И эту дату мы можем считать началом эры биотехнологии в нашей стране, а Раису Георгиевну – ее родоначальником и основоположником. Именно она, являясь активным пропагандистом метода клеточных культур как в научной среде, так и среди населения, способствовала достаточно быстрому его распространению среди ученых и практиков. Можно даже говорить о том, что ее миссия аналогичная таковой К.А. Тимирязева, который в свое время поднял престиж физиологии растений в стране.

В конце 50-х – начале 60-х г.она исследовала условия введения разных видов и тканей растений в культуру *in vitro* и особенности их роста и метаболизма. Можно считать, что основной проблемой в этот период было получение культур тканей растений и изучение “системы” – закономерностей поведения изолированных и культивируемых в искусственных условиях клеток и тканей.

В 1963 г. в Институте физиологии растений создается межлабораторная группа изолированных тканей и органов, состоящая из сотрудников лабораторий роста и развития (Р.Г. Бутенко), корневого питания (А.М. Смирнов) и передвижения веществ (М.С. Бардинская).

В этом же году Раиса Георгиевна защищает докторскую диссертацию по теме «Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений». Вскоре результаты этих исследований были обобщены в одноименной монографии, выпущенной издательством «Наука» (1964), которая до сих пор является настольной книгой для многих специалистов, работающих в области биотехнологии. Позднее это издание было переведено на английский язык (1968) и стало первой англоязычной монографией в мире по данному направлению.

После защиты докторской диссертации Раиса Георгиевна уделяет большое внимание широкому и систематическому развитию работ по культуре тканей, клеток и протопластов растений. Ее выступления, публикации и непосредственные контакты с научными исследователями различных институтов и университетов нашей страны способствуют организации новых групп и лабораторий, занимающихся изучением культур клеток и тканей растений, многие сотрудники которых прошли обучение и стажировку в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева под руководством Р.Г. Бутенко и ее коллег. Даже сейчас практически во всех центрах России и других стран СНГ, где проводятся исследования на основе клеточных культур растений, работают ее ученики и последователи.

Широкомасштабные исследования по клеточным культурам растений поставили вопрос об их координации. Результатом этого явилось принятие решения о проведении в Москве I Всесоюзной конференции по культуре изолированных органов, тканей и клеток растений (январь 1968 г.), которая действительно была первой в мире и даже предшествовала I Международному Конгрессу по клеточным культурам (Страсбург, 1970 г). Всесоюзные конференции стали регулярными (с интервалом 4-5 лет), собирая специалистов разных стран, с 1988 года эти конференции приобрели статус «Международных».

Активная научная позиция Раисы Георгиевны способствовала тому, что она стала представителем от СССР в Международной ассоциации «Plant Cell and Tissue Cultures». В результате этого ученые Советского Союза получили возможность участвовать во всех последующих международных конгрессах и иметь информацию о работах в этой области.

Этот период совпал и с тем, что созданный Раисой Георгиевной коллектив единомышленников, на протяжении многих лет с энтузиазмом раз-

вивавший новое направление – биологию клеток растений *in vitro*, получил статус лаборатории культуры тканей и морфогенеза (1970 г.). В дальнейшем она была трансформирована в отдел биологии клетки и биотехнологии, включающий две лаборатории (Лаборатория физиологии культивируемых клеток, Лаборатория генетики культивируемых клеток) и три группы (Группа морфогенеза *in vitro*, Группа криосохранения, Группа Всероссийской коллекции культивируемых клеток). Почти все новые, приоритетные направления в изучении культуры клеток растений были инициированы или поддержаны Раисой Георгиевной. Так, в начале 60-х годов XX века они были направлены на цитогенетические исследования тканевых культур, позволившие сформулировать новые представления о генетической гетерогенности клеточных популяций и растений-регенерантов.

В следующее десятилетие (70-е годы) продолжилось всестороннее изучение закономерностей морфогенеза и поведения клеточных популяций *in vitro*, которые послужили основой для всех последующих работ с культурами клеток растений. В этот же период произошел прорыв в исследованиях с изолированными меристемами. Ранее было показано, что апикальные меристемы не содержат вирусной инфекции, что дало стимул для широкого развития нового направления – оздоровления и микрোকлонального размножения посадочного материала вегетативно размножаемых растений. Начались интенсивные работы по культивированию изолированных пыльников как источников гаплоидных растений. Полученные знания быстро и успешно применялись для практических целей.

Характерной чертой Раисы Георгиевны являлось умение чутко реагировать на все новые идеи в научном мире. Она сразу же поняла перспективность использования протопластов, возможность получения соматических гибридов и трансгенных растений. Вместе с Ю.Ю. Глебой, который стал ее киевским аспирантом, она начала исследования по слиянию протопластов и получению парасексуальных гибридов. Затем, в совместных работах с другим украинским аспирантом – А.А. Кучко, был получен первый в мире “соматический гибрид” дикого и культурного картофеля, несущий митохондриальные гены устойчивости к вирусам дикого картофеля, который в дальнейшем был успешно использован в селекционных программах. Позднее Р. Г. Бутенко поддержала широкомасштабные работы казахских исследователей по созданию комплексной биотехнологической программы селекции злаков.

Расцветом биологии клеток и биотехнологии растений можно считать 80-е годы XX века. Развитие метода, хорошее знание поведения клеток растений в культуре *in vitro* и тесное взаимодействие исследователей позволяло использовать клеточные культуры для изучения разных разделов биологии. В этот период разрабатывались технологии для прикладной генетики и селекции. Обсуждались проблемы соматической вариабельности, геной и клеточной инженерии, возможностей сельскохозяйственной биотехнологии.

Большое внимание уделялось изучению вторичного метаболизма в культуре клеток лекарственных растений. Намечились основные направления, связанные не только с получением и оптимизацией условий культивирования новых видов, но и с фармакологической оценкой лекарственных препаратов. Большое внимание уделялось селекции высокоактивных штаммов-продуцентов биологически активных веществ, а также их выращиванию в биореакторах. Встал вопрос о роли клеточных технологий в сохранении генетических ресурсов, о возможности создания генетического пула растений в банках клеточных культур, меристем и семян. Это привело к созданию банка клеточных культур и необходимости изучения условий глубокого замораживания клеток.

Следующее десятилетие (конец XX века) ознаменовалось внедрением новых молекулярно-биологических методов в фундаментальные, и прикладные исследования по клеточным культурам растений. Возник большой интерес к генетической трансформации различных организмов и получению трансгенных растений, на которые в этот период развития науки и практики возлагались большие надежды.

Раиса Георгиевна, которая активно взаимодействовала со многими специалистами, работавшими в области клеточных культур растений, считала важной координацию этих исследований. Она и Ю.А. Овчинников, понимавшие важность и перспективность развития биотехнологии в АН СССР, в 80-е годы способствовали созданию таких целевых программ, как “Клеточная селекция” и “Биотехнология”. В этот же период Академия сельскохозяйственных наук организовала издание “Методических указаний” по прикладным разделам биологии культивируемых клеток (андрогенезу, клеточной селекции, криосохранению), которые способствовали быстрому развертыванию и интенсификации работ по гаплоидной клеточной селекции и соматональным вариантам.

Очень большую положительную роль сыграла созданная несколько позже Межведомственная научная программа по биотехнологии, которая координировала в масштабах СССР все работы по фундаментальным исследованиям, практические разработки по сельскохозяйственным культурам, а также включение достижений биотехнологии в селекционные программы. При этом работы по Межведомственной программе шли в тесном контакте с Международной программой СЭВ. Такая интеграция принесла значительные успехи: в это время с помощью биотехнологических методов были созданы новые сорта ячменя, риса, пшеницы, картофеля, кормовых трав. Вся эта огромная организационная работа шла под руководством и при непосредственном участии Раисы Георгиевны.

Р. Г. Бутенко была создателем нового направления современной физиологии растений и биотехнологии – биологии культивируемых клеток высших растений и бессменным лидером в СССР работ в этой области на протяжении полувека. Фундаментальные исследования, выполненные ее научным коллективом и учениками, позволили изучить молекулярные и клеточные механизмы дедифференцировки клеток растений в условиях *in*

in vitro, особенности пролиферации клеточных культур, закономерности органогенеза и соматического эмбриогенеза. Эти исследования, в сочетании с изучением генетики соматических клеток на молекулярном, цитогенетическом и популяционном уровнях, позволили разработать ряд современных биотехнологий. Среди них – технологии для сельского хозяйства: клонального размножения и оздоровления посадочного материала и новых сортов сельскохозяйственных растений; методы *in vitro*, ускоряющие и облегчающие селекционный процесс; методы, создающие генетическое разнообразие исходных форм (мутагенез и клеточная селекция, соматическая гибридизация, перенос генов). Уже нашли свое место в селекционном процессе методы криосохранения меристем и пыльцы, впервые разработанные в Отделе, руководимом Р.Г.Бутенко. Основное внимание при разработке технологий уделялось важнейшим сельскохозяйственным культурам – пшенице, кукурузе, рису, картофелю. Помимо сельскохозяйственных технологий, были разработаны и внедрены биотехнологии использования культур клеток в качестве продуцентов ценных биологически-активных веществ для медицины, ветеринарии, парфюмерной и пищевой промышленности. Еще в 1974 г. на основе полученных Р.Г. Бутенко и ее коллегами культур клеток в СССР впервые в мире было организовано промышленное производство биомассы женьшеня *in vitro*.

На счету Раисы Георгиевны свыше 300 печатных работ, в том числе монографии по культуре клеток и тканей растений, учебного пособия для студентов ВУЗов, нескольких коллективных монографий, более 20 изобретений. Под ее руководством защищено 30 кандидатских и 10 докторских диссертаций.

Большое внимание Р. Г. Бутенко уделяла педагогической работе, за что ей в 1991 г. было присуждено звание профессора. Она занимала пост профессора Московского государственного университета, читая прекрасные, яркие лекции по биотехнологии, которые с удовольствием посещали не только студенты биологического факультета, но и сотрудники, аспиранты и коллеги из других научно-исследовательских институтов Москвы и других городов. Ею были прочитаны также курсы лекций в Тимирязевской сельскохозяйственной академии, на факультетах повышения квалификации, а также во многих университетах СССР.

Большой вклад Раисы Георгиевны в развитие и становление в нашей стране такого важного научного направления, как биотехнология, был поддержан Академией наук СССР, избранием ее членом-корреспондентом АН СССР (1974 г.). В 1985 г. ее избирают членом-корреспондентом, а в 1986 году – действительным членом ВАСХНИЛ.

Р.Г. Бутенко была удостоена и многих правительственных наград. Она – лауреат Государственной премии СССР за цикл работ «Разработка фундаментальных основ клеточной (генетической) инженерии растений», опубликованных в 1964-1982 г.г. (1984), кавалер орденов Трудового Красного Знамени и Октябрьской Революции. Награждена орденом «Знак Почёта».

Подводя итог можно сказать, что «увлечение» Раисы Георгиевны Бутенко культурой растительных клеток позволило не только ей, но и ее коллегам и последователям пройти большой, интересный и увлекательный путь от создания системы “культура клеток растений” и ее всестороннего изучения до понимания мощного потенциала этой системы и создания на основе фундаментальных достижений нового направления – “Биотехнологии растений”, которое уже в новом XXI веке поражает нас своими достижениями и возможностями. И мы еще раз благодарим ее основателя – Раису Георгиевну Бутенко – за то, что она много лет назад увидела большие перспективы этого направления, сумела увлечь других исследователей и создать блестящую и авторитетную научную школу.

Избранные публикации Р.Г. Бутенко.

Бутенко Р.Г. Культура изолированных растительных тканей // Физиол. раст. 1956. Т. 3, вып. 3. С. 277-286.

Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей как метод изучения процессов роста и морфогенеза растений // Рост растений / Под ред. Бутенко Р.Г. Львов: изд-во Львовского гос. ун-та, 1959. С. 32-37.

Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука. 1964. – 272 с.

Бутенко Р.Г. Культура тканей лекарственных растений и перспективы ее использования в фармации // Тр. ЛХФИ. Вопросы фармакогнозии. 1967. Т. 21. № 4. С. 184-191.

Загорска Н.А., Шамина З.Б., Бутенко Р.Г. Изучение растений-регенерантов, полученных в культуре ткани табака // Генетика. 1971. Т. 7. С. 23-36.

Глеба Ю.Ю., Бутенко Р.Г., Сытник К.М. Слияние протопластов и парасексуальная гибридизация у *Nicotiana Tabacum* L. // Докл. АН СССР. 1975. Т. 221. С. 1196-1198.

Бутенко Р.Г., Кучко А.А. Получение межвидового соматического гибрида картофеля методом слияния изолированных протопластов // Докл. АН СССР. 1979. Т. 247. С. 491-495.

Бутенко Р.Г. Гибридизация соматических клеток растений // Сб. “Мол. механизмы генетических процессов”. 1979. С. 43-89.

Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // В кн.: “Культура клеток растений и биотехнология”. 1986. М.: Наука. С. 3 – 20.

Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в сельскохозяйственной науке и практике. // Основы сельскохозяйственной биотехнологии. 1990. М.: Агропромиздат. С. 154 – 235.

Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. 1999. М.: ФБК – ПРЕСС. 159 с.

Butenko R., 1979. Cultivation of isolated protoplasts and hybridization of somatic plant cells. Int. Rev. Cytol, v. 59. P. 323 – 373.

Butenko R., 1985. Some features of cultured plant cells. MIR Publishers . P. 11 – 34.

Butenko R., Nikiforova I., Chernov V., 1988. Growth and morphogenesis in cell cultures of spring wheat under stress conditions and selection of tolerant cell lines. Potsdamerforschungen, Naturwissenschaftliche, Reihe B, Heft 57, 9 – 19.

ЗАГОСКИНА Н.В., НОСОВ А.М.

*Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева РАН*

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМОВ У ПРИРОДЫ ТА ЭКСПЕРИМЕНТЫ

БАТУРИН С.О.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: SO_baturin@mail.ru

СЕГРЕГАЦИЯ ПО ПОЛОВОМУ СТАТУСУ ЦВЕТКОВ В РЯДУ СЕМЕННЫХ ПОКОЛЕНИЙ *FRAGARIA* × *ANANASSA* DUCH. ПРИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ

Основная модель наследования пола в роде *Fragaria* была предложена С. Correns, [1], а в дальнейшем дополнена Е. Kuhn [2] и G. Staudt [3]. В соответствии с представлениями Корренса, пол цветков у многих видов растений контролируется AG комплексом генов в аутосомах: А – комплекс генов, ответственный за формирование признаков андроеца, G – комплекс генов, ответственный за формирование признаков гинецея. Каждая клетка имеет возможность развиваться в любом из двух направлений, а выбор направления зависит от специфических генов М и F, обозначаемых термином «реализаторами пола». Гены реализаторы пола «решают», какая из двух потенциальных («бисексуальных») возможностей развития AG комплекса реализуются в клетках.

У крупноплодной земляники *Fragaria* × *ananassa* Duch. ($2n=8x=56$) в норме соотношение частот сеянцев с пестичными и обоеполыми цветками в семенном потомстве соответствует как 0,4500 : 0,5500, соответственно [4]. Растения с обоеполым типом цветков гомозиготны по рецессивному фактору, определяющему обоеполость цветков на растении [3]. При самоопылении обоеполых растений, как правило, в потомстве наблюдается единообразие по половому статусу сеянцев. Однако, по данным литературы и по собственным наблюдениям среди обоеполых сеянцев *F.* × *ananassa* изредка встречаются растения с доминантным фенотипом – пестичный тип цветков [5,6]. Изучение семенного потомства, полученного от таких растений, показало, что пестичный тип цветков наряду с обоеполым типом цветков наследуется в первом и втором поколениях [7].

Несоответствие сегрегационных отношений по типу пола сеянцев в зиготическом потомстве можно объяснить, приняв эпигенетическую модель контроля наследования типа пола цветков у крупноплодной земляники. Согласно этой модели, при семенном воспроизводстве возможно метилирование генома у обоеполых растений и, в частности, комплекса генов ответственных за развитие микроспорангиев. В результате растения приобретают иной фенотип – пестичный тип цветков. Эпигенетический контроль хорошо

описан для гендерных признаков (половой структуры цветка) у ряда видов растений [8,9,10]. Показано, что у двудомного тетраплоидного вида *Fragaria orientalis* Loz. ($2n=4x=28$) обработка семян раствором 5-азацитидина (ингибитор реакции метилирования ДНК) приводит к появлению в семенном потомстве сеянцев с обоеполюми цветками [11]. Появление обоеполюх сеянцев произошло за счет уменьшения выборки сеянцев с тычиночными цветками (так называемых «мужских» растений). Имеются сведения, что изменение полового статуса растений могут вызывать уникальное сочетание факторов среды: длина дня, высокие температуры воздуха, интенсивность солнечного излучения, богатые калием почвы, высокое содержание в почве органического удобрения (навоза), высокое содержание гиббериллинов в растении, травма от ростовой обрезки, удаления листьев, цветков [9]. Кроме того, смена способа семенного размножения с зиготического на апомитотический (агамоспермный), также может быть причиной появления половых эпифенотипов в семенном потомстве [12]. Цель настоящей работы – проанализировать характер сегрегации эпифенотипа «пестичный тип цветков» в ряду семенных потомств *Fragaria x ananassa* Duch. при открытом опылении.

Материал и методы

В качестве материала использованы гибриды и сорта крупноплодной земляники *Fragaria x ananassa* ($2n=8x=56$) из коллекции земляник лаборатории популяционной генетики растений ИЦиГ СО РАН. Гибриды F_1 , среди которых были выделены единичные эпифенотипы с пестичными цветками, были получены от скрещивания обоеполюх представителей *F. x ananassa* (ремонтантного сорта Elin) и гибридов – № В2-38-5 и № 02/5-1-5 [7]. Скрещивания образцов были проведены в условиях экспериментального участка.

Для генетического анализа использована модель полисомического могогенного расщепления по фактору пола, основанная на гипергеометрическом типе распределения частот гамет у автополиплоидов, в частности, у октоплоидной земляники [4]. При использовании этой модели в эксперименте были приняты следующие условия: а) признак «тип пола цветка» контролируется двумя аллелями одного гена – A и a , при этом доминантный аллель A определяет женский тип пола цветка, рецессивный a – обоеполюсть; б) экспрессия альтернативных фенотипов (пестичный тип пола цветка и обоеполюсть) регулируется соотношением доминантных и рецессивных аллелей в генотипе, что обуславливает пол цветка. Для проверки гипотезы соответствия опытных данных теоретически ожидаемой сегрегации по типу пола в потомстве использовали критерий логарифмического правдоподобия G [13].

Результаты и обсуждение

Принято считать, что обоеполюе образцы *F. x ananassa* гомозиготы по рецессивному фактору – обоеполюсти, поэтому, как при открытом варианте опыления, так и при искусственном опылении смесью пыльцы или пыль-

дой лишь одного генотипа, растения $F_1 \times ananassa$ с пестичным типом цветков в своем семенном потомстве всегда демонстрируют сегрегацию на сеянцы с пестичными или обоеполыми цветками близкую к соотношению 1:1. В наших экспериментах это соотношение подтверждалось в многочисленных скрещиваниях, в том числе и для образцов с пестичными цветками [7]. При открытом опылении обоеполых образцов, как правило, выращенные сеянцы имеют обоеполый статус цветков. Тем не менее, некоторые исходные обоеполые образцы (рецессивный фенотип) формируют в своем семенном потомстве с частотой до 5% сеянцы с пестичными цветками (доминантный фенотип). Так, у гибрида № 02/5-1-5, имеющего обоеполый статус цветков, в семенном потомстве обнаружена сегрегация на сеянцы с пестичным типом цветков – 13 (4,7%) растений и с обоеполыми цветками – 261 (95,3 %) растение, а у сорта Elin – 1 (2,1%) растение и 47 (97,8 %), соответственно [7]. Появление в поколении F_1 растений с доминантным (пестичным) типом цветков мы объясняем эпигенетическим контролем наследования типа пола цветков у крупноплодной земляники. При таком контроле происходит спонтанное метилирование комплекса генов ответственных за развитие микроспорангиев. В результате растения имеют пестичный тип цветков. Результаты сегрегации эпифенотипа «пестичный тип пола цветков» в поколении F_2 представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Сегрегация половых фенотипов во втором семенном поколении гибридов с пестичным типом пола цветков в открытом режиме саморепродукции

Материнская форма (F1) и пол ее цветков	Происхождение материнской формы	Отношение фенотипов у сеянцев по типу пола цветков				Критерий соответствия G
		в опыте		теоретически ожидаемые согласно менделеевским законам сегрегации признака		
		♀	♂	0,4500 ♀	0,5500 ♂	
№ 94-26 ♀	02/5-1-5 × Elin	1 (2,9%)	34	15,75	19,25	25,11
№ 94-17 ♀	02/5-1-5 × Elin	17 (10,2%)	149	74,70	91,30	81,0
№ 89-17 ♀	02/5-1-5 × Elin	0	10	4,50	5,50	–
№ 82-12 ♀	Elin × B2-38-5	0	21	9,45	11,55	–
№ 3-2 ♀	Сеянец сорта «Сариан»	0	20	9,00	11,0	–

$$G_{0,05}=3,84$$

В таблице 1 показано, что у части растений гибридов F_1 – № 94-26 и № 94-17, хотя и с невысокой частотой возникает новый доминантный фенотип – пестичный статус цветков на растениях. У другой части гибридных растений (№ 82-12, № 89-17 и № 3-2) в семенном потомстве новый фенотип не возникает. Следуя логике наследования признаков согласно менделеевским

законам, от вышеуказанных гибридов мы вправе ожидать сегрегацию половых фенотипов близкую к соотношению 1:1. Однако в нашем эксперименте этого не произошло, о чем убедительно свидетельствуют значения G – критерия. У исследованных гибридов с новым пестичным половым фенотипом, очевидно, вновь произошло деметилирование генома при их семенном воспроизводстве. Для анализа сегрегации эпифенотипа «пестичный тип пола цветков» в третьем семенном поколении были взяты семянки, развившиеся от открытого опыления гибридов F_2 – № 94-26 и № 94-17. Результаты сегрегации половых фенотипов потомков представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Сегрегация половых фенотипов в третьем семенном поколении гибридов с пестичным типом пола цветков в открытом режиме саморепродукции

Материнская форма (F2) и пол ее цветков	Происхождение материнской формы	Отношение фенотипов у сеянцев по типу пола цветков				Критерий соответствия G
		в опыте		теоретически ожидаемое соотношение менделеевским законам сегрегации признака		
		♀	♂	0,4500 ♀	0,5500 ♂	
07/7-23-5 ♀	№ 94-26	19 (46,3%)	22	18,45	22,55	0,03
07/7-26-5 ♀	№ 94-17	10 (58,8%)	7	7,65	9,35	1,34
07/7-26-3 ♀	№ 94-17	2 (40,0%)	3	2,25	2,75	0,06
07/7-26-4 ♀	№ 94-17	9 (60,0%)	6	6,75	8,25	1,40
07/7-27-5 ♀	№ 94-17	3 (42,9%)	4	3,15	3,85	0,02
07/7-30-5 ♀	№ 94-17	12 (54,5%)	10	9,90	12,10	0,81
Итого		55	52	48,15	58,85	1,74

$$G_{0,05}=3,84$$

Из таблицы следует, что распределение половых фенотипов сеянцев в третьем семенном поколении саморепродукции гибридов с пестичным типом цветков соответствует модели ожидаемой сегрегации по половым фенотипам в естественных популяциях октоплоидов. В этом поколении наблюдается восстановление типичного для *Fragaria x ananassa* (8x) наследования типа пола цветков близкого к соотношению 1:1. Таким образом, пол цветков у *Fragaria x ananassa* контролируется как генетически, так и эпигенетически. Вновь возникший фенотип в потомстве обоеполых образцов («пестичный тип пола цветков») наследуется во втором и третьем поколениях. Появление новых половых фенотипов происходит довольно редкое событие, но, как в случае развития пестичного типа цветков, уровень гетерогенности популяции при этом существенно увеличивается за счет перекрестного опыления цветков с пестичным типом.

Литература

1. *Correns C.* Bestimmung, Vererbund und Verteilung des Geschlechtes bei den höheren Pflanzen. – Handb. Vererbungs – wissenschaft. – 1928. – Bd. 2. – S. 138.
2. *Kuhn E.* Geschlechtsformen dei *Fragaria* und ihre Vererbung. – Zucher. – 1930. – Bd. 4. – S.2-11.
3. *Staudt G.* 1968. Die Genetik und Evolution der Heterozie in der Gattung *Fragaria*. III. Untersuchungen in Hexa- und Oktoploidan Arten. // Z. Pflanzenzuchtg. – 1968 Bd. 59. – S. 83-102.
4. *Малецкий С.И., Сухарева Н.Б., Батурун С.О.* Наследование пола у апомиктических сеянцев Земляники крупноплодной (*Fragaria x ananassa* Duch.) // Генетика. – 1994. Т.30. – № 2. С. 237-243.
5. Клипко В.П. Изучение самоопыленного потомства у гибридов *Fragaria*. – В кн.: Генетические основы селекции. – Новосибирск: Наука. – 1982.- С. 219-224.
6. *Сухарева Н.Б., Клуноко В.П.* О возможности использования для селекции земляники гибридов *Fragaria virginiana* ssp. *glauca* ' *F. ananassa*. – В кн.: Генетические основы селекции. – Новосибирск: Наука. – 1982. – С. 198-205.
7. *Батурун С.О.* Эпигенетический контроль типа пола цветков у *Fragaria* × *ananassa* Duch. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук пр./ Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова/ К.: Логос, 2009. – Т. 6. – С. 3-7.
8. *Лавров С.А., Мавродиєв Е.В.* Эпигенетическое наследование признаков и его возможная роль в микроэволюции растений // Журнал общей биологии. – 2003. – Т. 64. – № 5. – С. 403-420.
9. *Freeman D.C., Harper K.T., Charnov E.L.* Sex change in plants: old and new observation and new hypothesis // Oecologia. – 1980. – V. 47. – P. 222-232.
10. *Janousek B., Siroky J., Vyskot B.* Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album* // Mol Gen Genet. – 1996. – V. 250. – P. 483-490.
11. *Батурун С.О.* Влияние 5-азациитидина на сегрегацию половых фенотипов в потомстве *Fragaria orientalis* Loz. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук пр. Т. 2 / За ред. М.В. Роїка. – К.: КВІЦ, 2004. С. 11-16.
12. *Батурун С.О.* Эпигенетический контроль типа пола цветков в роде *Fragaria* // Сб. докл. и сообщ. X генетико-селекционной школы, посвященной 120-летию Н.И.Вавилова. – Новосибирск. – 2007. – С. 33-37.
13. *Sokal R.R., Rohlf F.J.* Introduction of test for good of fit // Biometry the principles and practice of statistics in biological research. N. Y.: W. H. Freeman and Company, 1995. P. 686 – 689.

Резюме

Вновь возникший фенотип в потомстве обоеполюх образцов («пестичный тип пола цветков») наследуется во втором и третьем поколениях. В третьем семенном поколении восстанавливается типичное для вида *Fragaria x ananassa* (8x) соотношение половых фенотипов близкое 1:1.

An unexpected phenotype – «pistillate type of flowers» arising from recessive hermaphrodites specimens of *Fragaria* × *ananassa* Duch. is inherited in the 2nd and the 3rd generations. Common for *Fragaria* × *ananassa* sex phenotypes correlation close on 1:1 restores at the 3rd generation.

ВАГИН Ю. В.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Украина, 03143, Киев, ул. акад. Заболотного, 150, e-mail: maliuta@imbg.org.ua

ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ОТБОР У ПЛАЦЕНТАРНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ИТОГИ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результативные исследования, подтверждающие действие стабилизирующей формы положительного отбора на пренатальной стадии индивидуального развития у плацентарных млекопитающих (*Eutheria*), тормозились, в первую очередь, из-за отсутствия должной методологической базы. Ее разработка явилась ключевой задачей, решение которой обеспечило их успешное выполнение. Указанная методология [1] призвана была ответить на ряд принципиальных вопросов: как следует спланировать эксперимент в целом, как обрабатывать его результаты и как рассуждать, чтобы сделать по результатам исследований корректные и однозначные выводы?

Ее алгоритм включал в себя следующие основные процедуры:

- анализ расщепления потомства по генотипам, осуществляемый в момент его рождения;
- выявление факторов, влияющих на генотипическое соотношение потомства, фиксируемое при его рождении;
- оценку дарвиновской приспособленности потомства, находящегося при рождении в дефиците.

Дееспособность методологии была подтверждена результатами исследований, проведенных на американских норках (*Mustela vison*). В соответствии с ее требованиями, на протяжении пяти сезонов размножения норок проводился анализ потомков, полученных от спаривания серебристо-голубых самок, гетерозиготных по гену *aleutian (ppAa)*, с сапфировыми (*ppaa*) самцами. Было установлено, что соотношение указанных потомков, фиксируемое при рождении, отклоняется от теоретически ожидаемого [2]. Причиной данного отклонения явилось действие внутриутробных факторов, приводящее, в процессе имплантации, к избирательной элиминации сапфировых эмбрионов [3]. При этом в качестве элиминирующих факторов выступали: количество имплантирующихся бластоцист и фотопериодические условия, складывающиеся в процессе их имплантации. Вместе с тем, часть сапфирового потомства, успешно преодолевшая барьер внутриутробной избирательной элиминации, в постнатальном онтогенезе продемонстрировала повышенную дарвиновскую приспособленность [4 – 6].

Итак, вся совокупность данных, полученных в рамках проведенных методологических процедур, явилась однозначным и достаточным аргументом, указывающим, что на пренатальной стадии онтогенеза американских норок действует стабилизирующая форма положительного отбора. Следовательно, наличие положительного отбора на ранних стадиях разви-

тия млекопитающих более не является исключительно аксиомой, а переходит в разряд экспериментально доказанного факта.

Анализ полученных результатов позволил обосновать достаточно реалистические предположения о последовательности событий, связанных с внутриутробным селективным процессом, а также о генетико-физиологическом механизме его действия [7]. Кроме того, был разработан ряд теоретических положений, касающихся времени, формы и специфики действия положительного отбора на стадии пренатального онтогенеза плацентарных млекопитающих [8]. В общих чертах ход событий, обусловивших селекцию *ppaa* эмбрионов, представляется следующим образом: в утробе серебристо-голубых самок американских норок, гетерозиготных по гену *aleutian*, в процессе совместной имплантации *ppAa* и *ppaa* бластоцист, происходит избирательная элиминация последних; *ppaa* бластоцисты, успешно преодолевшие элиминирующий барьер, подвергаются стабилизирующему отбору; селекция *ppaa* бластоцист является результатом их конкуренции с *ppAa* бластоцистами за места имплантации [7, 8]. При этом в качестве субъекта селекции выступает внутриматочная среда, формирующаяся у *ppAa* самок в процессе имплантации. Она включает в свой состав, помимо биохимической компоненты, также и готовые к имплантации бластоцисты, поскольку успех в конкуренции за места имплантации между *ppAa* и *ppaa* бластоцистами определялся не только должной биохимической поддержкой самого процесса имплантации, но и числом имплантирующихся бластоцист [7]. Следовательно, можно представить указанные выше элиминирующие факторы – число имплантирующихся бластоцист и фотопериодические условия, складывающиеся в процессе их имплантации – в качестве единого фактора элиминации.

Итак, с одной стороны, в качестве элиминирующего фактора выступают бластоцисты, конкурирующие, в зависимости от своего количества, за места имплантации. С другой стороны, фотопериодические условия контролирующие, хотя и опосредованно, качественно-количественный состав внутриматочной среды, обеспечивая тем самым подготовку матки к имплантации бластоцист и сам процесс имплантации [9, 10]. При этом они определяют количество биохимического индуктора имплантации: одного вещества либо комплекса биологически активных веществ, запускающих указанный процесс. Таким образом, единым элиминирующим фактором можно считать количество биохимического индуктора имплантации, приходящегося на одну имплантирующуюся бластоцисту [7].

Роль объекта селекции играют *ppaa* эмбрионы с различной «онтогенетической судьбой». Одни из них избирательно элиминируются в процессе конкуренции с *ppAa* бластоцистами за места имплантации. Другие, преодолев элиминирующий барьер, подвергаются дарвиновскому отбору и успешно завершают свое пренатальное развитие [4 – 7]. В связи с этим встал вопрос о том, почему в процессе имплантации одна

часть *ppaa* эмбрионов подвергалась избирательной элиминации, а другая преуспела в конкуренции с *ppAa* эмбрионами за места имплантации и селектировалась?

Проведенный анализ показал, что благополучная «онтогенетическая судьба» сапфировых эмбрионов, по всей вероятности, определялась наличием у них генов-модификаторов (далее *ppaa^m* эмбрионы), существенно нивелирующее негативное действие рецессивной гомозиготы гена *aleutian* на процесс имплантации [7]. В результате этого *ppaa^m* эмбрионы наделялись способностью к успешной конкуренции с *ppAa* эмбрионами «за места имплантации». Данный успех, вероятно, связан с тем, что у *ppaa^m* эмбрионов могла быть существенно повышена эффективность взаимодействия с биохимическим индуктором имплантации. Кроме того, благоприятное действие модификаторов распространялось и на постнатальное развитие сапфировых потомков, прошедших внутриутробную селекцию; по всем основным компонентам дарвиновской приспособленности – скорости роста, жизнеспособности и плодовитости – *ppaa^m* норки, рожденные *ppAa* матерями, превосходили *ppaa* норок, полученных из внутривидового разведения [4 – 6].

Исходя из вышеизложенного был сделан вывод о том, что внутриутробная селекция, направленная на *ppaa^m* эмбрионы, приводит к устранению негативного влияния рецессивной гомозиготы гена *aleutian* на развитие сапфировых потомков [7]. Причем позитивный эффект модификаторов на развитие указанных потомков распространяется как на пренатальные, так и на постнатальные стадии онтогенеза норок, включающие репродуктивный период. Следовательно, одной из особенностей процесса внутриутробной селекции, связанной с действием стабилизирующей формы положительного отбора, является вовлечение в данный процесс комплекса генов, включающего гомозиготу рецессивного аллеля, обладающую умеренно выраженным негативным эффектом, и гены-модификаторы, нейтрализующие данный эффект. Таким образом, с помощью генов-модификаторов удается «обезвреживать» умеренно вредные мутации [11]. В результате этого достигается, с одной стороны, повышение помехоустойчивости процесса реализации морфогенетической программы, приводящее к усилению гомеостаза развития особей. С другой стороны, происходит селективное закрепление «обезвреженных» мутаций, поддерживающее генетическое разнообразие и адаптивную пластичность популяции.

В соответствии с полученными данными, именно имплантация blastocyst находится в центре событий, связанных с дарвиновской селекцией у американских норок [3]. Имеются серьезные основания считать имплантацию у многоплодных *Eutheria* важнейшим событием онтогенеза [8], поскольку именно на этой стадии пренатального развития стабилизирующая форма положительного отбора формирует оптимальную видовую чис-

ленность их пометов [12], а также контролирует и поддерживает установившуюся норму видовой морфогенетической подпрограммы периимплантационного развития [8, 13]. Кроме того, данная подпрограмма является, в определенном смысле, уникальной в мире животных, представляя собой некий «информационный гибрид», включающий в себя генетический материал эмбриона и матери [13]. Она реализуется в процессе эмбриономатеринского «диалога», характеризующегося экспрессией *de novo* ряда генов бластоцисты и матки, продукты которых необходимы для подготовки матки к имплантации, успешной имплантации бластоцисты, а также для формирования морфологических структур, обеспечивающих дальнейшее взаимодействие плода с материнским организмом [14]. При этом морфогенетическая подпрограмма периимплантационного развития является «визитной карточкой» плацентарных млекопитающих; повидимому именно с ней связано появление в мире животных и самого инфракласса *Eutheria* [13].

По всей вероятности, отбор оценивает не всю морфогенетическую программу одновременно [8]. Например, на завершающем этапе периимплантации плацентарных оценивается лишь небольшая ее часть, периимплантационная подпрограмма, составляющая, по различным оценкам, от нескольких сотен до более чем одной тысячи генов [14]. Следовательно, действующая в процессе имплантации стабилизирующая форма положительного отбора имеет дело с «малым контекстом» генов во много раз уступающим целому генотипу – «контексту» по определению Р. Левонтина [15]. В соответствии с результатами исследований, деятельность стабилизирующей формы положительного отбора приурочена к так называемым критическим периодам развития [8] в число которых входит также имплантация эмбрионов. Из этого вытекает, что только через поэтапную оценку «малых контекстов» стабилизирующая форма положительного отбора способна определять верность «настройки» всей программы индивидуального развития организма и в случае необходимости может осуществлять либо ее коррекцию, либо реорганизацию [8, 11].

В завершение еще раз обратим внимание на важность полученных доказательств действия у плацентарных млекопитающих стабилизирующей формы положительного отбора в процессе имплантации бластоцист. Они стали основанием для «перевода» внутриутробной селекции из разряда «аксиомы» в разряд «факта», связав ее с конкретным периодом пренатального онтогенеза. Что касается так называемого биологического смысла указанной селекции, то он, по всей вероятности, выражается в защите процесса периимплантационного развития, контролируемого соответствующей морфогенетической подпрограммой. Возникновение данной подпрограммы могло иметь решающее значение для появления на исторической арене самого прогрессивного инфракласса млекопитающих – *Eutheria*.

Литература

1. Вагин Ю. В. Методология доказательства наличия у млекопитающих дарвиновского отбора на пренатальной стадии онтогенеза // Доповіді Національної академії наук України. – 2003. – Т. 19, № 7. – С. 172–175.
2. Вагин Ю.В. Роль гена *aleutian* в онтогенезе *Mustela vison*. 2. Анализ расщепления в потомстве норок, полученном от скрещивания *ppAa* самок и *ppaa* самцов // Біополімери і клітина. – 2001. – Т. 17, № 2. – С. 166–168.
3. Вагин Ю.В. Роль гена *aleutian* в онтогенезе *Mustela vison*. 6. Факторы, влияющие на расщепление в потомстве *ppAa* самок и *ppaa* самцов норок // Біополімери і клітина. – 2001. – Т. 17, № 6. – С. 565–567.
4. Вагин Ю.В. Роль гена *aleutian* в онтогенезе *Mustela vison*. 7. Анализ плодовитости сапфирового потомства различного происхождения // Біополімери і клітина. – 2002. – Т. 18, № 1. – С. 81–83.
5. Вагин Ю.В. Роль гена *aleutian* в онтогенезе *Mustela vison*. Анализ жизнеспособности сапфирового потомства различного происхождения // Біополімери і клітина. – 2002. – Т. 18, № 4. – С. 347–350.
6. Вагин Ю. В. Роль гена *aleutian* в онтогенезе *Mustela vison*. Анализ скорости роста сапфирового потомства различного происхождения // Біополімери і клітина. – 2002. – Т. 18, № 5. – С. 449–451.
7. Вагин Ю. В. Дарвиновский отбор на пренатальной стадии онтогенеза у норок *Mustela vison*: генетико-физиологический механизм действия // Доповіді Національної академії наук України. – 2004. – № 5. – С. 164–168.
8. Вагин Ю. В. Дарвиновский отбор на пренатальной стадии онтогенеза у норок *Mustela vison*: теоретический анализ // Доповіді Національної академії наук України. – 2004. – № 6. – С. 171–176.
9. Mead R.A. Embryonic diapause in vertebrates // J. Exper. Zool. – 1993. – Vol. 266, № 4. – P. 629–641.
10. Mead R.A. Hormonal control of implantation in some carnivores // In book: Molecular and cellular aspects of periimplantation processis. – New York: Springer-Verlag, 1995. – P. 48–65.
11. Вагин Ю. В. Положительный отбор генов-модификаторов – путь фиксации наследственных изменений в популяциях // Біополімери і клітина. – 2007. – Т. 23, № 3. – С. 255–259.
12. Евсиков В.И. Гнетико-эволюционные аспекты проблемы гомеостаза плодовитости млекопитающих (на примере норок) // Генетика. – 1987. – Т. 23, № 6. – С. 988–1002.
13. Вагин Ю. В. Периимплантационная подпрограмма морфогенеза – эволюционное know how плацентарных млекопитающих // Біополімери і клітина. – 2007. – Т. 23, № 4. – С. 332–337.
14. Dey S.K., Lim H., Das H. [et al.] Molecular cues to implantation // Endocrine Reviews. – 2004. – Vol. 25, № 3. – P. 341–373
15. Левонтин Р. Генетические основы эволюции. – М.: Мир, 1978. – 351с.

Резюме

Обобщены результаты исследований, указывающие на пренатальное действие стабилизирующего отбора у *Eutheria*; основываясь на них смоделирован молекулярно-генетический механизм и раскрыт биологический смысл внутриутробной селекции.

Узагальнено результати досліджень, що вказують на пренатальну дію стабілізуючого добору у *Eutheria*, які стали основою для моделювання молекулярно-генетичного механізму та розкриття біологічного змісту внутрішньоутробної селекції.

The results indicating the pre-natal effect of stabilizing selection in *Eutheria* have been summarized; based on these molecular and genetic mechanism was modelled to disclose the biological sense of intrauterine selection.

ВОЛЫНКИН В.А., ЗЛЕНКО В.А., ЛИХОВСКОЙ В.В., ОЛЕЙНИКОВ Н.П., ПОЛУЛЯХ А.А., РОШКА Н.А., ПЫТЕЛЬ И.Ф.

*Национальный институт винограда и вина «Магарач» НААН Украины
98600, АР Крым, г. Ялта, ул. Курова, 31, e-mail: select_magarach@ukr.net*

ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФОРМ ВИНОГРАДА СЕМЕЙСТВА *VITACEAE L*

Межвидовая и межродовая гибридизация у вегетативно размножаемых растений наряду с внутривидовой в будущем станет основным методом селекции (Вавилов, 1938)

Скрещивание культурных сортов с дикими видами и даже родами в пределах семейства позволит искусственно создать «новые виды и роды» растений, которые будут устойчивыми к биотическим и абиотическим факторам внешней среды, высокоурожайные с хорошим качеством продукции и даже с новыми направлениями использования урожая. В данное время виноград используется не только для виноделия, производства соков, но и как лекарственное средство: концентрат веществ из кожицы ягод и растительное масло из семян.

Искусственно созданные новые виды и роды в результате отдаленной гибридизации культурных сортов и диких видов и родов будут менее требовательны не только к минеральным удобрениям, но и не будет необходимости их обрабатывать ядохимикатами и они смогут выживать и стабильно плодоносить в экстремальных условиях изменяющегося климата (жара, засуха, морозы).

Несовместимость между видами разных родов может быть преодолена, если образуется анеуплоидная зигота из гамет, которые не будут содержать генов (хромосом), вызывающих эту несовместимость. Поэтому с применением колхицина вначале необходимо получить автотетраплоидные семена у видов обоих родов для последующего использования в скрещиваниях.

Автотетраплоиды характеризуются нарушениями в закономерностях конъюгации хромосом в мейозе (появлением би-, три- и тетравалентов из гомологичных хромосом) которые приводят к беспорядочному распределению гомологичных хромосом в яйцеклетке и пыльце (Стрельчук, 1981). При большой выборке образования анеуплоидных зигот (большом объеме

межродовых скрещиваний) теоретически возможно допустить, что появиться сеянец, у которого не будет генов (хромосом) вызывающих его гибель как на стадии зиготы, зародыша и растения и у его потомства будет восстановлена фертильность путем возвратных скрещиваний с представителями одного из родов.

Целью исследований ставилось получение методом аллотетраплоидии межродовых гибридов в пределах семейства Vitaceae: скрестить род *Vitis* (*V. vinifera* $2n = 38$) с родами *Ampelopsis* (*A. acutifolia*, *A. cordata* и *A. serjanieafolia* $2n = 40$) и *Parthenocissus* (*P. inserta* и *P. quinquefolia* $2n = 40$).

Материалы и методы.

Получить межродовые гибриды у растений можно методом аллотетраплоидии: скрещивание исходных тетраплоидных генотипов – представителей различных родов (Карпеченко, 1935). С целью образования тетраплоидных сеянцев у представителей различных родов весной распускающиеся почки размером 0,5-1 см были обработаны 0,5 % раствором колхицина, а также за 17-25 дней перед цветением (5 – 14 дней до начала мейоза), соцветия были обработаны колхицином в 3-х концентрациях: 0,5 %, 1 % и 2 %, с добавкой биологически-активных веществ (основа растворов колхицина): 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 40 г/л Д-манита, 2 мл/л димексида, 0,5 мл/л Твина 20 и 200 мг/л Na-бензоата; pH = 5,6.

Обработка распускающихся почек 0,5% раствором колхицина, а также соцветий перед мейозом 3-мя вариантами концентраций колхицина (0,5; 1 и 2 %) была проведена у родов: *Ampelopsis* (виды *Ampelopsis acutifolia*, *Ampelopsis cordata* и *Ampelopsis serjanieafolia*), *Parthenocissus* (виды *Parthenocissus inserta* и *Parthenocissus quinquefolia*) и *Vitis* (*V. vinifera* миксоплоидные обоеполюе сорта: Харты про Ливье, Пикпуль черный, Шабаш крупногодный, Шасла Рамминга и Яхеи с женским типом цветка, а также склонные при определенных условиях выращивания к миксоплоидии: Мускат александрийский, Баян ширей, Шабаш и Рислинг рейнский, а также Янтарный Магарача). Затем у этих представителей различных родов был проведен инцухт.

Так как в семенах полученных в результате межродовой гибридизации наблюдается гибель зародышей из-за физиолого-биохимической несовместимости различных родов, были собраны незрелые ягоды 25, 30, 40 и 50 дней после гибридизации), которые хранились в холодильнике в течение 8-12 недель при -2°C . Затем из ягод были выделены семена, простерелизованы 10 % «Доместас» в течение 12 – 15 мин., затем 96 % спиртом 10 – 20 сек. и промыты 4 – 5 раз стерильной водой. Семена в чашках Петри в ламинарном боксе были разрезаны поперек и носики семян (части семян, в которых находятся зародыши) были высажены в 3 варианта жидкой среды, различающихся между собой содержанием регуляторов роста: 1) 0,2 мг/л БАП для развития сердцевидных зародышей из глобулярных; 2) 0,1 мг/л β -индолилуксусной кислоты (ИУК) и 30 мг/л гумата Na для превращения серд-

цевидных зародышей в торпедовидные; 3) 0,2 мг/л гиббереллового кислоты (ГА3) для развития проростков с зелеными семядолями и гипокотильями из торпедовидных зародышей. Основа жидкой среды состояла из среды для размножения растений следующего состава, макроэлементов: 308 мг/л NH_4NO_3 , 922 мг/л KNO_3 , 597 мг/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 82 мг/л KH_2PO_4 , 331 мг/л CaCl_2 ; микроэлементы и Fe-EDTA, 20 мг/л мезо-инозита, 0,5 мг/л никотиновой кислоты и 10 г/л сахарозы, но с повышенным содержанием витаминов тиамина и пиридоксина (по 0,5 мг/л). pH каждого варианта среды перед автоклавированием (1 атм, 25 мин) было доведено до 5,6 (Зленко, 1991).

Проростки пересажены на питательную твердую среду для развития у них побегов и корней. Состав концентраций компонентов этой среды отличается от приведенной выше основы среды более низкой концентрацией витаминов (0,1 мг/л тиамина и 0,2 мг/л пиридоксина), добавкой 30 мг/л гумата Na, 7,5 г/л агара и концентрацией регуляторов роста: 0,15 мг/л ИУК, 0,005 мг/л α – нафтилуксусной кислоты (НУК) и 0,001 мг/л БАП; значение pH было доведено NaOH до 6.0 – 6.2 перед добавкой агара и автоклавированием.

Отбор полиплоидных генотипов по анатомо-морфологическим признакам у сеянцев, полученных в результате инцухта после обработки начавших распускаться вызревших почек или соцветий растворами колхицина до начала мейоза проводился по методике Топалэ (1983 г.).

Результаты и обсуждение.

Высажены весной 2007 – 2010 гг. и уже выращены в теплице для высадки (будут высажены весной 2011 г.) на постоянное место в поле отобранные по морфологическим признакам мощные сеянцы (обработка колхицином распускающихся почек весной 2006 – 2008 гг. и соцветий до начала мейоза в 2009 г., выращивание в гидропонной культуре в 2007 – 2010 гг., количество высаженных сеянцев, штук): *Parthenocissus inserta* – 39, *Parthenocissus quinquefolia* – 41, *Ampelopsis acontifolia* – 30 (1 вырос в культуре in vitro, № 153), *Ampelopsis cordata* – 17, *Ampelopsis serjanieafolia* – 7, Шасла Гро Куляр белая (инцухт) – 4, Пикпуль черный – 10, Харты про Ливье – 45, Янтарный Магарача – 7, Яхеи – 9, Яхеи (колхицин) x *Ampelopsis cordata* – 1, Баян ширей (инцухт) – 3, Шабаш (инцухт) – 10, Шабаш крупно-ягодный – 11, Рислинг рейнский – 10. Всего 244 сеянца 21 популяции различных родов семейства Vitaceae. Отбор полиплоидных форм проводили по морфологическим признакам (Топалэ, 1983).

После вступления в пору цветения между тетраплоидными генотипами различных родов будет проведена межродовая гибридизация (род *Vitis* будет скрещен с родами *Partenocissus* и *Ampelopsis*. Параллельно у полиплоидных и диплоидных сеянцев сортов *Vitis vinifera* будут изучаться хозяйственно-ценные признаки. Пять из этих сеянцев, выросших из отобранных крупных семян, полученных в результате свободного опыления 3-х видов рода *Ampelopsis* (распускающиеся почки у них были обработаны 0,5 % кол-

хицином) заплодоносили на первый год развития в поле. Из ягод этих сеянцев были выделены семена в следующем количестве: сеянец № 173 – 1 *Ampelopsis acontifolia* – 163 шт.; сеянец № 175 – 1 *Ampelopsis cordata* – 6 шт.; сеянцы № 179 – 1, № 181 – 1 и № 184 – 1 *Ampelopsis serganieafolia* – 3, 2 и 18 шт. семян соответственно. У сеянца № 173 – 1 свободного опыления *Ampelopsis acontifolia* листья по форме были такими же, как и у сеянца № 175 – 1 свободного опыления *Ampelopsis cordata*. При этом зрелые ягоды сеянца № 173 – 1 *Ampelopsis acontifolia* были желтого цвета (у исходной материнской формы – синего цвета), но содержали такие же большие семена как у *A. acontifolia*. В синеваато-зеленых ягодах сеянца № 175 – 1 свободного опыления *Ampelopsis cordata* очень мелкие семена, что является признаком вида *A. cordata*. Возможно, сеянец № 173 – 1 является гибридом между двумя видами рода *Ampelopsis* (*A. acontifolia* x *A. cordata*). Этот сеянец обладает очень мощным ростом и высокой засухо и жаростойкостью по сравнению с другими сеянцами. В следующем году сеянец № 173 – 1 *A. acontifolia* будет включен в межродовую гибридизацию с родом *Vitis* (*V. vinifera*).

У всех семян с развившимся эндоспермом, полученных в результате межродовых скрещиваний в большей или меньшей степени был выражен некроз оболочек семян и эндосперма, что указывает на физиологическую несовместимость родов на биохимическом уровне. Как на жидких средах, так и на твердой среде, на которую были пересажены проростки, наблюдается дальнейшее их аномальное развитие и рост побегов у некоторых из них.

У сеянца полученного в результате скрещивания Пикпуль черный (колхицин) x *Ampelopsis acontifolia* (колхицин) образуются многочисленные пазушные почки и побеги, сближенные узлы на побегах что не наблюдается у исходных генотипов, участвующих в скрещивании. При этом у этого сеянца листья на верхушке побега и пасынковых побегов были сильно рассеченные, а у остальных листьев листовая пластинка была менее рассеченной (рис. 1).

С целью дальнейшего изучения и выделения истинных межродовых гибридов весной 2007 – 2010 гг. высажены сеянцы на адаптацию в условия гидропонной культуры в теплицу, полученные в культуре незрелых зародышей *in vitro* (семена завязались в ягодах, 40 дней после опыления, соцветия развились на побегах после обработки почек колхицином) скрещиваний Харти про Ливье x *Ampelopsis cordata* – 7 сеянцев в 5-ти повторностях и Пикпуль черный x *Ampelopsis acontifolia* – 22 сеянца в 3 – 5 повторностях каждый. Осенью 2007 -2010 гг. из этих сеянцев получены стандартные саженцы в 2-х-5-ти повторностях. У двух сеянцев скрещивания Харти про Ливье x *Ampelopsis cordata* сильно рассечены листья (признак рода *Ampelopsis*) и у одного лоза главного побега окрашена в красный цвет, что возможно свидетельствует о их гибридном межродовом происхождении (рис.2).

Выводы.

Наблюдается плодоношение в первый год развития в поле у сеянцев свободного опыления (распускающиеся почки обработаны 0,5 % раствором колхицина) *Ampelopsis acontifolia* (№ 173 – 1); *A. cordata* (№ 175 – 1); и *Ampelopsis serganiefolia* (№ 179 – 1, № 181 – 1 и № 184 – 1). Собранные семена сеянцев свободного опыления этих видов рода *Ampelopsis* будут высеваны для дальнейшего отбора тетраплоидных сеянцев и их скрещивания с тетраплоидами рода *Vitis*. Включение вышеперечисленных сеянцев рода *Ampelopsis* в качестве отцовских форм с представителями рода *Vitis* позволит проводить отбор межродовых гибридов не только по форме листьев, но и по признаку раннего вступления в пору плодоношения (на первый год их развития в поле).

Два сеянца скрещивания Харти про Ливье x *Ampelopsis cordata* (распускающиеся почки, из которых затем выросли побеги с соцветиями, у исходных форм были обработаны 0,5 % раствором колхицина для образования диплоидных яйцеклеток и пыльцы и образования тетраплоидных зигот) имеют признаки родов *Vitis* и *Ampelopsis*.

Резюме

Распускающиеся почки и соцветия до начала мейоза обработаны растворами колхицина у видов родов *Vitis* ($2n=38$), *Ampelopsis* и *Parthenocissus* ($2n=40$). У двух сеянцев скрещивания *V. vinifera* x *Ampelopsis cordata* сильно рассечены листья, что может быть связано с их отдаленным межродовым происхождением.

Бруньки і суцвіття, які розпускаються, до початку мейозу оброблені розчинами колхіцину у видів родів *Vitis* ($2n=38$) *Ampelopsis* і *Parthenocissus* ($2n=40$). У двох сіянців схрещування *V. vinifera* x *Ampelopsis cordata* сильно розсічені листи, що може бути зв'язане з їхнім віддаленим міжродовим походженням.

Dismissed buds and inflorescences prior to the beginning of meiosis are processed by solutions of colchicines at species of genera *Vitis* ($2n=38$), *Ampelopsis* and *Parthenocissus* ($2n=40$). At two seedlings *V. vinifera* x *Ampelopsis cordata* it is strong dissected leaves that can be connected with their remote intergenera origin.

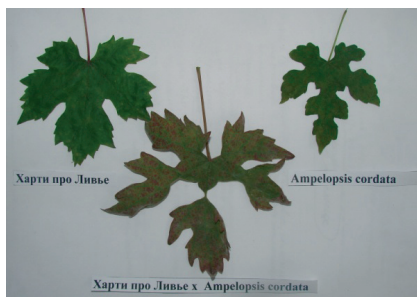


Рис. 1. Листья исходных родительских форм Харти про Ливье и *Ampelopsis cordata* и полученного в результате их гибридизации сеянца



Рис.2. Укороченные междуузлия и сильнорассеченный лист сеянца Пиккуль черный x *Ampelopsis acontifolia*

ЖУК О.И.

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

ЭВОЛЮЦИОННАЯ АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ К СУЩЕСТВОВАНИЮ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ БИОТИЧЕСКОЙ И АБИОТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

Растения относятся к прикрепленным организмам, потому в процессе эволюции они сформировали адаптивные механизмы и системы, позволяющие выжить в условиях значительных флуктуаций параметров среды, действия стрессовых факторов биотической и абиотической природы. Формирование корней, обеспечивающих прикрепленное существование растений, снабжающих его водой и элементами минерального питания из почвы, произошло в позднем девоне примерно 400 миллионов лет назад [11]. Одновременно корневая система вступила в взаимодействие с почвенными микроорганизмами, микоризными грибами, клубеньковыми и ризосферными бактериями, которые также участвуют в адаптации растений к множеству стрессовых факторов [9, 18]. Установлено, что симбиоз сосудистых растений с арбускулярной микоризой грибов существовал уже 400 миллионов лет назад [6]. Грибы, образующие арбускулярную микоризу, ассоциированы с корнями почти 80% видов наземных растений, найдены у всех мезофитных злаков. Для колонизации растений арбускулярной микоризой строение корневой системы не имеет значения, однако одиночные клетки или клетки в культуре тканей грибной микоризой не колонизируются. В корне гриб развивается в клетках корневой паренхимы, проникает через эпидермис в кору корня. Меристема и зона растяжения свободны от микоризы, однако выше этих зон корни покрыты грибом [9]. В почве на расстоянии до 20-30 см от апикальной меристемы корни пронизаны микоризой и покрыты частицами почвы, которые плотно склеены мукополисахаридами – слизями, которые выделяются корневым чехликом и почвенными бактериями. Симбиоз арбускулярной микоризы и корней положительно влияет на рост, минеральное питание и водный режим растений, способствует поглощению медленно диффундирующих ионов фосфора, цинка и меди [1]. Показано, что усиление роста растений *Charthamus tinctoris* после инокуляции *Glomus etunicatum* связано с усилением поглощения фосфора растением-хозяином посредством выделения в среду обитания корней фосфатаз – ферментов, гидролизующих соединения до фосфата [1]. В условиях засоления эндофитная микориза ослабляет действие стресса путем снижения поступления натрия из корней в стебли [13].

Поглощение воды корнем происходит на участке в несколько сантиметров между апикальной меристемой и зоной дифференциации [9]. Развитие метаксилемы в корне уменьшает влияние колебаний дневной транспирации при заполнении водой ксилемных сосудов. Интенсивная транс-

пирация способна вызывать разрыв транспирационного тяжа воды, но в таких условиях корневая система может резервировать воду для обеспечения функционального состояния клеток до тех пор, пока корни не достигнут водоносных горизонтов. Защитой от потерь воды корнем служит также агрегация частиц почвы на его поверхности с помощью полисахаридов из корневого чехлика и выделений бактерий.

Процесс колонизации растений бактериями начался в тот же период, что и симбиоз растений и грибов [6]. Ризосферные бактерии, ассоциированные с корнями, участвуют в индукции системной устойчивости растения к засухе и засолению, усиливают поглощение минеральных элементов из почвы, предотвращают излишнее накопление нитратов и фосфатов [18]. Ризосферные бактерии колонизируют многие виды растений. Реализация устойчивости растений к засухе, в которой участвуют бактерии, происходит путем их воздействия на гормональный баланс, изменения генной экспрессии. Так, у растений *Arabidopsis thaliana* инокуляция *Paenibacillus polymyxa* повышала их устойчивость к дефициту воды посредством индукции гена EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15 (ERD15). Ризобиаальный бактериальный симбиоз и арбускулярные микоризные грибы в условиях засухи усиливают активность антиоксидантных ферментов, секретируют фитогормоны индолилуксусную кислоту (ИУК), цитокинины, абсцизовую кислоту, антиоксиданты [18]. Деградация бактериями предшественника этилена 1-аминоциклопропан-1-карбоксилдиаминазы снижает стрессовую нагрузку и восстанавливает рост растений в условиях водного стресса и засоления. Продукцирование бактериями ИУК стимулирует рост корней, их ветвление, обеспечивает общее увеличение поверхности корневой системы. Ауксины в клетке создают градиент концентрации, который необходим для детерминации к заложению нового зачатка корня [7]. Основным определяющим фактором асимметричного распределения ауксина считают полярный транспорт. Локальное продуцирование и последующее накопление ауксина в клетке перикарпа корня индуцирует формирование примордия латерального корня.

Растения в процессе эволюции приобрели способность защищать себя от паразитов, для которых они являются пищевым субстратом. Растение способно распознавать патоген и включать ответные защитные реакции [2]. В месте проникновения патогена в клетку активируются протеинкиназы, изменяются ионные потоки, возрастает концентрация салициловой кислоты, накапливаются активные формы кислорода (АФК) и оксид азота (NO), происходит упрочение клеточной стенки, синтез фитоалексинов. У растений иммунными функциями обладает каждая клетка. Антигенными детерминантами паразита служат элиситоры, к которым относят гликопротеиды, полиеновые кислоты, продукты авт-генов [2, 17]. Элиситоры характеризуются большим разнообразием химической структуры. Наиболее ранней реакцией на контакт растительной клетки с элиситором является

ся изменение проницаемости плазмалеммы, что приводит к поступлению Ca^{2+} и H^+ внутрь клетки и выходу из нее K^+ и Cl^- [10]. Индуцированные элизиторами ионные потоки в больших количествах ведут к запуску опосредованной R-генами программируемой гибели клеток. В ответе на инфицирование растительных клеток участвуют митоген-активируемые протеинкиназы (МАП-киназы), которые транслоцируются в ядро [12]. Защитные реакции растительного организма усиливают и дополняют друг друга, что обеспечивает устойчивость и является одним из условий сохранения вида.

К наиболее частым абиотическим стрессам, с которыми встречалось растение в процессе эволюции, относится засуха. Засухоустойчивость относится к мультигенным признакам, поэтому изменение одного гена несущественно влияет на фенотип, а потеря его функции компенсируется другими механизмами устойчивости растений. Водный потенциал ткани и осмотическое регулирование определяют активность антиоксидантов, осмолитов, сахаров, жирных кислот и основных ферментов. Критериями оценки действия стресса на растительный организм могут быть состояние мембран, жизнеспособность клеток, отношение хлорофилла к феофитину, газовый обмен, измерение роста, дискриминация изотопов ^{18}O и ^{13}C [15]. Осмотический и солевой стресс могут быть компонентами засухи.

Показано, что у риса в ответе на засуху участвует 589 генов [15]. Многочисленные гены ответа на дефицит воды найдены в геномах *Arabidopsis thaliana*, *Mesembrianthemum segetum*. Анализ транскриптома, индуцированного засухой, включал транскрипционные факторы, протеинкиназы, транспортёры, каналы, белки, цитоскелетные белки, осмолиты, шапероны, детоксифицирующие ферменты и значительное количество гипотетических неизвестных белков. Гены, экспрессирующиеся в ответ на засуху, участвуют в регуляторных событиях во время действия нескольких абиотических стрессов, что затрудняет использование достижений геномики. Значительный прогресс в характеристике генов отклика на абиотические стрессы основан на анализе их экспрессии. Множественная природа и дивергенция механизмов засухоустойчивости усложняет генетический анализ. Различная степень влияния стресса на генную экспрессию может приводить к существенному изменению экспрессии отдельных генов. Комплексность тканеспецифической, темпоральной, пространственной экспрессии стрессовых генов также усложняет интерпретацию результатов генетического анализа, поэтому для изучения генетики засухоустойчивости растений проводится поиск и совершенствование методических приемов и подходов.

Для изучения генома растений используют вирусы [5, 14]. Вирусные векторы выделены из многочисленных ДНК и РНК-вирусов. Использование этого метода позволило идентифицировать гены, включающиеся в ответ на засуху у *Nicotiana benthamiana* и *Lycopersicon esculentum*. Показано, что продукты генов NbPHB 1 и NbPHB2 играют важную роль в защите митохондрий от повреждений АФК у *Nicotiana benthamiana* [3]. Этого метод

позволил показать роль белков LEA в устойчивости к водному стрессу у томатов [14, 15]. Содержащие LEA4 растения оказались менее устойчивыми к водному стрессу по сравнению с контрольными растениями. Экспрессия отзывающихся на засуху генов существенно варьирует у каждого вида, сорта растений. Продолжительность и интенсивность стресса определяет тип экспрессии. Большинство генов раннего ответа (транскрипционные факторы и сигнальные компоненты) обнаруживают высокий уровень экспрессии лишь на начальных стадиях действия дефицита воды и существенно уменьшаются после его усиления. В условиях значительных потерь воды будут доминировать транскрипты генов, подобные LEA, HSP_s LTP_s.

Контроль за энергетическим и метаболическим гомеостазом необходим для существования в среде с множеством типом стрессов. Считают, что стресс частично декодируется как сигнал дефицита энергии, который включает ответ, независимый от причины сигнала [4]. У растений в транскриптомном репрограммировании участвует эволюционная консервативная энергетическая сенсорная протеинкиназа SnRK1 (SNF1-related kinase 1), которая регулирует экспрессию более 300 генов участвующих в процессах биосинтеза аминокислот, клеточной стенки, липидов, нуклеотидов, белков, сахарозы, крахмала [8]. В условиях дефицита энергетических ресурсов преимущественно подавляется синтез белков, в первую очередь рибосомальных. Такой дефицит в растениях возникает в условиях углеводного голодания, которое возникает при длительном прерывании световых фаз фотосинтеза, в этиолированных проростках и тканях, в период атаки патогенов, засухи, экстремальных температур [16]. Даже короткие периоды углеводного голодания ведут к ингибированию роста [4]. Дефицит энергетических ресурсов становится особенно критическим для растений в период активного роста и формирования репродуктивных органов, которые исполняют роль атрагирующих центров. Эволюционно детерминированные адаптивные системы позволяют растениям выживать в условиях значительных флуктуаций условий среды.

Выводы.

Прикрепленное существование растений сформировало их симбиоз с арбускулярной микоризой, ризосферными бактериями, способствовало оптимизации водного режима и минерального питания растений. Для защиты от многочисленных факторов абиотической и биотической природы сформированы мультигенные системы, обеспечивающие жизнеспособность растительного организма в среде с множеством типов стрессов.

Литература

1. Аббатур Х. Влияние везикулярно-арбускулярной микоризы на минеральное питание и рост растений *Carthamus tinctorius* при солевом стрессе// Физиология растений. -2010. -Т.57, №4. – С.564-570.

2. *Дмитриев А.П.* Сигнальные молекулы растений для активизации защитных реакций в ответ на биотический стресс// Физиология растений.-2003. –Т.50, №3. – С. 465-474.

3. *Ahn C.S., Lee J.H., Reum Hwang A., Kim W.P., Pai H.-S.* Prohibitin is involved in mitochondrial biogenesis in plants// Plant Journal. – 2006. – vol.46. – P.658 – 667.

4. *Baena-Gonzalez E., Sheen Jen.* Convergent energy and stress signaling //Trends in Plant Science. – 2008. – vol.13, №9. – P.474 – 482.

5. *Benedito V.A., Visser P.B., Angenent G.C., Krens F.A.* The potential of virus – induced gene silencing for speeding up functional characterization of plant genes// Genet. Mol. Res. – 2004. – vol.3. – С.323-341.

6. *Bonfante P., Genre A.* Plants and arbuscular mycorrhizal fungus an evolutionary-development perspective //Trends Plant Science. –2008.-vol.13, №9.–P.492-498.

7. *Denkova E., Ivanchenko M.G., Friml J., Shishkova S., Dubrovsky J.G.* A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? // Trends Plant Science. –2009.-vol.14, №4.-P.189-193.

8. *Lin J.F., Wu S.H.* Molecular events in senescing Arabidopsis leaves// Trends Plant Science. – 2008. –vol.13, №9. – P.474 – 482.

9. *McCully M.* How do real roots work? //Plant Physiol.– 1995. – vol.109, №1. – P.1 – 6.

10. *Nurnberger T., Scheel D.* Signal transmission in the plant immune response// Trends Plant Sci.-2001. –vol.6, №8. – P.372 – 379.

11. *Raven J.A., Edwards D.* Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance// J. Exp. Bot. – 2001. – vol.52. – P.381 – 401.

12. *Romeis T., Piedras P., Zhang S., Klessig D.T., Hirt H., Jones J.D.G.* Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves:convergence of resistance gene, elicitor, wound and salicylate responses // Plant Cell. –1999. – vol.11. – P.273 – 287.

13. *Ruiz-Lozano J.M., Azcon R.* Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status // Physiol.Plant.– 1995.— vol.95. – P.472-478.

14. *Senthyl-Kumar M., Kumar G., Srikanthbabu V., Udayakumar M.* Assessment of variability in acquired thermotolerance: potential option to study genotypic response and the relevance of stress genes // J.Plant Physiol. – 2007. – vol.164, №1. – P.111 – 125.

15. *Senthyl-Kumar M., Rame Gowda H.V., Hema R., Mysore K.S., Udayakumar M.* Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance // Journal Plant Physiol. – 2008.– vol.165, №4. – P.1404 – 1421.

16. *Smith A.M., Stitt M.* Coordination of carbon supply and plant growth // Plant Cell Environ. – 2007. – vol.30. – P.1126 – 1149.

17. *Takesue K., Shibaoka H.* The cyclic reorientation of cortical microtubules in in epidermal cells of Azuki bean epicotyls: the role of actin filaments in the progressin of the cycle// Planta. – 1998. – vol.205. – P.539 – 546.

18. *Yang J., Kloepper J.W., Ryu C.-M.* Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress // Trends Plant Science. – 2009. – vol.14, №1. – P.1-4.

Резюме

Рослини в процесі еволюції вступили у взаємодію з ґрунтовими грибами, бактеріями, сформували імунні системи для захисту від паразитів, генетично детермі-

новані мультигенні системи відповіді на посуху, контролю за енергетичним та метаболічним гомеостазом, що дозволяє виживати за умов дії багатьох факторів біотичної та абіотичної природи.

During evolution process plants have interacted with soil fungal, bacteria, formed immune systems for protection of parasite, genetically determined multigenic systems of response to drought, control of metabolic and genetic homeostasis, which allow to survive under action of many factors of biotic and abiotic nature.

ИВАНОВ Р.С., ТРОПЫНИНА Т.С., ВАФИНА Г.Х., ИВАНОВА Э.А.

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Россия, 450054, Уфа, пр.Октябрь, 69, e-mail: evilina@anrb.ru

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ В УСЛОВИЯХ ФАКТОРОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

Адаптация к определенным условиям обитания проявляется как в изменении общих характеристик генома (например, суперспирализация ДНК), так и в наличии генов, продукты которых обеспечивают приспособление организмов к тем или иным условиям. Как у бактерий, так и у растений способных адаптироваться к различным внешним условиям, существуют сложные системы регуляции. Перестройки генома могут происходить как в ответ на изменение физиологических условий в процессе жизнедеятельности отдельной клетки, организма, так и в процессе эволюции. Известно, что эволюционно транскрипция возникла позже трансляции, ещё позже появилась репрессия генов и компактизация ДНК, которые способствовали увеличению размеров генома [1]. В связи с этим возникает вопрос – в чем заключается особенность функционирования транскрипционно-активного хроматина и бактериальной хромосомы и каким образом транскрипция может регулироваться на уровне хроматиновой, хромосомной фибриллы? К одной из сторон анализа этого вопроса мы решили подойти, исследуя Arg-X протеолиз в бактериальной хромосоме и хроматине эукариотической клетки, учитывая, что основные аминокислоты, в частности аргинин, входящий в состав гистонов, (возможно, и гистонподобных белков нуклеоида бактерии) принимают активное участие в структуризации ДНК. Структурной особенностью аргинина является наличие реакционно-активной в дельта положении гуанидиновой группы. В настоящее время гуанидиновые группы особенно прочно внедряются в нано-технологических разработках на микро- и макроорганизменном уровне. Наше внимание к гуанидиновым группам аргинина связано с тем, что протеом генетических структур про- и эукариот обогащен белками богатыми аргинином. В настоящее время первичная структура некоторых аргинин богатых гистонов хорошо изучена и показана их эволюционная идентичность по аминокислотной последовательности гистона H4 животных тканей и растений [2]. То

есть, гистон H4 эволюционно консервативен и представлен высококонсервативными последовательностями из коротких пептидов, в которых почти везде присутствует аргинин. Значение этих последовательностей ещё предстоит расшифровать. Известно, что протеолитическая система в эукариотическом организме ответственна за целостность отдельной ткани (она тканеспецифична). В бактериальной клетке, по-видимому, она ответственна за внутриклеточную сохранность. Кроме того, протеолитическая система филогенетически древнее гормональной или нервной систем, ответственных за функционирование организма в целом. Важным свойством протеолитической системы является также и то, что это форма биологического контроля, дающая быстрый физиологический ответ на изменяющиеся условия внешней среды. В 1990 г вышла статья Гюнтер Альбрехт-Бюлера (Gunter Albrecht-Buehler) о том, что цитоплазма клетки высоко структурирована, разделена мембранами и вся пронизана нитями цитоскелета, с этой точки зрения внутриклеточные реакции более адекватно может описывать только надмолекулярная химия иммобилизованных ферментов, где уже интегрированы взаимодействия многих макромолекул [3]. Целью данной работы был экспериментальный анализ локализации *Ap2-X* протеазо-чувствительных участков в надмолекулярных структурах генома, как возможных зон его ремоделирования, про- и эукариотических клеток в процессе их пространственно-временного функционирования.

Материалы и методы

При работе с протеомом прокариотической клетки использовался штамм *E. coli* JC-158, любезно предоставленный нашими коллегами И.В. Ступак и Е.Э. Ступак. Клетки *E. coli* выращивали на богатой питательной среде LB (Лурия-Бертани) до стационарной фазы, собирали центрифугированием и промывали трис-буфером. Выделение надмолекулярных фракций из клеточных ядер элитных семян пшениц (*Triticum aestivum* L., присланные из коллекции Всероссийского института растениеводства им. Н.И. Вавилова) сортов Артемовки (яровой) и выведенной из неё Мироновской 808 (озимой) проводили по методу [4]. Через каждые 3ч, после замачивания семян в течение 21ч, проводили отделение зародышей от эндосперма, определяли их сырую массу и консервировали при 25⁰ С в 80-90% глицерине [5]. Из бактериальных клеток и клеточных ядер пшениц фракционировали надмолекулярные структуры согласно методу [6]. Протеом содержащие структуры *E. coli* фракционировали на основе разрыва слабых и сильных взаимодействий надмолекулярных структур с использованием ступенчатого повышения солевого градиента [6]. Обычно фракция, выходящая при низкой ионной силе 0,14 М NaCl, известна в биохимии клеточного ядра под названием: ядерный сок, нуклеоплазма (Нп) или глобулиновая фракция [7]; остальные фракции известны как соответственно хроматин: непрочно (Хр-I) – (0,35 М NaCl), прочносвязанный (Хр-II) – (2 М NaCl) с ядерным матриксом (ЯМ) и собственно ядерный матрикс (6 М гуанидин – гидрохлорид

с 0,004 % β – меркаптоэтанолом). По аналогии, надмолекулярные фракции, выделенные из *E. coli*, можно представить соответственно как: клеточный сок (цитоплазма -Цп), надмолекулярные структуры непечно (Нп-I) – и прочносвязанные (Нп-II) с клеточным остатком (КО) и собственно КО с жесткой клеточной оболочкой. Количество белка в надмолекулярных структурах определяли методом Бредфорд в нашей модификации [4]. *Arg-X* активность оценивали по расщеплению *Arg-X* связей в аргининбогатом белке – протамине («Мерк») во всех вышеперечисленных фракциях ядер и надмолекулярных структур *E. coli*. Используемый в эксперименте протамин – *Salmine-A-I*, состоит из 33 аминокислот: 22-х молекул *Arg*; 4-х молекул *Ser*; 3-х молекул *Pro*; по 2 молекулы *Glu* и *Val*. Активность *Arg-X*-протеолиза выражали в нмоль аргинина·с⁻¹·мкг белка. Числа и точки на графиках представляют среднеарифметические данные.

Результаты и обсуждение

По мнению [8] главной задачей XXI века является – понять как все компоненты клетки взаимодействуют в пространстве и времени, образуя сложные динамические, биологические системы. В этом направлении особое значение приобретают данные о первичной структуре информационных макромолекул и возможность сравнения организмов по этим показателям в филогенетике. В своих экспериментальных работах нас интересовал эволюционный способ-механизм пространственно-временной реорганизации протеома генома в меняющихся условиях окружающей среды и какую роль конкретно в этом процессе могут выполнять аргининсодержащие белки. В данной работе мы анализировали локализацию *Arg-X* протеазочувствительных зон на разных уровнях укладки интерфазного хроматина *G₁* фазы клеточного цикла и структурной реорганизации прокариотической клетки в периоды ее активного роста, замедления и стационарной фаз на примере популяции бактериальных клеток *E. coli*. В клетках бактерий хромосома уложена в виде компактной структуры, связанной с мембраной. Такой ДНК-мембранный комплекс обеспечивает структурную укладку хромосомы, ее репликацию и сегрегацию [9]. Морфология релаксированного бактериального нуклеоида напоминает морфологию нуклеоида эволюционно ранней эукариотической клетки за тем исключением, что последний имеет большее количество отходящих от центра петель. В нашем эксперименте, в активной фазе роста, при достаточном количестве питательных веществ в среде, клетки бактерий растут с наивысшей скоростью (активная фаза роста). При постепенном исчерпании необходимых питательных веществ и накоплении продуктов метаболизма скорость роста бактерий снижается (фаза замедления роста). Затем рост бактерий переходит к его остановке – культура входит в стационарную фазу. Считают, что при переходе бактерий в стационарную фазу запускается программа дифференциации, приводящая к тому, что клетки становятся метаболи-

чески менее активными и более устойчивыми к стрессовым факторам [9]. В этих условиях экспрессия большинства бактериальных генов существенно уменьшается. Однако происходит индукция экспрессии большого количества других генов и стимулируется синтез специфических белков, прежде всего тех, которые обеспечивают устойчивость бактерий к различным неблагоприятным условиям. Понимание механизмов регуляции экспрессии соответствующих генов чрезвычайно важно для биотехнологии. В природных условиях бактерии редко находятся в условиях изобилия, позволяющих экспоненциальный рост. Короткие периоды быстрого роста сменяются длительными периодами голодания, клетки подвергаются воздействию различных факторов, неблагоприятных для их жизнедеятельности. В этих условиях бактерии должны оставаться живыми в течение продолжительного времени и возвращаться в экспоненциальную фазу, когда влияние голодания и других неблагоприятных воздействий будет снято. Этот период также характеризуется проявлением возникновения молекулярных механизмов адаптации микроорганизмов к стрессу. Построение качественных моделей таких процессов – дело чрезвычайно сложное, тонкое и для науки очень важное. Наши данные показывают, что при переходе в стационарную фазу роста, то есть в фазу активного стресса, в цитоплазме клеток происходит нарастающий циклический всплеск *Arp2-X* протеолиза. В ряде работ показано, что при переходе бактерий в стационарную фазу роста в клетках происходит компактизация ДНК в результате качественного и количественного изменения состава белков нуклеоида [9]. Вполне возможно, что в этот период образуются и биогенные амины, например, из аргинина – агматин, в определенной дозе обладающий ядовитыми свойствами. Глобальные изменения в экспрессии генов при переходе клеток в стационарную фазу роста происходят на каждой стадии экспрессии генов и включают изменения конформации нуклеоида, аппарата транскрипции и трансляции. Вопрос о том, какие молекулярные механизмы обеспечивают выполнение программы дифференциации клеток в условиях замедления и прекращения роста, активацию (индукцию) экспрессии большого количества генов при снижении общего уровня экспрессии бактериальных генов, остается недостаточным изученным.

Удивительная пластичность растений приспосабливаться к новому образу жизни, быть то в яровой, то в озимой форме и особенно «крупные биохимические различия» этого явления, интересовала ученых давно [10]. Хроматин клеточных ядер представляет собой систему, которая обеспечивает возможность выбора части информации, реализуемой в признаки. Установлено, что структура хроматина и состояние его белков зависят не только от стадии развития организма, но и от изменения ионных параметров перинуклеарного пространства [11] окружающего ядро клетки, а это значит, что затрагивается огромная возможность биохимической адаптации организма к среде его обитания.

Мы считаем, что удобной моделью для исследования экспериментальной эволюции биохимической адаптации и молекулярной экологии растений на уровне молекулярно-генетических механизмов клеточного ядра является яровая сорт пшеницы Артемовка, из которого вывели озимый сорт Мироновскую 808. Покоящиеся воздушно-сухие зародыши пшеницы представляют собой высококодифференцированную клеточную систему, в которой завершились процессы эмбрионального развития. Наши данные показали, что исходный сорт – Артемовка в период вступления в S фазу клеточного цикла (18→21ч) имеет высокую массу белка на ядро. Вполне возможно, что это связано с активацией белково – синтетических процессов, необходимых для формирования вновь образующихся нуклеопротеидных систем ядра. Кроме того, в исследованном временном интервале в ядрах клеток зародышей Мироновской 808 пшеницы, находящихся в G₁ фазе клеточного цикла, при изменении морфогенетических подпрограмм развития, вызванных холодным стрессом, происходит задержка перехода G₁ фазы в S фазу клеточного цикла. Также, отмечаются особенности локализации в супраструктурах клеточных ядер *Arp-X* протеазо-чувствительных зон, что, возможно, связано с реорганизацией – ремоделированием хроматиновых-нуклеопротеидных комплексов в процессе адаптации организма растения к изменяющимся внешним условиям среды.

Вывод

Показано, что молекулярные механизмы онтогенетической адаптации и ремоделирования хроматиновых структур при изменении «яровости» на «озимость» на примере пшеницы Артемовки и выведенной из неё Мироновской 808 связаны с ядерным матриксом, ответственным за сборку ферментативных комплексов репликации и транскрипции. У прокариот, на примере *E.coli*, в период неблагоприятный (стационарная фаза) для жизнедеятельности популяции происходит активный Arg-X протеолиз в цитоплазме.

Работа поддержана президентским грантом для молодых ученых республики Башкортостан.

Литература

1. Боринская С.А., Янковский Н.К. Структура прокариотических геномов. // Молекулярная биология. – 1999. – Т. 33, № 6. – С. 941–957.
2. Иванова Э.А. Модификация гистонов у растений и ее физиологическое значение: дис. ... канд. биол. наук. – М.: 1977. – С. 7-14.
3. Марголис Л.Б. Почему мы не понимаем живую клетку, или Мифы молекулярной биологии // Природа. – 1991. – №3. – С. 97-100.
4. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Способ получения ядерных фракций, обладающих протеиназной и ингибирующей активностью / А.с. 1733471, МКИ С12 N9/50. Оpubл. 15.01.92, Бюл.№18.
5. Иванова Э.А., Вафина Г.Х. Способ выделения растительных клеточных ядер / А.с. 1701747, МКИ С12 N9/50. Оpubл. 01.09.91. Бюл.№48.

6. Иванова Э.А., Вафина Г.Х., Тропынина Т.С. Способ получения фракции из клеток *E.coli*, обладающей протеолитической активностью / Патент № 2410428 от 27.01.2011.

7. Збарский И.Б., Кузьмина С.Н. Скелетные структуры клеточного ядра. – М.: Наука, 1991. – 241с.

8. Свердлов Е.Д. Биологический редукционизм уходит? Что дальше? // Вестник РАН. – 2006. – Т.76, № 8. – С. 707-721.

9. Хмель И.А. Регуляция экспрессии бактериальных генов в отсутствие активного роста клеток. – 2005. – Т.41, №9. – С. 1183-1202.

10. Вавилов Н.И. Избранные труды. – М.-Л.: Наука, 1965. – Т.5. – С. 312-313.

11. Оловников А.М. Заметки о «принтомерном» механизме клеточной памяти и ионной регуляции конфигураций хроматина // Биохимия. – 1999. – Т.64, №12. – С. 1689-1698.

Резюме

Проведенная работа показала, что молекулярно-генетические механизмы *Arg-X* протеолиза в стрессовых условиях окружающей среды у эукариот локализуются на уровне ядерного матрикса, а в прокариотических клетках на уровне цитоплазмы.

Molecular-genetic mechanisms of *Arg-X* proteolysis in stress conditions of an environment in eukaryote organisms are located at the level of nuclear matrix, and in prokaryotic cells are at the level of cytoplasm has shown in this work

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

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

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ТРИПЛОИДЫ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЕСТЕСТВЕННОЙ ПОЛИПЛОИДИИ У БИСЕКСУАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ключевым моментом в создании первого в генетике животных тетраплоидного вида тутового шелкопряда (Астауров, 1968) было получение триплоидов женского пола от скрещивания диплоидных партеногенетических самок с диплоидными самцами. Эта возможность базируется на неотъемлемом свойстве термического партеногенеза вызывать удвоение хромосомного набора ($2n \times 2 = 4n$) в части клеток зародышевой линии, причем доля таких клеток специфична для каждого партеноклона (Клименко, Спиридонова, 1977). При осеменении миксоплоидных самок диплоидными самцами из крупных $4n$ -ооцитов образуются триплоиды, которых отделяют в отложенной грене от диплоидов по величине яйца. Триплоиды как потомки партеногенетического клона в достаточной мере наследуют способность к термическому партеногенезу и в следующих партеногенетических поколениях могут дать начало целому вееру триплоидных партеноклонов. В партеногенетическом развитии последних также происходит процесс удвоения содержания ДНК в части ооцитов ($3n \times 2 = 6n$) с той лишь разницей, что он не приводит к увеличению размеров $6n$ -ооцитов. Однако при скрещивании с диплоидными самца-

ми триплоидные ооциты не оставляют потомства из-за анеуплоидии, тогда как из гексаплоидных были получены тетраплоиды ($6n/2 + 2n/2 = 4n$) обоих полов, давшие начало первому среди животных экспериментальному обоеполому тетраплоидному виду. Этот многолетний генетический эксперимент положен в основу известной гипотезы непрямого (опосредованного партеногенезом) происхождения бисексуальных полиплоидов у животных (Астауров, 1968). Ее приложимость к широкому кругу явлений полиплоидии в животном мире, очерченному Астауровым в его основополагающей работе, со временем лишь подкрепляется новыми сообщениями о полиплоидных формах, ответвляющихся через партеногенез от исходного обоеполого диплоидного вида. В чем же состоит роль партеногенеза в экспериментальной и эволюционной полиплоидии животных? Ведь возникшая в природе однополо-женская форма была бы быстро генетически «размыта», если бы при сохранении способности к активации сперматозоидом своего вида, гаплоидизация в осемененном ооците не была в достаточной степени заблокирована возникшей мутацией. Но как только эти два условия выполнены, кариогамия ведет к появлению триплоидов, эволюционная судьба которых заслуживает отдельного рассмотрения.

Во-первых, в триплоидном генотипе мутация, предотвращавшая выделение гаплоидного пронуклеуса, оказавшись в иной генетической среде, может уже не срабатывать; осеменение такого ооцита спермой исходного вида приведет к образованию нежизнеспособных анеуплоидов, если сохранится классическая схема мейоза (в неклассическом случае можно предполагать возникновение в триплоидном генотипе механизма удвоения или элиминации одного родительского генома с выправлением анеуплоидии женского пронуклеуса и зиготы). Во-вторых, если мутация обеспечивает и на триплоидном уровне отсутствие редукции генетического материала, то судьба осемененного триплоидного ооцита укладывается в несколько основных вариантов, а именно: а). Образуется жизнеспособная тетраплоидная зигота, дальнейшая судьбу которой можно анализировать так же, как мы сейчас анализируем зиготу триплоидную. б). Сперматозоид активирует триплоидный ооцит, однако кариогамия отсутствует; при достаточной изоляции триплоидной формы от исходного вида под действием отбора будет происходить замещение активирующего действия сперматозоида факторами, которые ранее либо играли второстепенную роль в сложном процессе активации яйца (кислород воздуха у палочников), либо были случайными (сперма чужого вида и отсюда возникновение гиногенеза, как разновидности партеногенеза) в). Осеменение отсутствует, ооцит развивается без блока мейоза в особь следующего поколения (некоторые паразитические формы), либо спонтанно-партеногенетически, что означает лишь временное отсутствие идентифицированных факторов активации и возвращает нас к предыдущему пункту.

Итак, мутационно закрепленное отсутствие редукции генетического материала (партеногенез) при сохранении способности ооцита к осеменению и

кариогамии может приводить к появлению партеногенетических триплоидов. Хотя такие формы были известны Б.Л.Астаурову, в его экспериментальной модели на тутовом шелкопряде они отсутствовали, поскольку еще не были получены; их место занимали триплоиды от оплодотворения $4n$ -ооцитов миксоплоидных самок спермой диплоидных самцов, к чему амеиотический партеногенез не имеет отношения. Партеногенез в модели Астаурова использован для получения миксоплоидных ($2n/4n$) и ($3n/6n$) самок. Этот общий атрибут партеногенеза давно замечен в истории изучения партеногенеза, но экспериментально доказан лишь на тутовом шелкопряде (Клименко, Спиридонова, 1977): развитие яйца без кариогамии увеличивает вероятность полиплоидизации в зародышевой линии, вследствие чего партеногенетическое размножение и в природе и в эксперименте само является причиной возникновения полиплоидных форм исходного вида. Это правило действует, видимо, на всех уровнях плоидности. Поэтому и возникли в триплоидных партеногенетических самках $6n$ -ооциты, которые дали в результате оплодотворения тетраплоидных самок и самцов как основателей тетраплоидного вида.

Материал и методы

Гипотеза Астаурова может быть дополнена и развита на основе результатов изучения экспериментальных триплоидов, возникающих в результате осеменения диплоидных партеногенетических клонов, в ооцитах которых мейоз подавлен сразу (не позже трех минут) после откладки осемененного яйца тем же путем, что и при термическом партеногенезе, т.е. прогревом при 46°C в течение 18 мин (Клименко, 1978). Для получения таких «партенозигот» использовали грену от скрещивания партеноклона P50 (несет рецессивными маркерами: отсутствие пигмента в серозе w_2 , рыжая окраска «мурашей» ch , лимонный цвет покровов lem , отсутствие на них пигментного рисунка p) с самцами линии $ge971$, гомозиготной по рецессивному гену красной пигментации серозы re , доминантному гену зебровости Ze , нормальному аллелю рисунка на покровах p^+ и их нелимонному цвету lem^+ . Термическая обработка осемененных яиц, отложенных самками P50 за 3 минуты, моделирует в данном случае процесс осеменения яиц возникшей партеногенетической формы спермой исходного диплоидного вида. Прогрев, не препятствующий активации, вызванной вхождением спермиев в ооцит, должен подавлять редукционное деление так же, как он это делает в методе Астаурова и приводить к модельной ситуации осемененного активированного ооцита с искусственно подавленным в нем редукционным делением мейоза. В сочетании с кариогамией это даст триплоидов ($2AZW + 1AZ = 3AZZW$) среди яиц темно-серого (дикого) цвета, поскольку в партенозиготе оба рецессивных маркера пигментации серозы (w_2 и re) будут прикрыты дикими аллелями; при этом некариогамические варианты будут распознаваемы по отсутствию пигментации серозы w_2 (партеногенез) или по ее красному цвету re (андрогенез). В работе использован также новый метод оценки плоидности клеток диапаузирующего зародыша подсчетом зе-

рен хроматина в ядре клетки. Благодаря этому были выявлены новые источники полиплоидизации в зародышевой линии, не учитываемые при использовании одних генетических маркеров.

Результаты и обсуждение

Из общего количества 5314 оплодотворенных яиц в диапаузу ушло 2619; из остальных (2695 яиц) после устранения диапаузы с помощью HCl вышли 1143 гусеницы (42%). Эмбриональное развитие в кариогамическом варианте (темно-серая грена) происходит заметно быстрее и развившиеся личинки выходят на сутки раньше, чем в прочих вариантах. В IV возрасте вышедших личинок разделили по фенотипу: из 1143 личинок I возраста до IV возраста дошли 663 (жизнеспособность к этому времени составила 58%) и среди них 171 самка фенотипа P50 (партеногенез), 478 самок и 14 самцов фенотипа Ze (соотношение ♀Ze : ♂Ze = 35:1). Если предположить, что фенотип Ze возникает только в результате кариогамии, то в случае неподавления прогревом редукционного деления созревания в половине прошедших мейозов должен формироваться мужской пронуклеус. Тогда число кариогамических триплоидов можно оценить как разницу между количеством самок фенотипа Ze и количеством самцов (в нашем случае $478 - 14 = 464$), т.е. триплоиды составили 41% от количества всех вышедших личинок, 70% – от дошедших до IV возраста и 17% от всех обработанных HCl яиц. Анализ экспериментального материала в диапаузе (2619 яиц) выявил 1233 непигментированных яйца (фенотипа P50), из которых 332 соохлись. Из 1386 пигментированных яиц 1333 были темно-серые, 53 (4%) были мозаичными: 52 двухцветных (49 красно-белых, 3 темно-белых) и одно яйцо трёхцветное, что свидетельствовало о возможности смешанного, партеногенетического и зиготического развития в одном яйце. Для независимой оценки количества триплоидов в диапаузирующей грене использовали метод подсчета зерен хроматина и ядрышек в клетках диапаузирующих зародышей. Из 97 зародышей 32 (33,0%) оказались диплоидными, триплоидными – 59 (60,8%), тетраплоидными – 1 (1,0%), пентаплоидными – 1 (1,0%), гексаплоидными – 1 (1,0%), ди/триплоидными мозаиками – 3 (3,1%). Появление гексаплоидов может быть объяснено слиянием трёх диплоидных ядер, двух триплоидных или редким случаем слияния ядра тетраплоидного ооцита (как сказано выше в диплоидных партеноклонах встречаются тетраплоидные ооциты) с двумя отцовскими гаплоидными. Появление пентаплоидов объяснимо слиянием триплоидного ядра с двумя мужскими гаплоидными мужскими пронуклеусами или ядра тетраплоидного ооцита с одним мужским ядром. Из выкормленного материала было заложено 15 клонов, триплоидность которых была подтверждена цитологически в 13 случаях (86,7%); 2 клон (13,3%) оказались диплоидными. В случаях ди/триплоидного мозаицизма в эмбрионах выявлены пентаплоидные клетки, происхождение которых через слияние диплоидного и триплоидного ядер из участков разной пloidности эмбриона очевидно. Заметим, что в диплоидных партеноклонах наряду с ди-, тетра- и октоплоидными клетками клеток выявлены бп-клетки, которые не могут об-

разоваться путем эндомитоза, а лишь слиянием. Следовательно, в мозаичном развитии имеет место слияние ядер, относящихся к разным цитогенетическим вариантам их возникновения в партенозиготе. Можно допустить далее, что образовавшиеся таким путем в период дробления полиплоидные ядра вовлекаются в зародышевую линию развивающегося эмбриона и тем самым расширяют спектр производимых полиплоидных гамет. В рассматриваемой модели партенозиготы, возникающие путем осеменения яиц диплоидной партеногенетической формы, могут произвести целый спектр ооцитов возрастающей плоидности, начиная с диплоидного уровня и, возможно, не кончая даже гексаплоидным; триплоиды при этом составляют наибольшую часть производимого потомства. Отобранных по маркерам триплоидных самок использовали в следующем цикле экспериментальной полиплоидизации, обрабатывая их свежесоосеменную грену в прежнем температурно-временном режиме. Партенозигот второго цикла полиплоидизации цитологически изучали в диапаузе; среди них, как и ожидалось, были обнаружены тетраплоиды (36%), которые в природе могли бы возникнуть в результате осеменения триплоидных партеногенетических самок диплоидными самцами исходного диплоидного вида. Этот путь циклической полиплоидизации требует сохранения в ооците блока механизма редукции при очередном осеменении. Результатом добавления в каждом цикле гаплоидного набора хромосом к диплоидному исходного вида станет полный ряд полиплоидов $2n, 3n, 4n, \dots, 7n, 8n, \dots$, с которыми далее предстоит работать естественному, а в эксперименте искусственному отбору. В нашем случае ожидаются тетраплоиды с формулой $4AZZZW$, а еще через три поколения – октоплоиды $8AZZZZZZZW$. На октоплоидном уровне мы предполагаем «вернуть мейоз в ооцит», для чего достаточно будет прекратить скрещивания с самцами исходного диплоидного вида и не производить «полиплоидизирующий» прогрев. Вместо этого ооциты октоплоидов пройдут спонтанный или индуцированный холодом мейотический партеногенез, в результате которого в потомстве должны образоваться тетраплоидные самки и самцы в равных долях, поскольку пол будет определяться наличием или отсутствием W-хромосомы в тетраплоидном женском пронуклеусе. Эта схема выведения бисексуальной тетраплоидной расы была предложена значительно раньше (Клименко, Спиридонова, 1982).

Выводы

Происхождение моно- и бисексуальных полиплоидных форм через партеногенез в природе и в эксперименте базируется на полиплоидизации клеток зародышевой линии как неотъемлемом свойстве этого типа репродукции.

Экспериментальные триплоиды, полученные прогревом свежесоосеменных яиц диплоидных партеногенетических самок восполняют недостающее начальное звено в гипотезе Астаурова о происхождении бисексуальных полиплоидов у животных через партеногенез.

Неполное подавление прогревом первого деления мейоза (и в природе, и в эксперименте) имеет приводит к возникновению цитогенетически различных вариантов развития в одном яйце (мозаицизму), что вместе с процессом слияния ядер, затрагивающим зародышевую линию, может приводить к возникновению протяженного ряда полиплоидов, начинающегося с триплоидов.

Подавление мейотической редукции в последовательных партеногенетических поколениях, осеменяемых самцами исходного вида, может приводить к высоким уровням четной полиплоидии, достаточным для возникновения обоеполых полиплоидов в результате восстановления мейотической редукции в ооцитах.

Полиплоидизация в зародышевой линии партеногенетических форм, вероятно, является следствием сохранения в ооплазме нереализованных механизмов кариогамии.

Литература

1. *Астауров Б.Л.* Цитогенетика развития тутового шелкопряда и ее экспериментальный контроль. – Москва.: Наука, 1968.— 102 с.
2. *Астауров Б.Л.* Экспериментальная полиплоидия и гипотеза непрямого (опосредованного партеногенезом) происхождения естественной полиплоидии у бисексуальных животных // Генетика.— 1969.— Т.5.— №7.— С. 129-149.
3. *Клименко В.В., Спиридонова Т.Л.* Трансплоидная комбинативная изменчивость при искусственном партеногенезе у тутового шелкопряда // Докл. АН СССР.— 1977.— Т.236.— №3. С. 740-743.

Резюме

На основе изучения термической триплоидии у тутового шелкопряда восполнено недостающее звено и расширены возможности экспериментальной модели, предложенной Б.Л.Астауровым для объяснения происхождения в природе бисексуальных полиплоидных форм животных.

На основі вивчення термічної трипloidії шовковичного шовкопряда віднайдено відсутню ланку й розширено можливості експериментальної моделі, запропонованої Б.Л.Астауровим для пояснення походження в природі бісексуальних поліпloidних форм тварин.

Results of the present study on thermal triploidy in the silkworm has made up for the missing link in and extended the experimental model that was proposed by B.L.Astaurov to explain in nature the origin of bisexual polyploid forms of animals.

КУНДА-ПРОНЬ И. В.¹, РАДИОНОВ Д. Б.², КУЧЕРОВ В. А.²,
КОЗЕРЕЦКАЯ И. А.³

¹ Дрогобычский государственный университет имени И.Я. Франко
ул.Ивасюка, 11, г.Трускавец 82200 Украина, e-mail: ira-kunda@yandex.ru

² Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина, e-mail: pankova@yandex.ru

³ Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина, e-mail: iryua.kozerecka@gmail.com

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА КАРБОКСИЭСТЕРАЗЫ, РЕКОМБИНАЦИОННЫХ И МУТАЦИОННЫХ СОБЫТИЙ В ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER* Г. ДРОГОБЫЧ

Приспособление организмов к изменяющимся условиям окружающей среды сложный процесс, затрагивающий все уровни биологической организации. Основополагающими в механизмах адаптации являются изменения, наблюдаемые на генетическом уровне. При этом могут изменяться как уровни экспрессии и частоты встречаемости аллелей отдельных генов, так и структура и функционирование геномов в целом [1 – 3]. Несмотря на интенсивные исследования, проводимые последние 30 лет, многие механизмы адаптации на генетическом уровне остаются до настоящего времени не выясненными. Наиболее удобным объектом для исследований генетических особенностей приспособления к изменчивым экологическим факторам являются представители космополитических видов с коротким репродуктивным циклом. Важным также является изучение кратковременных периодов адаптаций связанных с сезонными изменениями.

В связи с этим, целью нашей работы было установить частоты встречаемости и экспрессивность аллозимов β-специфической карбоксиэстеразы кодируемых локусом *Est-6*, оценить спонтанный уровень видимых и летальных сцепленных с X-хромосомой мутаций, а также исследовать частоту рекомбинационных событий на участке *white (w, 1-1,5) – cut (ct, 1-20.0)* у представителей природной популяции *Drosophila melanogaster* г. Дрогобыч в июле – сентябре 2010 г.

Материалы и методы

Для исследований использовали особей *D. melanogaster* изъятых в июле – сентябре 2010 года из природной популяции г. Дрогобыч. Объем выборки составлял 200 – 250 мух в каждом месяце.

Для определения частот встречаемости и уровня экспрессии аллозимов β-специфической карбоксиэстеразы кодируемых локусом *Est-6* использовали гомогенаты тканей отдельных самцов и самок (по 15 особей) полученных на стадии трехсуточных имаго. Разделение молекулярных форм карбоксиэстераз проводили при помощи электрофоретического разделения в системе щелочного вертикально-пластинчатого 7,5 % полиакрила-

мидного геля. Разделенные фракции карбоксиэстераз идентифицировали при помощи стандартных гистохимических методов [4]. Уровень экспрессивности аллозимов *Est-6* в геле определяли при помощи лицензионной компьютерной программы «анализатора спектров изображений» «АнаИС» (Поджарский, Рыбалка, 2004, Украина) и отображали в единицах оптической плотности ($\Delta D\bar{o}$).

Уровень летальных сцепленных с X-хромосомой мутаций оценивали по отклонению в соотношении самцов и самок в первом поколении скрещивания самок линии *C(1)DX* и 10 самцов из анализируемой популяции дрозофил (в контроле это соотношение 2:3 соответственно). Для определения частоты рекомбинационных событий в X-хромосоме на участке между генами *white* (*w*, 1-1,5) и *cut* (*ct*, 1-20.0) самцов из природной популяции скрещивали с виргинными самками линии *w ct* (10 самцов). Частоту кроссинговера определяли по соотношению рекомбинантных классов, появляющихся среди потомков данного скрещивания во втором поколении. Исследования видимых мутаций у мух исследуемой популяции проводили визуально при помощи светового микроскопа. Статистическую обработку полученных данных проводили, пользуясь компьютерной программой «Excel» из пакета «MS Office» и специальным руководством [5].

Результаты и обсуждение

Анализ частот аллозимов β -специфической карбоксиэстеразы показал наличие полиморфизма по локусу *Est-6* в течении всего исследуемого периода у мух из популяции г. Дрогобыч. При этом частота медленноподвижной молекулярной формы фермента (*S*-аллозим) в июле и сентябре 2010 г. достоверно не отличалась и составляла 0,73 и 0,77 соответственно (табл. 1). Эти значения соответствует частотам встречаемости данной молекулярной формы карбоксиэстеразы наблюдаемым в популяциях *D. melanogaster* обитающих на аналогичных широтах в Северном и Южном полушариях [6].

Таблица 1.

Частота *S*-аллеля β -специфической карбоксиэстеразы в природной популяции *D. melanogaster* г. Дрогобыч в июле – сентябре 2010 г.

Месяц сбора мух	Частота аллеля <i>Est-6^S</i>	χ^2
Июль	0,73	0
Сентябрь	0,77	0,83

Примечание: в каждом месяце анализировали по 30 особей.

Нулевая гипотеза о равенности частот в генеральных совокупностях отклонялась при $\chi^2 \geq 3,84$ ($P=0,05$)

Анализ уровней экспрессии S- и F-аллозимов β -специфической карбоксиэстеразы показал что они были достоверно выше у самцов исследуемой популяции по сравнению с самками (Рис. 1). Обнаруженный половой диморфизм согласуется с полученными нами ранее результатами для других природных популяций Украины [7]. При этом исследуемый параметр ак-

тивности фермента оставался стабильным в изучаемый период времени. Исключение составляет увеличение уровня экспрессивности S-аллозима у самок в сентябре по сравнению с июлем с $0,26 \pm 0,04$ до $0,91 \pm 0,12$ соответственно (Рис.1).

За весь исследуемый период частота фенотипически видимых мутаций у мух популяции г. Дрогобыч не изменялась и не превышала 0,06 %. Частота сцепленных с X-хромосомой мутаций также оставалась стабильной с июля по сентябрь и достоверно не отличалась от контрольного уровня (табл. 2).

Таблица 2.

Оценка частот колебаний количества сцепленных с полом летальных мутаций в природной популяции *D. melanogaster* г. Дрогобыч в июле – сентябре 2010 г.

Месяц сбора мух	Количество самок	Количество самцов	χ^2
Июль	173	240	0,61
Август	117	149	1,71
Сентябрь	92	160	1,33

Примечание: Нулевая гипотеза о равенности частот в генеральных совокупностях отклонялась при $\chi^2 \geq 3,84$ ($P=0,05$)

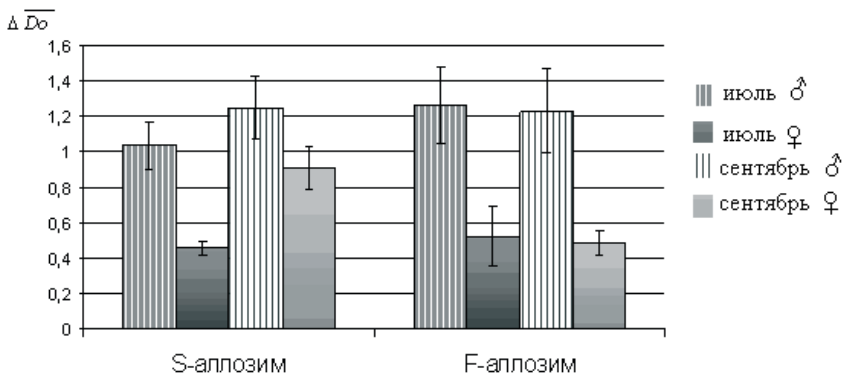


Рис. 1. Сравнительная характеристика экспрессивности аллозимов β-специфической карбоксиэстеразы в природной популяции *D. melanogaster* г. Дрогобыч в июле – сентябре 2010 г.

Исследование частот рекомбинационных событий на участке X-хромосомы между генами *white* (*w*, 1-1,5) и *cut* (*ct*, 1-20.0) в исследуемой популяции с июля по сентябрь 2010 г. не выявило достоверных отличий от теоретически ожидаемых частот (табл. 3.).

Таким образом, все исследуемые нами генетические показатели в природной популяции *D. melanogaster* г. Дрогобыч в период с июля по сентябрь 2010 г, т. е. сезон максимальной биологической активности изучаемого вида на данных широтах, оставался стабильным, что не согласуется

Таблица 3.

Частота рекомбинационных событий на участке между генами *white* и *cut* в природной популяции *D. melanogaster* г. Дрогобыч в июле – сентябре 2010 г.

Месяц сбора мух	Наблюдаемая частота кроссинговера (%)	Ожидаемая частота кроссинговера (%)	χ^2
Июль	17,3	18,5	0,34
Август	16,9	18,5	0,85
Сентябрь	19,4	18,5	0,23

Примечание: Нулевая гипотеза про равенство частот в генеральных совокупностях отклонялась при $\chi^2 \geq 3,84$ ($P=0,05$).

с результатами ранее полученными Р. Л. Берг для Уманской природной популяции *D. melanogaster* [8], что, возможно, связано с тем, что в указанной работе изучались аутосомные летальные мутации, которые в отличие от сцепленных с полом могут накапливаться в популяции в гетерозиготном состоянии. Единственное исключение, связанное с достоверным увеличением экспрессивности *S*-аллозима у самок в сентябре, демонстрирует наличие биохимической и/или физиологической адаптаций в живых организмах при генетической стабильности.

Выводы

Природная популяция *Drosophila melanogaster* г. Дрогобыча характеризуется наличием полиморфизма по локусу *Est-6*, при этом частота *S*-аллозима значительно выше частоты электрофоретически более подвижной формы.

Экспрессивность *S*- и *F*-аллозимов β -специфической карбоксиэстеразы у самцов изучаемой популяции в изучаемый период времени была достоверно выше по сравнению с самками.

Все исследуемые генетические показатели в природной популяции *Drosophila melanogaster* г. Дрогобыч в период с июля по сентябрь 2010 г сохраняли стабильность.

Литература

1. *Odgers W. A., Healy M. J., Oakeshott J. G.* Nucleotide polymorphism in the 5' promoter region of Esterase 6 in *Drosophila melanogaster* and its relationship to enzyme activity variation // *Genetics* – 1995. – v. 141. – P. 215-222.
2. *Захаров И. К., Ваулин О. В., Илинский Ю. Ю.* и др. Источники генетической изменчивости в природных популяциях *Drosophila melanogaster* // *Вестник ВОГиС.* – 2008. – т. 12., № 1/2. – С. 112 – 126.
3. *Karasov T., Messer P. W., Petrov D. A.* Evidence that adaptation in *Drosophila* is not limited by mutation at single sites // *PLoS Genetics* – 2010. – v.6, N 6. – P. 1 – 10.
4. *Андрієвський А. М., Кучеров В. А., Тоцький В. Н., Деркач Е. В.* Онтогенетические особенности экспрессии карбоксиэстераз у *Drosophila melanogaster* // *Вісник ОНУ.* – 2005. – т. 10, №5. – С. 26 – 35.
5. *Атраментова Л., Утевська О.* Статистичні методи в біології. – Харків. – 2007. – 288 с.

6. *Bubily, O. A., Kalabushkin, B. A. and Imasheva, A. G.* Geographic variation of six allozyme loci in *Drosophila melanogaster*: an analysis of data from different continents // *Hereditas* – 1999. – v.130. – P. 25-32.

7. *Раїонов Д. Б., Андрійвський А. М., Козерецька І. А.* Аналіз активності ізоформ естераз у з природних популяціях України // *Вісник КНУ ім. Т. Шевченка. Біологія.* 2009 – № 54 – С. 36 – 38.

8. *Берг Р. Л., Бриссинден Э. Б., Александрійская В. Т., Галковская К. Ф.* Генетический анализ двух природных популяций *Drosophila melanogaster* // *Журн. общей биол.* – 1941. – Т. 2., № 1. – С. 143–158.

Резюме

Установлено, що частоти алелів гена карбоксиестерази, спонтанних видимих і летальних сцеплених з полом мутацій, а також рекомбінационних подій в Х-хромосомі на участку *white* (*w*: 1-1,5) – *cut* (*ct*: 1-20.0) оставались стабільними в природній популяції *Drosophila melanogaster* с июля по сентябрь 2010 г.

Встановлено, що частоти алелів гена карбоксиестерази, спонтанних видимих і летальних сцеплених зі статтю мутацій, а також рекомбінационних подій у Х-хромосомі на ділянці *white* (*w*: 1-1,5) – *cut* (*c*: 1-20.0) залишалися стабільними у природній популяції *Drosophila melanogaster* з липня по вересень 2010 р.

The frequency of alleles of the carboxiesterase gene, spontaneous visible and lethal sex-linked mutations and recombination events in the X-chromosome within region *white* (*w*: 1-1,5) – *cut* (*ct*: 1-20.0) in natural populations of *Drosophila melanogaster* from Drogobych were studied. All studied factors remained stable in the natural population from July to September 2010.

ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ В АГАМОСПЕРМНЫХ ПОТОМСТВАХ РАСТЕНИЙ

Для объяснения изменчивости в агамоспермных потомствах растений, в том числе и у сахарной свеклы, была предложена гипотеза, в основе которой лежит предположение о политении хромосом в клетках растений и об удалении (диминуции) избыточных хроматид из клетки, вступившей в эмбриогенез [1, 2]. Гипотеза основана на результатах исследования агамоспермии у сахарной свеклы и на известных из литературы сведениях о политении и диминуции хроматина у животных и растений в ходе первых делений эмбриогенеза [3-10]. Согласно этой гипотезе политения хромосом в клетках генеративных органов растений носит дифференциальный характер, и разные участки хромосом имеют различную степень эндоредупликации. Предполагается также, что удаление избыточных хроматид или копий участков хроматид происходит независимо и равновероятно, а во вступившей в эмбриогенез клетке остается лишь та пара копий участков хроматид, которая прикрепилась к ядерной мембране или к ядерному матриксу [1, 2]. Сохранившаяся

в клетке пара участков хроматид, несущая аллели маркерного локуса, определяет генотип развивающегося зародыша по данному гену. Равной вероятностью удаления избыточных копий участков хроматид обеспечивается комбинаторный процесс, приводящий к тому, что соотношение фенотипических классов в агамоспермном потомстве определяется соотношением числа нитей хроматид, несущих маркерные аллели в материнском растении.

Наряду с политенией причиной изменчивости в агамоспермных потомствах может быть и полиплоидия, а точнее миксоплоидия, выражающаяся в том, что в диплоидном растении наряду с основной массой диплоидных клеток может присутствовать и примесь тетраплоидных [5, 11]. Если тетраплоидная материнская клетка мегаспор вступает в мейоз, то она дает диплоидную мегаспору, из которой в ходе последующих делений образуются зародышевый мешок, содержащий диплоидные клетки, способные вступать в эмбриогенез без участия мужской гаметы [11].

В обоих случаях: как при потере избыточных копий участков хроматид клеткой, содержащей политенные хромосомы, так и при расхождении хромосом в ходе мейоза тетраплоидной клетки, соотношение фенотипов в агамоспермных потомствах определяется различными по своей природе комбинаторными процессами, различить которые не всегда возможно. В то же время следует отметить, что оба этих процесса могут присутствовать при образовании агамоспермного потомства одного и того же растения. В связи с этим представляет интерес разработка теоретических и поиск экспериментальных моделей, позволяющих оценивать роль этих двух процессов в возникновении полиморфизма в агамоспермных потомствах.

Известно, что политенизация хромосом происходит в дифференцированных клетках, не запрограммированных на дальнейшее деление [3-7]. Можно предположить, что политения, обнаруженная в клетках зародышевого мешка у многих видов растений [10], может быть обусловлена задержкой эмбриогенеза, вызванной различными факторами, в том числе мужской стерильностью и полным отсутствием пыльцы. В то же время можно полагать, что повышение степени политении и связанное с этим увеличение содержания ядерной ДНК может вызвать в клетках зародышевого мешка, нуцеллуса и интегументов те же процессы, которые происходят при объединении геномов спермия и яйцеклетки. Логично предположить, что политенизация может привести к достижению критически высокого уровня содержания ДНК в ядре, что, в свою очередь, приведет клетку к вступлению в эмбриогенез. Однако известно, что в ходе первых делений эмбриогенеза содержание ДНК в ядрах клеток уменьшается [8-9]. Именно это послужило основой для создания гипотезы о роли политении и последующей диминуции избыточных копий хроматид и их отдельных участков в возникновении полиморфизма в агамоспермных потомствах растений.

Можно теоретически представить следующую ситуацию. Допустим, что в гетерозиготном по маркерному локусу растении сахарной свеклы,

имеющему генотип FS , среди основной массы диплоидных материнских клеток мегаспор присутствуют тетраплоидные, имеющие генотип $FFSS$. В результате мейоза при хромосомном типе расщепления и последующем гаметогенезе из этих клеток образуются диплоидные яйцеклетки трех генотипов в соотношении $1FF : 4FS : 1SS$, или $0.166FF : 0.668FS : 0.166SS$. При задержке эмбриогенеза, вызванной отсутствием пыльцы и, соответственно, слияния гамет, в яйцеклетках может происходить политенизация хромосом. Политенизация маркерного локуса в клетках, несущих один аллель, не позволяет выявить комбинаторный процесс, в то время как политенизация в клетках, несущих оба маркерных аллеля, приводит к регистрируемому комбинаторному процессу, который может существенно сказываться на соотношении фенотипических классов в потомстве. Предположим, что в диплоидных яйцеклетках в период задержки эмбриогенеза прошли два цикла политенизации участков хромосом, несущих аллели F и S . Тогда яйцеклетки, несущие оба аллеля данного локуса, будут содержать по 4 копии каждого из аллелей. Состояние локуса, содержащегося в политенизированных участках хромосом, можно обозначать с помощью понятия «полигенотип» [12, 13], которое характеризует аллельный состав локуса, число хромосом и число хроматид, несущих каждого из аллелей. В рассматриваемой модельной ситуации полигенотип маркерного локуса в клетках, содержащих оба аллеля, можно обозначить как F_4S_4 .

Согласно предложенной гипотезе, перешедшая к эмбриогенезу клетка освобождается от избытка хроматина путем диминуции, происходящей равновероятно для всех копий целых хроматид или аллельных участков этих хроматид. Полученные нами ранее данные позволяют предположить, что во вступающей в эмбриогенез клетке перед её первым делением происходят процессы перекреста и обмена участками хроматид политенизированных районов. Это означает, что участок хроматиды, принадлежащий одной хромосоме, может замещаться аналогичным участком хроматиды, принадлежащим другой хромосоме. На такую возможность указывает специфика рекомбинационного процесса у сахарной свеклы, резко отличающая её от других видов растений и заключающаяся в экстремальной локализации точек рекомбинации [14].

Учитывая принятые допущения, можно рассчитать частоты генотипов в агамоспермном потомстве гетерозиготного растения по формулам, описывающим комбинаторные процессы и предложенным Дж. Холдейном [15]. Следует еще раз подчеркнуть, что на частоту фенотипических классов в агамоспермном потомстве могут оказывать влияние два комбинаторных процесса, первый из которых обусловлен расхождением хромосом в мейозе, а второй – равновероятной диминуцией хроматид или их отдельных участков из вступающей в эмбриогенез клетки. В приведенном выше примере первый комбинаторный процесс дал яйцеклетки со следующими относительными частотами генотипов $1FF : 4FS : 1SS$, что можно выразить в виде следующей

суммы частот: $0.166FF + 0.668FS + 0.166SS$. Второй комбинаторный процесс, который может повлиять на соотношение фенотипических классов, связан лишь с яйцеклетками, несущими оба аллеля маркерного локуса и имеющими полигенотип F_4S_4 . Из таких клеток в результате диминуции избыточных копий аллелей возможно образование трех типов клеток в следующих относительных долях: $3/14 FF : 8/14 FS : 3/14 SS$, что можно выразить в виде следующей суммы частот $0.214 FF + 0.572 FS + 0.214 SS$. Значение $3/14$ получается, например, при делении числа сочетаний из 4 по 2 (т.е. 6), на число сочетаний из 8 по 2 (т.е. на 28). При вычислении частоты клеток с генотипом FS число сочетаний из 4 по 1 (т.е. 4) умножается на такое же число сочетаний из 4 по 1, и полученное произведение делится на число сочетаний из 8 по 2 (т.е. на 28). Сведя оба выражения в одно, получаем:

$$\begin{aligned} & 0.166FF + 0.668FS + 0.166SS = \\ & = 0.166FF + 0.668(0.214FF + 0.572FS + 0.214SS) + 0.166SS = \\ & = (0.166FF + 0.668 \times 0.214 FF) + 0.668 \times 0.572 FS + (0.668 \times 0.214 SS + \\ & 0.166SS) = 0.309FF + 0.382FS + 0.309SS. \end{aligned}$$

Приведенные расчеты показывают, что определенная часть яйцеклеток, содержащих оба аллеля, после диминуции дает зародыши, которые пополняют классы гомозигот.

Таким образом, совокупность политении, комбинаторного процесса и диминуции приводит к существенному уменьшению доли гетерозиготного класса в агамоспермном потомстве. Такого снижения доли гетерозигот не предполагает ни одна известная модель, используемая для описания агамоспермии.

Экспериментальное подтверждение подобных теоретических расчетов могло бы служить генетическим доказательством не только факта политении хромосом, но и существования еще одного комбинаторного процесса, принимающего участие в формировании полиморфизма агамоспермного потомства. Полученные совместно с С.С. Кирикович предварительные данные свидетельствуют о том, что такой механизм возникновения полиморфизма в агамоспермном потомстве вполне реален.

Работа финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009-2011 гг.

Литература

1. *Levites E.V.* Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants. – Sugar Tech. – 2005. – V. 7, № 2–3. – P. 67–70.
2. *Levites E.V.* Marker enzyme phenotype ratios in agamosperous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants. – on-line: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027> – 2007.
3. *Жимухев И.Ф.* Политенные хромосомы: Морфология и структура. – Новосибирск: Наука. – 1992. – 480 с.
4. *Ashburner M.* Function and structure of polytene chromosomes during insect development. – Adv. Insect. Physiol. – 1970. – Vol. 1. – С. 1-95.

5. *D'Amato, F.* Role of polyploidy in reproductive organs and tissues. – In B.M. Johri [ed.], Embryology of angiosperms. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. – 1984. – P. 518–566.

6. *Cionini P.G., Cavallini A., Corsi R., Fogl, M.* Comparison of homologous polytene chromosome in *Phaseolus cocineus* embryo suspensor cells: morphological, autoradiographical and cytophotometric analyses. – Chromosoma. – 1982. – Vol. 86. – P. 383–396.

7. *Carvalho G.* Plant polytene chromosomes. – Genet. Mol. Biol. – 2000. – V. 23, № 4. – P. 1043–1050.

8. *Mericle L.W., Mericle R.P.* Nuclear DNA complement in young proembryos of barley. – Mutat. Res. – 1970. – Vol. 10, № 10. – P.508–518.

9. *Акифьев А.П., Гришанин А.К., Дегтярев С.В.* Диминуции хроматина, сопровождающиеся реорганизацией молекулярной структуры генома: эволюционные аспекты. – Генетика. – 1998. – Т.34, № 6. – с. 709–718.

10. *Морозова Е.М.* Дополнительная ядерная ДНК в клетках зародышевых мешков *Haemanthus albidiflos* и *Ornithogalum caudatum*. – Известия РАН. Сер. биол. – 2002. – №2. – С. 192–195.

11. *Малецкий С.И., Малецкая Е.И.* Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). – Генетика. – 1996. – Т.32. №12. – С. 1643–1650.

12. *Левитес Е.В.* Эндоредупликация как фактор изменчивости в половых и агамоспермных потомствах растений. – «Биология развития: морфогенез репродуктивных структур и роль соматических, стволовых клеток в онтогенезе и эволюции» (Матер. междунар. конф., Санкт-Петербург, 2010). – Москва: Товарищество научных изданий КМК. – 2010. – С. 77–80.

13. *Levites E.V., Kirikovich S.S.* Autosegregation of enzyme loci *Me1* and *Gpi2* in agamosperous progenies of triploid sugarbeet plants. On line: –<http://precedings.nature.com/documents/5464/version/1/files/npre20105464-1.pdf> – 2010.

14. *Halldén C., Hjerdin A., Rading I.M., et al.* A high density RFLP linkage map of sugar beet. – Genome. – 1996. – Vol. 39, № 4. – P. 634–45.

15. *Haldane J.B.S.* Theoretical genetics of autopolyploids. – J. Genet. – 1930. – V. 22, № 3. – P. 359–372.

Резюме

Теоретические расчеты показывают, что на полиморфизм в агамоспермных потомствах может оказывать влияние диминуция избыточных копий хроматид или их отдельных участков из политенизированных хромосом яйцеклеток, вступивших в эмбриогенез. Расчет показал, что диминуция приводит к значительному сокращению доли гетерозигот в агамоспермном потомстве.

The theoretical calculations demonstrate that diminution of whole chromatids or parts of polytene chromosome chromatids of eggs which have entered in embryogenesis influences on the polymorphism in the agamosperous progenies. It was shown that diminution leads to the significant reduction of the part of heterozygotes in the agamosperous progeny.

МАЛЕЦКИЙ С.И.

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

ВАВИЛОВСКИЙ ЗАКОН О ГОМОЛОГИЯХ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПРИЗНАКОВ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*BETA VULGARIS L.*)

Н.И. Вавилов определил селекцию как *эволюцию, направляемой волей человека*, вводя, таким образом, селекцию в круг ноосферных дисциплин. «Без сочетания эволюционного и генетического подходов Вавилов не мыслил себе успешное изучение сортов растений и пород животных. По этому пути он пошел одним из первых генетиков мира. ... Все его крупные теоретические построения – закон гомологических рядов, учение о центрах происхождения культурных растений, учение об исходном потенциале селекции, теория иммунитета – были построены на основе синтеза теории эволюции и генетики» [1, с. 217]. Закон о гомологической изменчивости гласит: «виды и роды, генетически близкие, характеризуются сходными рядами наследственной изменчивости с такой правильностью, что, *зная ряд форм в пределах одного вида, можно предвидеть нахождение параллельных форм у других видов и родов*. Чем ближе генетически расположены в одной системе роды и линеоны, тем полнее сходство в рядах их изменчивости» [2, с. 35].

Открытие закона о параллельной изменчивости не было спонтанным событием – о параллельной изменчивости писали в XIX в. многие биологи – Ж. Сент-Илер, Ч. Дарвин и др. Любищев (1982) отмечал: «Н.И. Вавилову принадлежит бесспорная заслуга, что он не просто извлек из забвения старое положение Дарвина, но сделал крупный шаг вперед по пути познания одной из глубоких закономерностей, лежащих в основе формообразования организмов. ... В этом же направлении двигалась мысль нашего выдающегося ученого Л.С. Берга (1922), палеонтолога Д.Н. Соболева (1924), и гистолога А.А. Заварзина (1923). ... Общим выводом их было то, что *морфологические закономерности, существование которых вынужден был допускать Дарвин, играют в эволюции органического мира несравненно большую роль, чем это принимает ортодоксальный дарвинизм*» [3, с. 249–250].

В основу закона Вавилова положен морфогенез растений. Знаменитый харьковский палеонтолог Д.Н. Соболев по этому поводу писал: «В основе биогенеза лежит не случай, но закон. Законности, которые характеризуют ход биогенеза, не могут быть объяснены простым накоплением или подбором неупорядоченных и лишенных какой-либо тенденции случайно-полезных для вида уклонений (мутаций). Их нельзя объяснить отбором, производимым исключительно лишь борьбой за существование и ведущим к чисто пассивному приспособлению к условиям существования. *Процессы*

морфогенеза упорядочены, строго закономерны и при том тенденциозны» [4, с.176].

Как и Вавилов, многие современные ему биологи подчеркивали значимость морфогенеза для понимания закономерностей эволюции. Взгляды русских биологов эволюционистов на природу изменчивости не соответствуют представлениям Дарвина и его последователей, считающих, что биоэволюция покоится исключительно на неопределенной изменчивости (мутациях) и естественном отборе. Положения теории Дарвина о движущих силах эволюции сохранились в почти неизменном виде и поныне, и закон Вавилова для современной эволюционной биологии оказался как бы инородным телом.

В момент своего появления этот закон вызвал большое оживление (энтузиазм) среди биологов, ибо по своему значению он сравним с открытием Д.И. Менделеевым Периодической системы химических элементов. В дальнейшем энтузиазм в отношении гомологического закона в научном сообществе ослаб, и было констатировано: «Это направление в науке сейчас, можно сказать, еле теплится (даже в мировой литературе)» [3, с. 250]. «И позже, когда имя Вавилова было возвращено в список классиков, а его работа многократно переиздана, положение мало изменилось: большинство наших палеонтологов и эволюционистов не знает, что с этими рядами делать» [5, с.20]. Объяснение этому «взрывному» энтузиазму и сменившему его скептицизму в отношении закона о гомологиях Вавилова дал Любищев, отметивший, что *открытие Вавилова не имеет никаких разумных оснований в рамках дарвиновской парадигмы эволюции*. Он пишет: «Закон гомологических рядов является только началом выяснения номологического компонента эволюции ... и для сколько-нибудь полного понимания требует весьма радикального пересмотра наших общебиологических воззрений» ([3, с. 251-252].

Взгляды Дарвина на природу наследственной изменчивости существенно модифицированы в рамках синтетической теории эволюции (СТЭ). СТЭ – это не только самое значительное теоретическое обобщение эволюционной биологии XX века, но на ее идеях строятся практические схемы селекционного улучшения растений, так как СТЭ признается теоретическим фундаментом для селекции. Согласно СТЭ изменчивость определяется в основном двумя, хотя и разными по сути, но при всем том случайными факторами – *хаотическими мутациями и естественным отбором*, и не включают феномены параллельной изменчивости. «Примеры параллелизмов обнаруживаются в признаках, истолковать приспособительное значение которых с позиции естественного отбора (дарвинизма) крайне трудно. С данными трудностями не справились и сторонники СТЭ, отводившие параллелизму в изменчивости, как правило, роль второстепенных факторов. ... Они изменчивость ..., связанную с изменениями среды либо с самопроизвольными мутациями, четко увязывают с действием естественного отбо-

ра, игнорируя при этом в своей интерпретации многочисленные факты параллельной изменчивости» [6, с. 251-252].

В настоящем сообщении рассмотрено различие в понимании наследственной природы репродуктивных признаков у видов рода *Beta* в рамках вавилонской концепции изменчивости и в рамках менделевской парадигмы наследственности и СТЭ.

Менделизм и селекция. Основные методы в селекции растений – гибридизация (внутри- или межвидовая) и искусственный отбор. Креативный вклад менделизма (генетики) в теорию наследственности состоял в разработке методов гибридологического анализа, учитывающего сегрегацию маркерных признаков на основе правил наследования, открытых в середине XIX в. Г. Менделем. В начале XX в. правила Менделя были переоткрыты, и новое направление биологии (менделизм) получило необычайно мощное развитие. *Менделевский подход к наследованию рассматривает организм (растение) как структуру, составленную из мозаики признаков (фенов), контролируемых одним, двумя или большим числом генов (наследственных факторов).* Менделеевская парадигма устанавливает, по сути, линейную зависимость между генами и признаками. Это нашло, в частности, отражение в исторической череде уточняющих концепций о взаимоотношениях ген – признак: «один ген – один признак», «один ген – один фермент», «один ген – один полипептид», «один ген – одна нуклеотидная последовательность» и т.п. Линейные представления о соотношении функции генов и контролируемых ими признаков позволили осуществить локализацию генов в хромосомах (хромосомная теория наследственности) и рассматривать вопрос о числе генов в геномах растений, которые равны либо числу идентифицируемых признаков, либо меньше, если два или большее их число, контролируют один признак.

В свете сложной природы наследственности у высших растений соотношение «ген-признак», скорее всего, не должны описываться только линейными отношениями. Разнообразии признаков растений, с которыми сталкиваются в селекционно-генетических исследованиях, весьма велико и их условно делят на «дискретные» (прерывные) и «континуальные» (непрерывные). Дискретные признаки, в свою очередь, распадаются на *альтернативные* и *счетные* [7]. Вклад менделизма в теорию селекции состоял в том, что в ряде случаев удается оценить вклад единичных генов или их ансамблей в наследование отдельных (альтернативных) признаков. Другую группу составляют *континуальные* признаки, к числу которых относят все или почти все линейные, поверхностные или объемные (весовые) признаки растений, получаемые путем измерений. Селекцию интересуют именно континуальные признаки, для которых установить соответствие признаков с активностью отдельных генов или определенного их числа трудно или даже невозможно. В рамках менделевской парадигмы постулируется, что *континуальные* признаки контролируются большим числом генов, и пото-

му их сегрегация в ряду поколений носит сложный (полифакториальный) характер и описывается уже не в частотах гено- и фенотипов, как при сегрегации альтернативных признаков, а на языке математической статистики.

Репродуктивные признаки растений. У растений отдельную группу составляют репродуктивные признаки, определяющие их видовой статус, многие из которых положены в основу их систематики. Впервые классификацию растительных форм выполнил шведский натуралист К. Линней в первой половине XVIII в., основываясь на признаках цветков [8]. Репродуктивная биология – базовый раздел, на который опирается и современная теория селекции растений. Репродуктивные свойства определяют потенциал семенной продуктивности любого вида, а способ возникновения семян целиком определяет схему ведения материала в селекционном процессе. Эта группа признаков особенно сложна, так как связана с реализацией множества частных программ развития.

Выделим феномен внутрипопуляционной изменчивости растений по способу репродукции семян (зиготический или апозиготический)¹. Зиготическая репродукция реализуется в результате само–или перекрестного оплодотворения. Апозиготическая же реализуется через партеногенетическое развитие эмбрионов либо из клеток зародышевого мешка (гаметофитная агамоспермия), либо из соматических клеток семяпочек (спорофитная агамоспермия – нуцеллярная или интегументальная). Растение одного вида используют один или другой способ репродукции семян, или одновременно оба способа [9, 10].

Сценарные картины формирования признака «семенная продуктивность» определяется тем, что репродукции семян предшествуют процессы дифференцировки клеток, дающих начало морфогенетическому процессу развития и созревания цветочных структур. В цветках формируются зрелые мега- и микроспоры и происходят такие события как: перенос пыльцы внутри цветка или на другие цветки растения, рост пыльцевых трубок в тканях столбика, двойное оплодотворение или партеногенез, эмбриогенез семян и пр. Сценарный ход цито- и морфофизиологических процессов при зиготическом и апозиготическом способах репродукции семян в основном одинаков и лишь на заключительных этапах развития структур цветка происходит переключение с одного сценария на другой. Говоря другими словами, происходит *переключение с одной программы на другую (в точке бифуркации), которую осуществляют эпигены, или так называемые гены пе-*

¹ Термины «апомиксис», «агамоспермия» и «апозиготия» синонимичные и обозначают получение семян без пыльцевого (отцовского) генома. В тексте эти термины используются в зависимости от контекста: апомиксис (введен в научную лексику в 1906 г. Winkler H.) указывает на отсутствие смешения двух зародышевых плазм; агамоспермия (введен в 1923 г. Tjäckholm G.) указывает на образование семян без оплодотворения; апозиготия (введен в 1967 г. С.С. Хохловым) – новое семя развилась не из зиготической клетки зародышевого мешка.

реключатели («*swith genes*»), меняющие тем самым эпигенотип клеток и самого растения.

Два способа репродукции семян у сахарной свеклы. Сказанное проиллюстрируем примером получения семян у свеклы, рассмотрев представления о ее репродуктивной системе в историко-эволюционном контексте. Известно, что растения *Beta vulgaris* L. формируют на цветоносах огромное число обоеполоых цветков и им присущ исключительно зиготический способ семенной репродукции: доминирует перекрестное оплодотворение с переносом ветром пыльцы от цветков одного растения на цветки других растений, а самооплодотворение предотвращается системой генов самонесовместимости [11, 12]. На основе этих представлений строятся все схемы селекционного улучшения сахарной свеклы.

Между тем растениям *Beta vulgaris* L. одновременно с зиготическим присущ и апозиготический способ репродукции семян. Впервые об этом сообщил сотрудник Н.И. Вавилова – Н.В. Фаворский (1928), описав образование нуцеллярных зародышей в цветочных семяпочках свеклы [13]. Это сообщение долгое время оставалось в литературе единственным и лишь спустя довольно долгое время появились публикации, подтверждающие наблюдения Фаворского [14-16]. Все публикации по апозиготическому способу репродукции семян у свёклы в 1970-1990-гг. выполнялись исключительно советскими биологами, и в этих публикациях проводилась мысль, что: «апомиксис у сахарной свёклы выражен слабо и носит случайный характер» [17, с. 505]. Авторы большинства публикаций описывают спорофитный тип агамоспермии у свеклы и рассматривают его в качестве примера, когда семена являются клонами материнского растения. Подобный тип репродукции семян, по мнению многих авторов, имеет большое значение для селекции, открывая прямую возможность закрепления эффекта гетерозиса у простых гибридов [16, 17]. Представление об агамоспермии как о семенном клонировании распространено не только в публикациях по сахарной свекле, но и в публикациях по другим видам растений [18, 19].

Нами показано, что, наряду со спорофитной, у сахарной свеклы реализуется и гаметофитная агамоспермия (партеногенетическое развитие семян) [20, 21]. В этом случае семена возникают непосредственно из клеток зародышевого мешка (яйцеклеток), которые формируются в мегаспорах (продукты мейоза), и в апозиготических потомствах наблюдается сегрегация по любым маркерным признакам – *гаметная автосегрегация* [21–23]. Партеногенетический эмбриогенез происходит без участия пыльцевого генома, и он ничем не отличается от аналогичного процесса при развитии семени из зиготической клетки. С генетической точки зрения семена, получаемые при гаметофитной агамоспермии, неотличимы от семян, получаемых путем самооплодотворения. Был сделан вывод, что гаметофитная агамоспермия у свеклы – это один механизмов *инбридинга*, приводящий к гомозиготизации генома (42,8% генов за одно поколение репродукции) [20].

Уровень семенной продуктивности отдельных растений при агамоспермии ничем не отличается от такового при гамоспермном способе семенной репродукции [24].

Агамоспермия в роде *Beta*. Н.И. Вавилов полагал, что генетически близкие виды и роды характеризуются параллельными рядами изменчивости и это правило обладает предсказательной (номогенетической) силой, позволяя выявлять у новых видов, родов и семейств неизвестные, но предсказуемые фенотипы, ранее обнаруженные у их родственников. Для демонстрации своего закона Н.И. Вавилов описал ряды параллельной изменчивости у злаков семейства Poaceae, исследуя у них такие морфологические признаки как остистость и опушенность стеблей и колосьев, их окраску, а также окраску кожуры семян и пр. Он пишет: «состав признаков, различающий формы ржи, когда он был вскрыт полностью, оказался до деталей напоминающим расы и разновидности пшеницы» [2, с.18-19].

Закон гомологической изменчивости Вавилова универсален и распространяется на репродуктивные признаки растений. Существование агамоспермного способа репродукции семян у культурных образцов *Beta vulgaris* L. однозначно вытекает из представлений о параллельной изменчивости, так как дикие виды рода *Beta* секции *Corollinae* репродуцируют семена исключительно агамоспермным способом. К их числу относятся *B. corolliflora* ($2n = 18$), *B. trygina* ($2n = 54$), *B. intermedia* ($2n = 36$), *B. lomatogona* ($2n = 36$) [25].

Обнаружение у диких видов рода *Beta* (*B. trygina*, *B. lomatogona*) агамоспермного способа репродукции семян стимулировало перенос этого признака от диких видов в культурную свеклу [26–28]. Это направление экспериментальных исследований полностью соответствует менделевской парадигме наследственности: если искомый признак (мутацию) нельзя обнаружить у культурного растения, но этот признак есть у дикого сородича, то через гибридизацию и последующую трансгрессию желаемый признак (мутация) можно передать от дикаря к культурному виду. Как показала полувекровая практика, перенос признака агамоспермии от диких сородичей к культурным видам оказывается неуспешным. С теоретической точки зрения цель подобных экспериментов неясна, так как непонятно, что же собственно надо переносить от одного вида в другой (какую мутацию или какую-то часть генома). Неудача при переносе признака «агамоспермия» относится не только к отдаленным скрещиваниям в роде *Beta*, но и к скрещиваниям у других видов растений, где производились подобные отдаленные скрещивания по переносу признака «агамоспермия» [18]. Между тем поиск признака «агамоспермия» у культурной свеклы оказался успешным в силу гомологической (параллельной) природы изменчивости в пределах рода *Beta*.

Одноростковость посевных единиц свеклы. Гомология в апозиготическом способе репродукции семян в роде *Beta* оказался не единственным

примером успешного приложения в селекции закона о гомологиях Вавилова. Более ранним стало обнаружение у культурной свеклы растений с одиночными цветками на цветоносах, которые первоначально были обнаружены у диких видов рода *Beta*. Этот признак в популяциях культурной (много-ростковой) свеклы как будто бы не встречался, а спонтанные исследования в этом направлении были неуспешными [29]. Начало планомерных работ по этой тематике в Советском Союзе было осуществлено в 1934 г. в ходе выполнения приказа по Наркомату пищевой промышленности СССР (приказ подготовлен по инициативе президента ВАСХНИЛ Н.И. Вавилова) и подписан знаменитым сталинским наркомом А. И. Микояном (личное сообщение М.Г. Бордонос в 1988 г.). Согласно приказу, сотрудникам подведомственных учреждений вменялось: осуществить на свекловичных плантациях поиск растений с одиночными цветками на цветоносах. К этому времени уже было известно, что растения с одиночными цветками на цветоносах (раздельноцветковые или РЦ растения) встречаются среди дикорастущих видов *Beta* (*B. pattelaris*, *B. procumbens*, *B. webbiana*, *B. lomatogona*) (Роик, 2010). Сорты сахарной свеклы, возделываемые в то время в производстве, были представлены исключительно растениями со сросшимися цветками, для которых характерно срастание 3-5 цветков в одно соцветие-клубочек. «В 1934 г. сотрудниками ВНИС ... было организовано массовое обследование семенных плантаций с целью выявления растений с одиночно сидящими цветками на цветоносах. Всего было просмотрены растения на площади **1023 га**. В результате этого обследования было найдено 109 растений, у которых доли одиночных плодов на растениях варьировали от 10 до 90%» [29, с. 251).

На базе найденных растений было показано, что РЦ признак рецессивный и наследуется по моногибридной схеме [30]. Выделенные в 1934 г. РЦ растения, послужили в дальнейшем основой для создания однострочковых сортов свеклы в СССР и однострочковых гибридов в других свеклосеющих странах [29]. Перенос же РЦ признака от диких видов в культурную свеклу до сих пор не дал результатов [29]. Исследования украинских биологов-селекционеров 1930–1950 гг. привели к созданию первых однострочковых сортов и гибридов свеклы в СССР, что позволило осуществить технологическую революцию в свекловодстве, сократив затраты ручного труда при выращивании фабричной свеклы примерно в 40-50 раз, и в начале 1960-х гг. авторы этой работы была удостоена Ленинской премии. В настоящее время все посевные площади во всех свеклосеющих странах заняты исключительно однострочковыми сортами и гибридами свеклы.

Морфологические признаки и фрактальная геометрия. Эпигенез – это возникновение новых структур в процессе роста и развития растения, начиная с первого деления зиготической (или апозиготической) клетки и заканчивая образованием нового поколения спор и гамет. Процесс эпигенеза не может быть линейным, описываемый языком эвклидовой геометрии.

Описанию морфоэпигенеза более соответствует лексика фрактальной геометрии. «Для морфологического описания и получения количественных характеристик биологических систем различных уровней организации, от молекул до экосистем, все шире применяется язык фрактальной геометрии, дающий возможность корректного и сжатого описания структур и процессов, не доступного для традиционного используемого в биологии языка евклидовой геометрии» [31, с. 199].

Наследственность в ходе роста и развития растений реализуется через системы морфогенетических и морфофизиологических процессов. Как известно, общепринятой теории морфогенеза растений в целом или его частей не существует. Справедливо утверждение, что «геном и морфогенез — сущности совершенно разного порядка. ... Морфогенез — это разворачивающаяся 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» [32, с. 25].

Если менделизм *представляет организм структурой со статичной мозаикой признаков, то эпигенетика представляет организм в виде растущего фрактала*, важнейшее свойство которого — масштабная инвариантность или внутреннее самоподобие частей растения. Фрактальная динамика развития — это рост морфогенетических структур в ряду последовательных (итерационных) клеточных делений, в ходе которых отдельные его части обретают свое конечное структурное состояние. Фрактальное представление морфогенеза предполагает синтез двух процессуальных состояний — *динамичности и статистичности*, что соответствует нелинейности процессов роста и развития растений и достижению ими некоторых конечных состояний, определяемых как не случайными, так и случайными факторами. Формирование фрактальных структур в ходе морфогенеза основано на принципе обратной связи: конец одной итерации служит началом второй, конец второй итерации — началом третьей и т.д. Пример подобных итераций — непрерывность клеточных делений. Рост отдельных частей растений как фрактальных структур создает *итерационную изменчивость* по морфологическим признакам. Фрактальное строение цветочных и эмбрио структур представляется как непрерывное ветвление (почкование) морфологических структур цветка, что указывает на нелинейность (многовариантность) реализации зародышевого пути клеток растений от первой клетки, дающей начало эмбриону, до нового поколения гаметических клеток. Фрактальность в формировании морфологических структур растений (геометрический закон) хорошо вписывается в представление Вавилова о гомологической изменчивости растений, так как формирование сходных признаков у родственных видов в пределах рода или семейства должно описываться

одним и тем же фракталом («законом»). Фрактальность (самоподобие) можно наблюдать у самых разных морфологических структур растений: листьях, корнях, побегах, эмбрионах, плодах, семенах и пр.

Настоящая работа выполняется при поддержке Интеграционного гранта СО РАН №9 и гранта РФФИ 10-04-00697.

Литература

1. Мирзоян Э.Н. Н.И. Вавилов и теоретическая биология // Этюды по истории теоретической биологии. М.: Наука, 2006, с. 207–222.

2. Вавилов Н.И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Линнеевский вид как система Л.: Ленинградское отделение изд-ва Наука, 1967, 92 с.

3. Любищев А. А. Проблемы формы, систематики и эволюции организмов. М.: Наука, 1982, 280 с.

4. Соболев Д.Н. Начала исторической биогенетики. Симферополь: Гос. Изд. Украины, 1924. 204 с.

5. Чайковский Ю. В. Преобразование разнообразия. Эволюционная теория Сергея Мейена // Химия и жизнь. 1994, №1, с. 20–24.

6. Богатых Б. А. Фрактальные структуры живого и эволюционный процесс // Журнал общей биологии. 2006. Том 67, № 4, с. 243–255.

7. Малецкий С.И., Левитес Е.В., Батурин С.О., Юданова С.С. Репродуктивная биология покрытосеменных растений. Генетический словарь. Новоси.: ИЦиГ СО РАН, 2004. 160 с.

8. Жуковский П.М. Ботаника. М.: Колос, 1982, 624 с.

9. Asker S., Jerling L. Apomixis in Plants. CRC Press, Boca Raton, 1992. 298 p.

10. Richards A.J. Agamospermy // Plant breeding system. London: Allen and Unwin, 1997. P. 396–450.

11. Харечко-Савицкая Е.И. Цитология и эмбриология сахарной свеклы // Свекловодство. Т. 1. Киев: Госсельхозиздат, 1940. С. 453–550.

12. Зайковская Н.Э. Биология цветения, цитология и эмбриология сахарной свеклы // Биология и селекция сахарной свеклы. М.: Колос, 1968. С. 137–207.

13. Фаворский Н.В. Материалы по биологии и эмбриологии сахарной свеклы // Докл. ВАСХНИЛ. 1928. № 3. С. 3–11.

14. Зайковская Н.Э., Ярмолюк Г.И., Болелова З.А. Особенности апомиксиса у анеуплоидных форм сахарной свеклы // Докл. ВАСХНИЛ. 1978. № 9. С. 11–13.

15. Ярмолюк Г.И., Белогеордовская С.П., Балков И.Я. Апомиксис у сахарной свеклы // Апомиксис у растений: состояние проблемы и перспективы исследований: Тр. междунар. симпозиума. Саратов, 1994. С. 166–168.

16. Сеилова Л.Б. Апомиксис у сахарной свеклы и его использование в практической селекции: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Алматы, 1996. 44 с.

17. Богомолов М.А. Индуцированный апомиксис и использование его в селекции сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. // Энциклопедия рода: биология, генетика и селекция свёклы. Новосибирск: издательство «Сова», 2010, с. 504–513.

18. Петров Д.Ф. Апомиксис в природе и опыте. Новосибирск, 1988, Наука, СОАН. 214 с.

19. Koltunow A.M., Grossniklaus U. Apomixis: a developmental perspective // Annual Review of Plant Biology. 2003. Vol.54. P.547–574.

20. *Малецкий С.И.* Сцепленное и несцепленное наследование в партеногенетических потомствах растений // Генетика. 1997. Т. 33. № 10. С. 1333–1340.

21. *Малецкий С.И., Малецкая Е.И.* Самофертильность и агамоспермия у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 1996. Т. 32. № 12. С. 1643–1650.

22. *Малецкий С.И., Шкутник Т. и др.* Экспрессия аллелей локуса Mdh1 в апоzigотических потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Генетика. 2001. Т. 37. № 3. С. 344–349.

23. *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.

24. *Цильке Р.А., Позняк С.И., Малецкая Е.И., Юданова С.С., Малецкий С.И.* Завязываемость плодов у гибридов сахарной свеклы при апоzigотической репродукции в контрастных условиях выращивания // Вестник НГАУ, 2010. Т.5. №3. С. 19–25.

25. *Barocka K.H.* Die Section Corollinae der Gattung *Beta* (Tournef) L. // Z. Pflanzenzücht. 1966. Bd. 56. № 4. S. 379–388.

26. *Cleij G., Bock T.S.M.* Crosses between *Beta intermedia* Bunge and *Beta vulgaris* L. // Euphytica. 1968. V. 17. P. 11–20.

27. *Jassem B.* Embriologia tetraploidnych mieszanecow miedzy wielonasiennym burakiem cukrowym i *Beta lomatogona* F. et M. // Hod. Rosl. Akl. i Nas. 1969. T. 13. Z. 3. S. 245–255.

28. *Аранова Т.С.* О возможности апомиксиса у сахарной свеклы путём заимствования его элементов у диких видов // Генетика сахарной свеклы. Новосиби.: Наука СО, 1984. С. 171–177.

29. *Роук Н.В.* Создание однострочковых сортов и гибридов сахарной свёклы в Советском Союзе // Энциклопедия рода: биология, генетика и селекции свёклы. Новосибирск: издательство «Сова», 2010, с.249–8–264.

30. *Бордонос М.Г.* Характер расщепления и некоторые особенности свекловичных высадков с одноцветковыми семенами // Селекция и семеноводство. 1938. № 6. С. 24–27.

31. *Исаева ВВ.* Фрактальные и хаотичные паттерны в морфологии животных // Труды зоологического института РАН. Приложение №1, 2009, с. 199–218.

32. *Белоусов Л.В.* Морфогенез, морфомеханика и геном // Вестн. ВОГиС, 2009, Т. 13, №1, с. 29–35.

Резюме

Рассмотрены гомологии в роде *Beta* в свете закона гомологических рядов изменчивости растений Н.И. Вавилова. Гомологии в роде *Beta* охватывают такие репродуктивные признаки растений как число цветков в соцветиях и склонность растений к зиготической или апоzigотической форме семенной продуктивности. В статье обсуждается возможность использования идей фрактальной геометрии для представления закона Н.И. Вавилова о гомологиях.

A problem of homology in the genus *Beta* with relation to Vaviliv's law was examined. The homology in the genus *Beta* included such reproductive characters as a flower number in inflorescence and the tendency of plants into zygotic or apozygotic mode of seed reproduction. A possibility of the fractal geometry application for presentation Vaviliv's law was discussed in this paper.

МИХЕЕВ А.Н.

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

ИНЕРЦИОННОСТЬ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ И ИХ ФАКТОРЫ

Явление эволюции биологических объектов связано с их долговременными преобразованиями, т.е. способных наследоваться в ряду поколений. Эволюция – это и собственно эволюция как проявление относительно медленных, количественных, необратимых изменений, и революция, как проявление относительно быстрых, качественных, необратимых изменений биологических, социальных, биотехнических и автоматических систем (Савинов, 2010). В общем случае, для эволюционных процессов необходимы как внешние, так и внутренние факторы. Несколько изменяя определения Н.Н. Йорданского (2001) причинами филогенеза, или эволюционными факторами, будем считать любые явления, вызывающие случайные и закономерные необратимые (наследуемые) изменения биологических систем, а механизмами филогенеза – способы действия и взаимодействия этих факторов. О системном подходе к описанию факторов эволюции и о ее возможных механизмах с позиций системологии мы писали ранее (см. Михеев, 2004). В этой статье мы уделим основное внимание факторам с точки зрения их возможных долговременных (наследуемых) эффектов.

Развитие систем (изменение) вообще и биологических в частности является неизбежным при изменении внешних и внутренних условий их существования. Будем рассматривать такой процесс развития системы, при котором она не теряет своей индивидуальности, т.е. не дезинтегрируется на составляющие ее элементы. Непротиворечиво (нетавтологично) понятие «развитие» определить невозможно, поскольку оно принадлежит к фундаментальным понятиям науки. Тем не менее, следует сказать, что его главным содержательным компонентом является представление, с одной стороны, о соотношении роли случайности и закономерности (направленности) в развитии, а, с другой – о соотношении внешних и внутренних факторов.

Каким образом, вернее, под влиянием чего происходят такого рода изменения? Во-первых, это происходит под влиянием внутренних (эндогенных) факторов, обуславливающих спонтанный мутагенез, кроссинговер, эпимутации, онтогенетические структурно-функциональные модификации и, во-вторых, под влиянием внешних (экзогенных) факторов, также обуславливающих сходные изменения по сходным механизмам. Действие указанных факторов складывается из элементов случайности (вероятностных, трудно прогнозируемых) и элементов необходимости (предсказуемости, направленности, канализованности, детерминированности). Другими словами, с позиций теории филогенеза детерминация эволюционных (вкуне с

революционными) преобразований происходит под влиянием внешних и внутренних факторов, каждый из которых может проявлять себя как закономерный (однозначно, направленно), так и случайно (стохастично). Таким образом, следует говорить о возможных четырех слагаемых механизма изменчивости (одного из слагаемых эволюционного процесса), два из которых представлены внешними и внутренними случайными изменениями, а два – внешними и внутренними закономерными (см. таблицы 1 и 2). В соответствии с приведенной классификацией должны классифицироваться и существующие эволюционные теории (гипотезы), ни одна из которых, взятая в отдельности, не описывает полностью эволюционного процесса.

Таблица 1.

Классификация действия факторов, детерминирующих эволюционногенную изменчивость

Внешние влияния (проявление экзогенеза)		Внутренние влияния (проявление автогенеза)	
Случайные (селектогенез, СТЭ)	Закономерные (направленные) (ламаркизм, номогенез)	Случайные (селектогенез, СТЭ)	Закономерные (номогенез, ламаркизм)

Таблица 2.

Классификация типов влияния факторов по степени направленности их действия

Ненаправленное (случайное) влияние (селектогенез, СТЭ)		Направленное (закономерное) влияние (ортогенез)	
Внешних факторов	Внутренних факторов	Внешних факторов	Внутренних факторов

Например, селектогенез указывает на определяющую роль поиска эволюционных решений методом проб и ошибок, т.е. на отбор адекватных вариантов, возникших в результате неопределенной изменчивости, которой синтетическая теория эволюции (СТЭ) также отводит доминирующую роль, но при этом не учитывается вклад внутренних факторов.

Вероятно, в эволюции вклад указанных механизмов меняется в разных условиях, при действии разных по своей природе факторов, уровня их интеграции. В частности, возможно возрастание доли направленности (канализованности) по мере увеличения степени организованности действующего фактора. Доля определенной (направленной) изменчивости может увеличиваться в экстремальных условиях (Михеев, 2004; Михеев, Гродзинский, 2007). Не следует также забывать, что биологические системы способны к спонтанной («эндогенной») эволюции, при которой их генетическая адаптация происходит к собственной, т.е. внутренней среде. Фактически, речь в данном случае идет о самоорганизационном аспекте эволюционном процесса, который парадоксальным образом недостаточно учитывается в эволюционистике. Другими словами, направленность эволюции биологичес-

ких систем под влиянием эндогенных факторов следует рассматривать как проявление их структурно-функциональной «самосборки».

Если говорить об эволюционных изменениях биологических объектов, то роль случайности более-менее освещена в селектогенетических представлениях (например, в классическом дарвинизме и СТЭ), роль же закономерности, при всей очевидности ее значения, учитывается недостаточно. Закономерность в развитии феноменологически проявляется в его преемственности (направленности, наследуемости, номогенетичности, ортогенетичности), т.е. в детерминированной внешними и/или внутренними факторами (Раутиан, 1988). С нашей точки зрения, понятия преемственность и наследственность являются синонимичными, и в дальнейшем мы их будем употреблять как равноценные.

Как сказано выше, случайными как, и закономерными могут быть не только внешние, но и внутренние факторы. Учет этого обстоятельства является очень важным при построении общей теории филогенеза, поскольку до сих пор случайные факторы преимущественно отождествлялись с внешними и не учитывался возможный внутренний источник случайных воздействий, которые особенно важны, например, в случае спонтанной нестабильности ДНК.

Благодаря преемственности ряд состояний системы связывается (объединяется) в единый процесс развития, в котором система, постоянно изменяясь, тем не менее, сохраняет свою индивидуальность. Количественные и качественные характеристики системы при этом хоть и меняются, но система остается «узнаваемой» на всем пути своего развития. Сказанное в равной мере относится как к постепенному (эволюционному), так и к скачкообразному (революционному) развитию. Очевидно, что преемственность, как феномен, обеспечивается определенными механизмом преемственности, обуславливающим непрерывность процесса развития и, вообще, движения систем.

С понятием развития тесно связаны понятия причины и следствия. В процессе развития постоянно наблюдается временное отставание последствий (следствий) от вызывающей ее причины. Влияние прошлого на будущее не заканчивается мгновенно. Иначе говоря, влияние прошлого (причины) на будущее (следствие) продолжается какое-то время, т.е. наблюдается инерционность реагирования, которую можно рассматривать в качестве обобщенного представления о наследственности (наследуемости). Инерция – это развитие следствия во времени. Поскольку следствие развивается (изменяется), то у этого развития должны быть не только первичные, но и вторичные (промежуточные) причины. Следовательно, причина также развивается, трансформируясь из первичной во вторичную, третичную и т.д. Преемственность — *мера причинной зависимости (неслучайности) последующих состояний объекта* развития от предыдущих. Она связывает те и другие в единый процесс развития, придавая ему свойство го-

меорезиса – определенной упорядоченности, канализованности, направленности и устойчивости (по терминологии К.Х. Уоддингтона). *Всякое развитие направлено, по крайней мере, по причине ограничений, накладываемых преемственностью* на пространство потенциальных возможностей его осуществления. *Чем сильнее преемственность*, 1) тем слабее каждое последующее состояние будет отличаться от предыдущего; 2) тем более градуальным будет данный процесс развития; 3) тем выше, в соответствие с принципом П. Кюри (новизна вызывает *диссимметризацию структуры причин по отношению к структурам возможных альтернативных следствий*) будет симметрия между структурами причин и следствий (Раутиан, 2006).

Наличие более или менее постепенного переходного процесса (динамичности) придает развивающейся системе свойство инерции и известной градуальности преобразований. Инерция в общем случае понимается как *отставание* (запаздывание) *следствия от вызывающей (производящей) его причины*. В биологии особенно важен *гистерезис* — *особый случай инерции, при котором величина запаздывания следствия практически не зависит* (точнее, этой зависимостью можно пренебречь) *от скорости процесса*. Системы с гистерезисом наделены памятью, которая обеспечивает долгосрочную преемственность состояний субъекта развития.

Запаздывание следствия от вызывающей его причины в общем случае является необходимым условием действия принципа причинности. Последовательная смена состояний динамической системы (например, смена адаптивных норм) в результате переходного процесса, обусловленная инерционностью, с необходимостью наделяют ее *собственным внутренним временем*. Иными словами, *все и только динамические системы подчиняются принципу причинности, а инерционность и наличие собственного внутреннего времени являются ее атрибутами*. Таким образом, Л.Г.Ф. Додерлайн, автор инерционной трактовки филогенеза (по Раутиан, 2006) и его последователи были в принципе правы. Хотя Додерлайновский закон инерции представляет собой простую констатацию того факта, что *процесс филогенеза может быть реконструирован лишь постольку, поскольку его предшествующие* (более древние) *стадии развития преемственны* (а, следовательно, инерционно и причинно) *связаны с последующими* (более поздними), но он все же позволил. О.Абелю довести эти представления до уровня широкого общеприкладного обобщения под названием «закон инерции органического развития», или «биологического закона инерции». Его можно назвать законом Додерлайна-Абеля. Этот закон оказывается логическим следствием *инерционной интерпретации наследственности*, (частного случая преемственности), независимо предложенной К.В. фон Нэгелем и К.А. Тимирязевым.

Биологические объекты, вероятно, непрерывно стремятся к оптимизации своих отношений с внутренней (о чем упоминалось выше) и вне-

шной средой (в пределах экониши, разумеется). Происходит это по инерции движения в «эволюционном канале» (Буровский, 2004). Разумеется, нас интересует, прежде всего, генетическая инерция как способность популяции приводить в равновесие свою генетическую структуру и противостоять внезапным изменениям условиям внешней среды (Жученко, 1980). Можно было бы назвать это явление просто генетической устойчивостью популяции, порог которой надо какому-либо фактору преодолеть, чтобы «произвести» новый вид. Так, по мнению Г.Х. Шапошникова (1977) адаптивная направленность эволюции определяется типом структурно-функциональной организации биологического объекта, т. е. потенциальными возможностями развития эволюционирующей системы, и той средой, т.е. теми условиями, в которых эти потенции реализуются в процессе естественного отбора. Совершенно правильно отмечается роль внешних и внутренних факторов, задающих рамки (каналы) эволюционного развития. Если под понятием «адаптивная направленность» понимать и эволюционно дезадаптивные процессы, то, фактически, оно становится синонимом понятия «эволюция». Более того, говоря именно о направленности адаптивной, мы указываем на элемент телеономичности (детерминация будущими) в объяснение эволюционных процессов. На самом деле, он имеет место, но все же под направленностью эволюционной чаще всего понимают (Мейен, 1975) структурно-функциональную канализованность эволюционных преобразований, которые могут или не могут в дальнейшем иметь адаптивное значение. Другими словами в последнем случае имеет место классическая детерминация, т.е. детерминация прошлым.

По мнению М.Д. Голубовского (1985) ведущим фактором в возникновении наследственной изменчивости в природных популяциях является взаимодействие компонентов биоценоза. Одним из доноров и акцепторов генетического материала в природных популяциях являются вирусы. С нашей точки зрения все это важно и интересно, но мы хотели бы обратить внимание на еще одно важное обстоятельство. Мы уже не раз отмечали факт существования иерархически организованной системы филогенетических факторов, но пока не пытались определить какова роль каждого из уровней и насколько значимо влияние высокоорганизованных факторов, которые, фактически, не являются собственно факторами, а представляют собой один из компонентов коэволюционирующих систем. Высокоразвитая (высокоуровневая) система, кроме всего прочего, характеризуется и высокоразвитым окружением, вне пределов которого она попросту не могла бы существовать. «Высокоразвитое окружение» системы есть ничто иное, как совокупность таких же равноуровневых или близких или несколько более организованных систем. В любом случае всегда существует определенная «разница потенциалов», т.е. разница уровней (в значении степеней) развития равноуровневых в структурно-функциональном отношении систем. Эта разница обуславливает приобретение более развитой (на конкрет-

ный момент времени) системой активности, превращающей ее в систему-фактор (СФ). Именно к действию СФ как раз и приспосабливается система-объект (СФ). В качестве примера можно привести филогенетические взаимоотношения хищника и жертвы, первый из которых (пять же на определенном этапе) является более развитым не только в физическом отношении, но и в ментальном (интеллектуальном). При этом, чем организованнее СФ, тем более организованным (информативным, направленным) будет его влияние на СО. Следует постулировать, что наибольшее влияние на СО оказывает СФ равного или более высокого чем СО уровня организации. Разумеется, доза СФ не должна быть «летальной» для СО, иначе произойдет либо стойкое ингибирование последней, либо понижение уровня ее организации, либо полная ее элиминация.

Литература

1. Буровский А.М. Экстремальные ситуации и мыслящее вещество // http://www.humans.ru/humans/29675/h_print_view_t
2. Голубовский М.Д. Организация генотипа и формы наследственной изменчивости эукариот. В кн.: Молекулярные механизмы генетических процессов: Молекулярная генетика, эволюция и молекулярно-генетические основы селекции. – М.: Наука, 1985, с. 146 – 162.
3. Жученко А.А. Экологическая генетика культурных растений (адаптация, рекомбиногенез, агробиоценоз). – Кишнев: Штиинца, 1980. – 588
4. Иорданский Н.Н. Эволюция жизни. – М.: Academia, 2001 – 432 с.),
5. Мейен С.В. Проблема направленности в эволюции // Итоги науки и техники. Зоология позвоночных. Том. 7. Проблемы теории эволюции. – М.: ВИНТИ, 1975. – с. 66-117.
6. Михеев А.Н. Системные характеристики филогенетических факторов и объектов. – В кн.: Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр., Т. 2. – К.: КВІЦ, 2004. – 416 с. (с. 37 – 41).
7. 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
8. Раутиан А.С. Палеонтология как источник сведений о закономерностях и факторах эволюции. – В кн.: Современная палеонтология: В 2-х томах. – М.: Недра, 1988, – Т. 2. – с. 76-78.
9. Раутиан А.С. Букет законов эволюции. – В кн.: Эволюция биосферы и биоразнообразия. К 70-летию А.Ю.Розанова. М.: КМК, 2006. С. 20-38.
10. Савинов А.Б. Диалектический эволюционизм в теории развития жизни (к 120-летию со дня рождения А.А. Любищева) // XXIV Любищевские чтения. Современные проблемы экологии и эволюции. – Ульяновск: УлГПУ, 2010, с. 179-169.
11. Шапошников Г.Х. Направленность эволюции // ЖОБ., 1977, т. 38, № 5, с. 649-655.

Резюме

Рассмотрены эволюционные факторы с точки зрения их возможных долговременных эффектов. Детерминация эволюционных преобразований происходит под влиянием внешних и внутренних факторов, каждый из которых может проявлять

себя как закономерно, так и случайно. Наличие более или менее постепенного переходного процесса придает эволюционирующей системе свойство инерции и постепенности преобразований.

Розглянуті еволюційні чинники з точки зору їх можливих довготривалих ефектів. Детермінація еволюційних перетворень відбувається під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників, кожен з яких може проявляти себе як закономірно, так і випадково. Наявність більш менш поступового перехідного процесу додає еволюційній системі властивість інерції і поступовості перетворень.

The evolutionary factors are considered from point of their possible of long duration effects. The determination of evolutionary transformations takes place under influence of external and internal factors, each of which can prove both appropriately and by randomly. The presence of more or less gradual transient process gives the evolving system property of inertia and gradualness of transformations.

ПОСКРЯКОВ А.В., ГАЙФУЛЛИНА Л.Р., САЛТЫКОВА Е.С.

*Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
Россия, 450054, Уфа, пр-т Октября, 71, e-mail:possash@yandex.ru*

РОЛЬ КРИТИЧЕСКИХ ПЕРИОДОВ ОНТОГЕНЕЗА У КОМНАТНОЙ МУХИ В ПРОЯВЛЕНИИ ЭФФЕКТА ТРАНСГЕНЕРАЦИИ ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

Темпы эволюционного развития насекомых оказались настолько высокими, что почти 90% современных видов животных принадлежит этому классу. Большой успех насекомых обусловлен многими факторами, в том числе эффективными механизмами адаптации к неблагоприятным внешним условиям, включая развитие иммунной системы. Данные механизмы, способствуя биологическому прогрессу этой группы членистоногих, сами служили объектом для эволюционных преобразований. Значительную роль в данном процессе могут играть критические периоды онтогенеза насекомых. Очевидно, что общий принцип функционирования клеточных и гуморальных систем в морфогенетических процессах аналогичен определенным защитным реакциям насекомых. Насколько долговременна индуцированная реакция иммунных факторов было показано в ряде экспериментов.

Материалы и методы

3-х суточных личинок комнатной мухи родительского поколения Р отсаживали по 100 особей в стеклянные садки объемом 0,5дм³ на питательную среду, содержащую N-ацетил-D-глюкозамин (NAGA) в концентрации 0,001%. Питательную среду готовили путем добавления углевода в дистиллированную воду, на которой замешивали пшеничные отруби. В контроле особи помещались на среду, не содержащую N-ацетил-D-глюкозамин. Личинок содержали на указанной среде до окукливания и далее до вылета имаго. Последних пересаживали в садки из капронового сита 30x30x30

см. До достижения репродуктивного возраста (на 2 сутки) самок и самцов имаго рассаживались попарно в садки 10 x10x10 см по 60 пар в опытном и контрольном вариантах. Таким образом, получили 2 варианта имаго родительского поколения по 30 пар особей в каждом: чистый контроль; обработанные NAGA.

От разделенных таким образом чистых линий F1 получали поколение F2. Во всех вариантах поколений P, F1 и F2 измеряли активность каталазы, пероксидазы и дифенолоксидазы, а также определяли электрофоретическую подвижность молекулярных форм дифенолоксидазы. Во всех вариантах вели учет смертности, сроков развития и веса куколок.

Результаты и обсуждение

На основании полученных предварительных данных на насекомых с полным типом превращения в опытах с аскорбиновой кислотой, как регулятора фенолоксидазной и антиоксидантной активности, можно определить время перед линькой и сразу после линьки с одного личиночного возраста или с одной стадии развития на другое особо чувствительным или критическим периодом развития онтогенеза [1]. Редуцирующие (восстанавливающие) моносахара обладают высокой реакционной способностью и, попадая в организм насекомого, могут вносить изменения в метаболические процессы. В частности, предполагается, что данные сахара могут участвовать в процессе гликозилирования фенолоксидаз с образованием новых молекулярных форм ферментов задействованных в распознавании чужеродных агентов [2]. Исходя из данной точки зрения, моносахара рассматривались нами, как фактор, способный иницировать в организме насекомого аналог защитного ответа. Данный способ воздействия использовался нами для оценки продолжительности гуморального ответа в онтогенезе *M. domestica*, который в то же время лишен фактора патогенности. Полученные чистые линии 2-х вариантов характеризовались различной жизнеспособностью. В контроле число выживших особей в F1 составило 40%. В вариантах, поколение P которых развивалось в среде с добавлением NAGA количество жизнеспособных линий в F1 было, напротив, больше, чем в контроле – 64%. Сроки развития личинок и куколок мух в поколении F1 достоверно сокращались, а вес куколок повышался в линиях, поколение P которых выращивалось в среде, содержащей NAGA. На отдельных этапах онтогенеза поколений P и F1 отмечалось многократное превышение контрольных значений или достоверное повышение ($p > 0,95$) активности каталазы, пероксидазы и дифенолоксидазы при действии NAGA на поколение P.

В последующем поколении наблюдалось многократное увеличение активности каталазы на всех 3-х стадиях онтогенеза, пероксидазы – на стадиях личинки и куколки, а дифенолоксидазы – на куколочной стадии. По всей видимости, повышение активности ферментов антиокислительной и фенолоксидазной систем в двух последующих поколениях *M. domestica* и связаны отчасти с высоким уровнем метаболизма.

Кроме того, есть основания полагать, что действие NAGA на организм *M. domestica* имеет еще одну сторону. Многочисленные исследования позволяют считать, что фенолоксидазная система задействована не только на неспецифическом уровне защиты в стресс-реакциях насекомых, но и в механизмах, обеспечивающих высокую скорость иммунных реакций и специфичность распознавания патогенов [3]. С этой позиции можно предположить, что активация ферментов фенолоксидазной системы действием NAGA осуществляется посредством распознавания данного моносахарида определенными рецепторами на клеточных мембранах как компонента микробной клеточной стенки. Таким образом, NAGA может выполнять сигнальную функцию, запускающую иммунную реакцию в отсутствие патогена. В проведенном нами эксперименте активность дифенолоксидазы при действии на поколение P NAGA остается на индуцированном уровне в следующих двух поколениях комнатной мухи на одном из наиболее чувствительных этапов онтогенеза – куколочной стадии. Следовательно, действие NAGA на родительское поколение *M. domestica* может обуславливать повышение иммунного статуса насекомых в чистых линиях F1 и F2 данного варианта.

Заслуживает внимание и тот факт, что жизнеспособное поколение F2 получено именно в тех линиях, в которых действием NAGA в F1 достоверно или многократно повышена активность ферментов антиокислительной системы и дифенолоксидазы. Данное наблюдение еще раз подтверждает положительную зависимость жизнеспособности насекомых от уровня активности антиокислительной и фенолоксидазной систем. Значительное повышение уровня активности данных ферментов на последующих стадиях развития и в последующем поколении, скорее всего, происходит на транскрипционном и трансляционном уровнях, что подтверждается воспроизведением индуцированных действием NAGA новых дополнительных молекулярных форм фенолоксидазы в поколениях комнатной мухи. Необходимо подчеркнуть, что NAGA индуцируют у *M. domestica* различные молекулярные формы фенолоксидазы. Легкие же фракции с $Rf > 1$, индуцированные у поколения P действием NAGA, стабильно воспроизводятся в чистых линиях мух в двух последующих поколениях. Аналогичным образом, активность ферментов антиокислительной системы и дифенолоксидазы обнаруживает повышенный и индуцированный уровни при действии NAGA на поколение P в последующем поколении. В целом же, результаты проведенного исследования показывают возможность наследования индуцированных воздействием NAGA изменений защитных ферментативных систем в поколениях *M. domestica*.

В конце 2004 года в журнале Nature появилось сообщение швейцарских исследователей об открытии передачи приобретенного иммунитета у шмелей по наследству. Однако механизмы данного феномена им были неизвестны, как они предполагали в реализации его могут быть задейство-

ваны какие-либо ферменты. За последние десятилетия появилось много экспериментальных данных, не вписывающихся в классическую теорию наследственности и свидетельствующих в пользу выдвинутого когда-то Ж.Б.Ламарком принципа наследования приобретенных признаков [4; Стил и др., 5]. Зафиксированные нами изменения наблюдали в последующих поколениях на той стадии развития, на которой произошло воздействие фактором в родительском поколении, что может предполагать задействованность каких-либо эпигенетических механизмов. При этом без дополнительной стимуляции поддерживались в двух последующих поколениях мух физиологические и биохимические показатели. Интерпретация полученных нами данных не может ограничиваться отбором особей с повышенным уровнем активности расщепляемых ферментативных систем, с точки зрения вышеизложенных аспектов неоламаркистской концепции, полностью не исключена возможность наследования наблюдаемых изменений в защитных ферментативных системах.

Выводы

Индукцированная в критические периоды онтогенеза активность факторов гуморального иммунитета у личинок насекомых воспроизводится не только на последующих этапах онтогенеза, подтверждая наличие долговременного иммунитета, но также в последующих двух поколениях на той же стадии развития насекомого без дополнительного воздействия. При этом действие слабого раздражителя приводит к значительно более существенным физиологическим последствиям.

Литература

1. Беньковская Г.В., Салтыкова Е.С., Сухорукова О.С., Николенко А.Г. Метаболическая регуляция двух типов фенолоксидазной активности в онтогенезе комнатной мухи // Онтогенез. – 2006. – Т.37.- № 2.- С.142-148.
2. Салтыкова Е.С., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Сухорукова О.В., Николенко А.Г. Экспрессия фенолоксидазной системы при использовании хитоолигосахаридов в качестве иммуномодуляторов у насекомых // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2003. – Т. 39. – №4. – С. 346- 350.
3. Ratcliffe N. A., Brookman J. L., Rowley A. F. Activation of prophenoloxidase cascade and initiation of nodule formation in locusts by bacterial lipopolysaccharides // *Developmental and Comparative Immunology*. – 1991. – V. 15. – P. 33-39.
4. Чураев Р.Н. Об одной неканонической теории наследственности // Современные концепции эволюционной генетики. – Новосибирск: ИциГ СО РАН.- 2000. – С.22-32.
5. Стил Э., Линдли Р., Бланден Р. Что, если Ламарк прав? Иммуногенетика и эволюция. – М: Мир.- 2002. – 237 с.

Резюме

У насекомых имеются критические периоды онтогенеза которые находятся под определенным контролем иммунной системы и сопряжены с эпигенетической системой управления онтогенезом. Воздействие фактором в критические периоды онтогенеза насекомых оказывает влияние на биохимические защитные системы и может передаваться в ряду поколений без дополнительного воздействия.

In insects, there are critical periods of ontogeny that are under the control of certain immune system and are associated with epigenetic control system ontogeny. Impact factor in the critical periods of ontogenesis of insects affects the biochemical defense systems and can be transmitted in a series of generations without further exposure.

У комах є критичні періоди онтогенезу які знаходяться під певним контролем імунної системи і зв'язані з епігенетичною системою управління онтогенезом. Дія чинником в критичні періоди онтогенезу комах робить вплив на біохімічні захисні системи і може передаватися у ряді поколінь без додаткової дії.

ПРОНИНА О.В., ПЕТРАЧКОВА Т.А., ШЕПЕТА Ю.Б., РУШКОВСКИЙ С.Р.

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко,
Украина, 01601, Киев, ул. Владимирская 64, e-mail olpronina@gmail.com*

ВЛИЯНИЕ ПОТЕРИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА ПРОЦЕССЫ СТАРЕНИЯ В КОЛОНИЯХ ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются известной моделью для изучения возрастных изменений и механизмов регуляции продолжительности жизни [1,2]. Известно, что важную роль в процессах старения играют митохондрии и свободные радикалы, которые они генерируют [3, 4]. Таким образом, целью нашей работы было сравнение возрастных изменений, которые происходят в клеточных популяциях колоний ρ^+ (клетки, имеющие функциональные митохондрии) и ρ^0 (клетки, потерявшие митохондриальную ДНК, дефектные по отношению к митохондриальному дыханию) штаммов.

Материалы и методы

Работа проводилась на гаплоидном штамме дрожжей DLY640 *Saccharomyces cerevisiae* [5] и полученном от него ρ^0 клоне. Штамм DLY640 происходит от штамма W303 и имеет генотип: MAT a ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL+ psi+ ssd1-d2 RAD5.

Потерю митохондриальной ДНК подтверждали с помощью люминесцентной микроскопии (прижизненная окраска DAPI). Колонии культивировали на полной питательной среде YPD при температуре 28 °C. На протяжении периода наблюдения (45 суток) с периодичностью 5 суток из материала колоний делали цитологические препараты. Препараты анализировали на световом микроскопе МЛ2 и фотографировали фотоаппаратом Canon EOS 1000D. На полученных фотографиях с помощью программы ImageJ оценивали размеры клеток и количество клеток в скоплениях (характеристика пролиферативной активности культуры). Для оценки инвазивного роста колонии смывали с поверхности питательной среды струей воды и с помощью световой микроскопии регистрировали наличие проросших в питательную среду клеток.

Результаты и обсуждение

Старение ρho^+ колоний сопровождалось появлением вторичного роста (присутствия так называемых “бородавок” – вторичных колоний — на поверхности основной колонии [5]). Первые признаки вторичного роста на колониях наблюдались начиная с 15 суток эксперимента. При дальнейшем культивировании вторичный рост распространялся по поверхности исходной колонии (рис.1). На поверхности ρho^0 колоний появления вторичного роста зарегистрировано не было на протяжении всего периода наблюдения (45 суток).

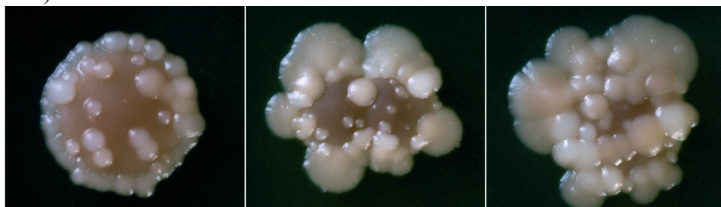


Рис.1. Вторичный рост на поверхности ρho^+ колоний

При анализе цитологических препаратов клеток колоний было выявлено что среди округлых одиночных клеток, типичных для стационарной фазы роста, встречаются почкующиеся клетки, при этом их доля говорит о активности процессов деления в популяции. По мере старения культуры увеличивается доля одиночных клеток, но в 35 дневных культурах ρho^+ колоний процент 2 и 3-х клеточных скоплений возрастает, что может быть признаком восстановления процессов размножения клеток, сопровождающих процессы образования вторичного роста. В колониях ρho^0 такая тенденция не наблюдается, что сочетается с фактом отсутствия вторичного роста колониях «петитов».

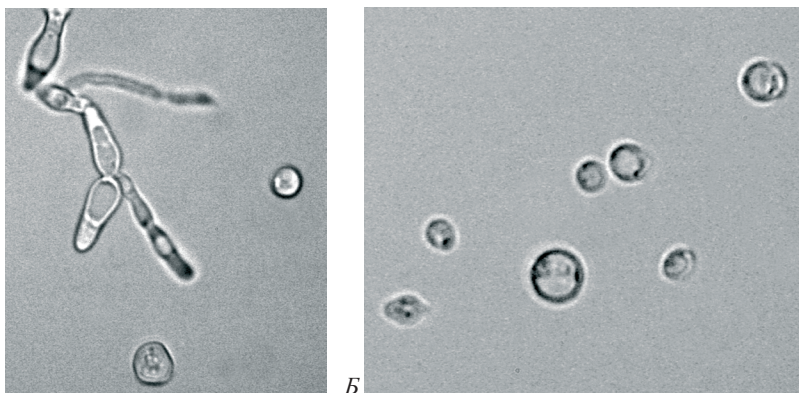


Рис.2. Псевдомицелиальный рост в 35 суточной колонии DLY640 (А, показан стрелкой) и типичные клетки 45 суточной колонии ρho^0 клона (Б).

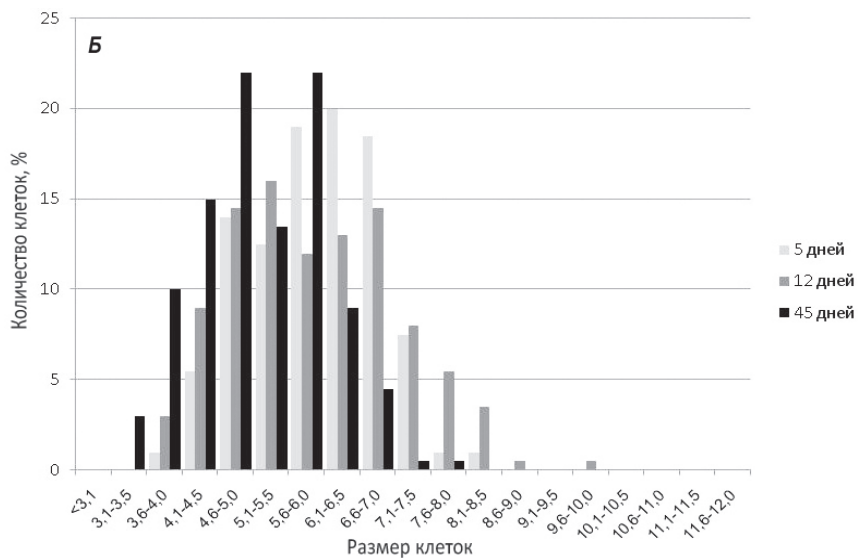
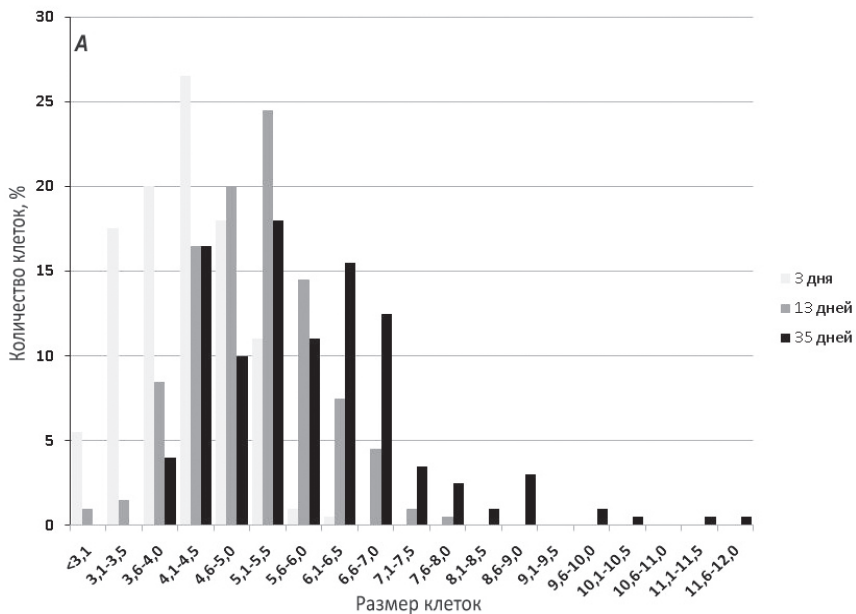


Рис.3. Распределение длин одиночных клеток в колониях штамма DLY640 (А) 5, 12 и 35 суток и выделенного из него ρ^0 клона.(Б) 5,12 и 45 суток

При смывании 35 суточных ρho^+ колоний была обнаружена инвазия их клеток в питательную среду. При микроскопии смывов инвазивных колоний в питательной среде в значительном количестве были обнаружены типичные клетки псевдомицелиального роста (рис. 2). Такие клетки были зарегистрированы также при смывах надповерхностной части старой колонии данного штамма. При смыве 45 суточных колоний ρho^0 клона инвазивный рост визуально не регистрировался. При микроскопии питательной среды, на которой росли колонии «петитов» зафиксировано небольшое количество инвазивных колоний, клетки которых имели типичную округлую дрожжевую форму. В суспензии клеток из ρho^0 колоний типичные клетки инвазивного роста также не регистрировались на протяжении всего периода культивирования (до 45 суток).

При анализе цитологических препаратов было показано, что для клеток стареющей культуры дрожжей характерный высокий уровень морфологической изменчивости: в суспензии присутствуют клетки неправильной формы со значительными деформациями, встречаются гигантские клетки. Для характеристики размера клеток в популяции был использован критерий длины клеток (максимальное измерение), при этом анализировались одиночные клетки, характерные для стационарной фазы роста и составляющие большую часть популяции стареющей колонии. При анализе распределений длины клеток дрожжевых колоний штамма DLY640 было выявлено что значение класса с максимальной частотой возрастает с увеличением возраста колонии, при этом увеличивается и максимально регистрируемый размер клеток. На поздних этапах старения колонии, сопровождающихся инвазивным ростом, возрастает доля клеток, длина которых значительно превышает средний размер клеток в популяции. При анализе клеточной популяции ρho^0 клона такие тенденции была выявлена обратная картина – возрастание доли мелких одиночных клеток, приводящее к снижению как средних, так и максимально регистрируемых размеров клеток.

Выводы

Таким образом, нами были выявлены ряд отличий в процессах, сопровождающих старение колоний дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, отличающихся наличием или отсутствием митохондриальной ДНК. Было показано что старение ρho^+ сопровождается возрастанием размера клеток, формированием вторичного роста на теле колонии и инвазией дрожжевых клеток в плотную питательную среду., Старение колоний ρho^0 клонов сопровождалось снижением размеров клеток, вторичный и инвазивный рост при этом не регистрировались.

Литература

1. *Madia F., Gattazzo C., Fabrizio P., Longo V. D.* A simple model system for age-dependent DNA damage and cancer // *Mechanisms of ageing and development.* – 2006. – Vol. 128. – P. 45 – 49. – Vol. 170. – P. 1423 – 1426.

2. Kaeberlein M., Burtner C., Kenned y B. Recent Developments in Yeast Aging // PloS Genetics. – 2007. – Vol. 3. – P. 655 – 660.

3. Nicole A. Doudican, Binwei Song, Gerald S. Shadel, Paul W. Doetsch. Oxidative DNA Damage Causes Mitochondrial Genomic Instability in *Saccharomyces cerevisiae* // Molecular and cellular biology. – 2005. – Vol. 25. – P. 5196 – 5204. .

4. Fabrizio P., Liou L.L., Moy V.N., Diaspro A. SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast // Genetics. – 2003. – Vol. 163. – P. 35 – 46.

5. Zubko MK, Guillard S, Lydall D Exo1 and Rad24 differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. Genetics 168: 103–115 - 2004

6. Никитина Е. Т. Вторичный рост у микроорганизмов. – Алматы, 2000. – 283с.

Резюме

Виявлені відмінності у складі клітинних популяцій ρ^+ та ρ^0 старіючих колоній дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. На відміну від ρ^+ клонів, у ρ^0 клітинних популяціях із зростанням віку розмір клітин зменшувався, інвазивний та вторинний ріст не реєструвався.

Обнаружены отличия в составе клеточных популяций ρ^+ и ρ^0 стареющих колоний штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В отличие от ρ^+ клонов, в ρ^0 клеточных популяциях размер клеток с возрастом уменьшался, образование вторичного роста и инвазии в питательную среду не регистрировался..

The difference between cell populations of ρ^+ and ρ^0 aging yeast *Saccharomyces cerevisiae* colonies was shown. Unlike ρ^+ clone in ρ^0 aging populations cells size decreased, the invasive growth and secondary growth didn't appear.

РАУТИАН М.С.

Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, 198504,
С-Петербург, Ораниенбургское ш.,2. e-mail: mrautian@mail.ru

КОЭВОЛЮЦИЯ ВНУТРИЯДЕРНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ HOLOSPORA И ИХ ХОЗЯЕВ, ИНFUЗОРИЙ РОДА PARAMESCIUM

Внутриклеточный симбиоз у инфузорий распространен чрезвычайно широко. По своей систематической принадлежности симбионты могут относиться к различным группам организмов – одноклеточным эукариотам, преимущественно – микроводорослям, бактериям, археям, вирусам. Разнообразие велико и с точки зрения локализации симбионтов, они могут оккупировать различные компартменты клетки-хозяина. Известны симбионты, специфически заселяющие цитоплазму хозяина, есть виды, ассоциированные с кортексом инфузорий, причем одни локализуются с внутренней, цитоплазматической стороны, тогда как другие связаны с внешней поверхностью клетки-хозяина. Ядро не является исключением: описано много внутриядерных симбионтов как в макронуклеусе (МА) так и в микронуклеусе (МИ) а также бактерии, обитающие в перинуклеарном пространстве обоих ядер (см. обзор Ossipov et al., 1998, наши данные). Наиболее изучен-

ными внутриядерными симбионтами инфузорий являются бактерии рода *Holospora* (Gromov, Ossipov, 1981; Fokin, Gortz, 2009). *Holospora* являются облигатными внутриядерными бактериями инфузорий рода *Paramecium*. Для бактерий симбиоз является облигатным, тогда как для инфузорий – факультативным, т.е. бактерий не удается культивировать вне клетки-хозяина, но парамеции могут существовать как с *Holospora* так и без них. По нашим многолетним наблюдениям около 4-6% природных популяций парамеций содержат *Holospora*. За исключением случаев гиперинфекции ядер, которые легко возникают при лабораторном культивировании инфицированных парамеций, но почти не встречаются в природных популяциях, симбионты не наносят вреда своим хозяевам. Некоторые инфицированные линии парамеций поддерживаются в нашей коллекции десятилетиями. В настоящее время описано 5 валидных видов голоспор, различающихся специфичностью по отношению к виду-хозяину, ядерной специфичностью, поскольку каждый вид стабильно поддерживается или в МА или в МИ и морфологическими особенностями (Ammann et al., 1991; Ваккерев-Коузова, Раутиан, 2011; Rautian, Wackerov-Kouzowa, in preparation). Отличительной чертой всех *Holospora* является их сложный жизненный цикл. Он включает репродуктивный этап, когда бактерии активно размножаются, делясь поперечными перегородками; постоянно некоторая часть репродуктивных форм симбионтов переходит к дифференцировке инфекционных форм бактерий, которые не способны делиться, но после деления ядра выводятся в окружающую среду и могут быть захвачены новыми потенциальными хозяевами и инфицировать специфическое ядро. Таким образом, *Holospora* передаются как вертикально в ряду клеточных поколений хозяина, так и горизонтально (см. обзоры: Осипов, 1981; Fokin, Gortz, 2009).

Вопросы, связанные с эволюцией внутриядерного симбиоза представляют огромный интерес. Прежде всего, непонятно, насколько близки разные виды голоспор, возможно они искусственно объединены в один род по конвергентным признакам. Такие предположения высказывались в литературе (Fokin Gortz, 2009). До наших работ была определена последовательность гена 16S рПНК только для одного вида голоспор, а косвенные данные авторы трактовали по-разному (Fokin et al., 1996; Раутиан, 2003). Другой важный вопрос связан с эволюцией специфичности в отношении хозяев и в отношении ядер. Четыре вида голоспор, представленные в нашей коллекции, дают возможность проследить в какой последовательности складывались элементы специфичности внутриядерных симбионтов. *Holospora obtusa* обитают исключительно в МА *Paramecium caudatum*, а *H. undulata* только в МИ этого же вида парамеций. Другой вид парамеций – *Paramecium bursaria* -, имеет свою пару симбионтов: в МА *H. curviuscula*, и в МИ *H. acuminata*. Реконструкция филогении симбионтов может дать ответ на вопрос: что возникает сначала – специфичность в отношении ядра, а затем приспособленные к определенному ядру симбионты эволюируют в на-

правлении видовой специфичности хозяина, или наоборот, сначала возникает видовая специфичность и лишь затем – ядерная.

Материалы и методы

В работе использованы четыре вида голоспор, охарактеризованные в Таблице 1.

Таблица 1.

Использованные в работе внутриядерные симбионты

Индекс изолята симбионта	Вид симбионта	Специфический хозяин	Специфическое ядро
T88i	Holospira obtusa	Paramecium caudatum	МА
06/R3-16	H.undulata	Paramecium caudatum	МИ
FS-5	H.curviuscula	Paramecium bursaria	МА
02/AZ16-1AZ	H.curviuscula	Paramecium bursaria	МА
KBI-10	H.acuminata	Paramecium bursaria	МИ

Аmplификация 16S рДНК

Тотальную ДНК, служившую матрицей для ПЦР, выделяли из очищенных в перколе (Percoll, Sigma) инфекционных форм симбионтов, как описано ранее (Тимофеева, Раутиан, 1997). Для амплификации использовали универсальные бактериальные праймеры fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and rP1 (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991), а также в некоторых реакциях вместо fd1 холоспороспецифичный праймер – RFI-607 (5' – CGGTAGAGGAAAGTGGAA – 3'). ПЦР проводили в объеме 50 мкл, реакционная смесь содержала 1-100пг ДНК, 5 мкл амплификационного буфера, 200 мкМ dNTP, 0,5 мкМ каждого праймера, 1.25 U *Taq* полимеразы (Сибэнзим). ПЦР проводили в термоциклере Mastercycler (Eppendorf), по следующей программе: 95°C 2 мин; 35 циклов 95°C, 30 с, 55 °C 30 с, 72 °C 1 мин и досинтез при 72 °C 7 мин.

ПЦР-продукт очищали с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов (Omniх, С-Петербург) и секвенировали в фирме Amber (С-Петербург). Для секвенирования использовали амплификационные праймеры, а также ряд промежуточных праймеров RFI-460 (CTCTGTGCCAGCAGCCGCGG), RFI-1110 (GATAAATCGGAGGAAGGAGAGG), RRI-760 (CGTCTAGCACTCATCGTTTAGGG), RRI-145 (GCGGTAATAGCCAAGGTTTC).

Были использованы последовательности из генбанка (BLASTN GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) для обработки и построения филогении использовали пакет программ MEGA 3.1 (Tamura et al., 2007). Филогению конструировали по методу NJ.

Результаты и обсуждение

Филогенетические отношения *Holospora*, реконструированные по последовательности 16S рДНК представлены на Рис.1. Полученные нами результаты показывают, что последовательности 16S рДНК всех четырех исследованных симбионтов различаются на 1,8 – 3,6%, что соответствует обычным для бактерий различиям между видами одного рода. Исследованные *Holospora* формируют компактную влзкородственную ветвь, рано отделившуюся от основного ствола Rickettsiales. Порядок ветвления внутри *Holospora* несомненно показывает, что первоначально возникла хозяйная специфичность, затем, внутри каждого вида –хозяйина независимо возникла ядерная специфичность. Из этого можно заключить, что механизмы ядерной специфичности или различны, или сформировались на базе предсуществовавших общих предпосылок, эволюционная реализация которых осуществилась в каждой ветви независимо.

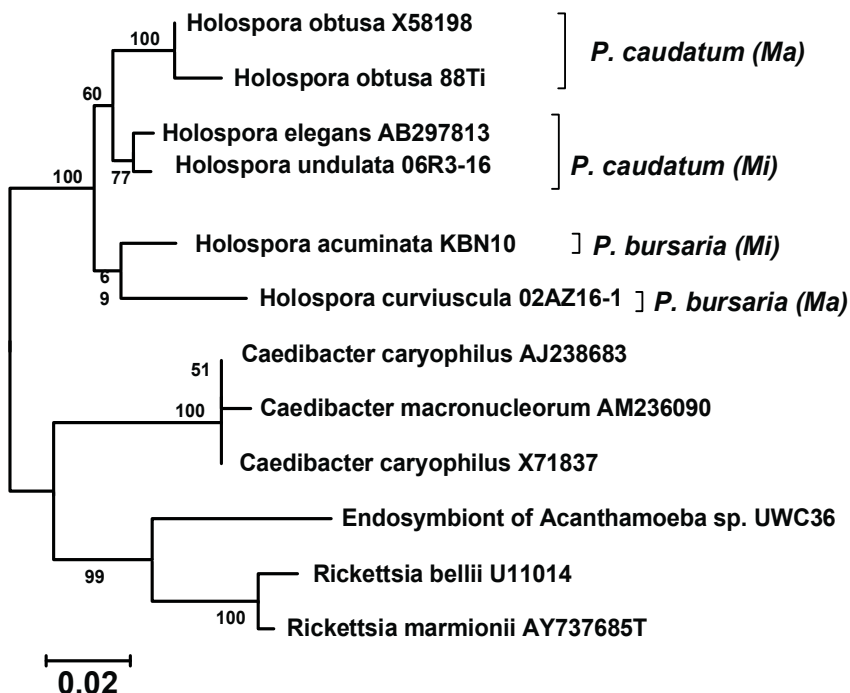


Рис.1. Филогенетические отношения *Holospora*

Литература

1. Amann R.I., Springer N., Ludwig W., Gortz H.-D., Shleifer K.H. Identification *in situ* and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts // Nature. 1991. № 351. P. 161-164.

2. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1994). J.G.Holt (ed). Baltimore: Williams and Wilkins Co.
3. *Осипов Д.В.* Проблемы гетероморфизма ядер у одноклеточных организмов. Л.: Наука. 1981. 167 с.
4. *Gromov B.V., Ossipov D.V.* *Holospora* (ex Hafkine 1890) nom. rev., a genus of bacteria inhabiting the nuclei of *Paramecia* // Int. J. Syst. Bacteriol. 1981. V. 31. № 3. P. 348-352.
5. *Ваккерров-Коузова, Раутиан.* Выделение и характеристика бактерий-симбионтов макронуклеусов инфузорий *Paramecium bursaria* и *Paramecium caudatum*. // Микробиология, 2011, в печати;
6. *Fokin SI, Brigge T, Brenner J, Görtz H-D* *Holospora* species infecting the nuclei of *Paramecium* appear to belong into two groups of bacteria. // Eur J Protistol (1996) 32 (Suppl1) : 19 – 24
7. *S. I. Fokin, H-D. Görtz.* Diversity of *Holospora* Bacteria in *Paramecium* and Their Characterization // In: M. Fujishima (ed.), Endosymbionts in *Paramecium*, Microbiology Monographs, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009. 12, 161p.
8. *Rautian, Wackerov-Kouzowa,* Validation of two earlier described intranuclear bacteria from ciliate *Paramecium bursaria* (Protozoa, Ciliophora) – *Holospora acuminata* and *Holospora curviuscula*. // J Syst. Bacter. In preparation
9. *Saitou N and Nei M* (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. // Molecular Biology and Evolution 4: 406-425
10. *Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // Mol. Biol. Evol. 2007. № 24. P. 1596-1599.
11. *Emelyanov V.V.* Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell // Eur. J. Biochem. 2003. № 270. P. 1599–1618.

Резюме

Методами молекулярной филогении исследованы четыре вида внутриядерных симбионтов парамеций. Показано, что все они могут быть отнесены к разным видам одного рода *Holospora*, который формирует ветвь, рано отходящую от ствола Rickettsiales. Порядок ветвления согласуется с представлением, что сначала возникла видовая специфичность симбионтов, а затем независимо в каждой ветви возникла ядерная специфичность симбионтов.

Four species of intranuclear symbiotic bacteria were studied by means of 16S rDNA phylogenetic analysis. Phylogenetic tree have been inferred. All species belong to the same genus *Holospora*, which forms a branch diverging early from Rickettsiales. The order of divergence supports the emergence of host specificity firstly followed by independent evolution of nuclear specificity in each branch.

РУБАН Ю.Д.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, Украина, 62341, Харьковская область, Дергачевский район, п/о Малая Даниловка

ПРИНЦИПЫ ЭВОЛЮЦИИ В СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКЕ

Современная селекция отличается комплексностью учитываемых признаков, среди которых важное место занимает эволюционный

принцип. Ч. Дарвин впервые на научной основе представил для науки и практики эволюцию животных, растений и человека [1]. В любой современной научной литературе по селекции животных рассматриваются общие указания по эволюции пород и типов, без которых невозможна сама оценка основных селекционных структур. Поэтому конкретизация показателей эволюционного процесса животных является важным и актуальным для науки и практики.

Материалом для исследования стали данные по изучению эволюции пород и типов крупного рогатого скота на протяжении длительного периода [2,3]. Методы исследования были экспериментальный и историко-аналитический с использованием данных палеонтологии, проведение комплексных исследований с учетом данных по экстерьеру и конституции животных, анатомических, физиологических и математических методов и приемов.

В результате длительных исследований, проведенных автором статьи, можно установить следующие приемы и методы, определяющие эволюционный процесс в селекционной практике:

1. В основе изучения и оценки эволюции пород и типов животных находятся макро- и микроэволюционные процессы, на основе которых можно установить конкретные методы и приемы для селекционной практики.

2. Определяющим в эволюционном процессе крупного рогатого скота за 220 млн лет млекопитающих стало приобретение сложного четырехкамерного желудка и переход от всеядности к растительнойядности животных. Отсюда возникает **первый** селекционный прием: определение степени эффективности использования животными питательных веществ кормов на продукцию.

3. В результате изучения эволюционного процесса и постоянного увеличения продуктивности животных резко изменилась конституция организма в сторону ее ослабления. Повышается продуктивность и ослабляется крепость конституции и ухудшаются защитные функции организма. Определяется **второй** важный селекционный прием: установление границ нормы и патологии. Еще 2 тыс. лет назад среднеазиатский врач и ученый Авиценна состояние человеческого организма определял шестью показателями. К сожалению, в современных условиях медицинской, ветеринарной и зоотехнической практики часто состояние организма оценивается двумя крайними состояниями: большой-здоровый. Тогда как существуют ряд переходных состояний, исходя даже из учения древних ученых.

4. Современная селекция ведет к неуклонному повышению продуктивности животных, что вполне оправдано. Но при этом следует учитывать **третий** селекционный прием: недопущения селекционного плато (предел), за пределами которого изменяются в худшую сторону показатели состояния организма, качества продукции, продолжительности использования животных. В этом случае показатели ослабленности организма, выражающиеся в резких изменениях конституции животных, являются сигнальными

ми для внесения в селекционные программы необходимых корректив. Тип и продуктивность, учет их в комплексе, являются препятствием для достижений негативных состояний организма.

5. Эволюционные изменения можно оценить при помощи соподчиненных показателей. Это **четвертый** селекционный прием: установление принципа симметрии и установление направленности селекционного процесса.

Длительный селекционный процесс в животноводстве ведет к глубокой специализации организма и направления продуктивности. Так, в молочно-мясном скотоводстве в большинстве стран разводятся или молочные, или мясные породы. Количество комбинированных пород (молочно-мясных) резко уменьшилось. Но это не значит, что вообще должна быть уничтожена комбинированная группа пород. Эти породы имеют ряд положительных качеств, которых нет (или в меньшем количестве) у пород специализированных: крепкая конституция, высокие качественные признаки и продолжительность хозяйственного использования. Поэтому установление симметричности признаков, в данном случае молока и мяса, дает возможность установить обоснованное направление продуктивности у животных. Существуют многие другие показатели, определяющие симметричность признаков.

6. В современной селекции в процессе эволюции пород возросло значение технологических признаков. Поэтому **пятым** селекционным приемом стал технологический отбор животных. Указанный отбор связан с оценкой формы вымени и интенсивности молокоотдачи в молочном скотоводстве, степенью использования кормов, живой массой, типом высшей нервной деятельности и другие показатели.

7. Животноводческая отрасль имеет прямое отношение к экологическим и социальным последствиям от применения селекционных методов. Действующие технологии производства продукции животноводства оказывают влияние на экологическое окружение, продукция, получаемая от животных, – на социальный статус человека. Отсюда **шестой** селекционный прием – связь селекционных методов и приемов (как составная часть технологического процесса) с экологией и здоровьем человека. В любом производстве, в том числе и животноводческом, это надо учитывать, что связано с эволюцией пород и изменениями в технологическом процессе.

8. Животноводство – отрасль биолого-технологическая, которая связана с организационно-зоотехническими методами и приемами. Изменения (эволюционные или другие) определяют седьмой селекционный прием: организация всей системы учета и других мероприятий в отрасли животноводства.

Выводы

1. В селекционной практике надо учитывать принципы эволюционного процесса, которые связаны с макро- и микроэволюцией пород и типов животных, а также с учетом контрольных мероприятий.

2. Определены следующие селекционные приемы, учитывающие эволюционные изменения: эффективность использования животными питательных веществ кормов на продукцию, установление границ нормы и патологии организмов, селекционное плато и его пределы, установление принципа симметрии признаков, технологические признаки, социально-экологические последствия от применения селекционных методов и приемов, организационно-зоотехнические методы и приемы.

3. Селекционный процесс в современных условиях ведения отрасли животноводства характеризуется сложным комплексом показателей, методов и приемов, которые позволяют учесть изменения за длительный или короткий периоды эволюционного процесса.

Литература

1. Рубан Ю.Д. Чарльз Дарвин и современная зооинженерия /Ю.Д.Рубан. – Киев: Аграрная наука, 2009. – 294 с.

2. Рубан Ю.Д. Происхождение крупного рогатого скота и селекционный процесс /Ю.Д.Рубан. – Киев: Аграрная наука, 2003. – 292 с.

3. Рубан Ю.Д. Породы, породообразовательный процесс и селекция животных /Ю.Д.Рубан. – Киев: Аграрная наука, 2006. – 380 с.

Резюме

В статье рассматриваются принципы эволюции в селекционной практике, которые включают макро- и микроэволюционные процессы пород и типов животных, а также учет контрольных мероприятий: использование питательных веществ, норма и патология, селекционное плато, симметрия признаков, технологические признаки, социально-экологические последствия от селекции, организационно-зоотехнические методы и приемы.

У статті розглядаються принципи еволюції в селекційній практиці, які включають макро- і мікроеволюційні процеси порід і типів тварин, а також облік контрольних заходів: використання поживних речовин, норма і патологія, селекційне плато, симетрія ознак, технологічні ознаки, соціально-екологічні наслідки від селекції, організаційно-зоотехнічні методи та прийоми.

In the article principal basic conditions in selection practice that contain macro – and microevolutionary processes of breeders and types animals and also calculation of control measures: use nutrients, standard and pathology, selection indexes, symmetry signs, technological signs, social – ecological consequences after selection, organization – zootechnical methods and ways have been considered

СЕМЕНОВА С. К.

*Институт биологии гена РАН, ул. Вавилова 34/5, 119334, Москва, Россия,
e-mail: seraphimas@mail.ru*

ЭВОЛЮЦИОННАЯ ГЕНОМИКА ТРЕМАТОД – ПАРАЗИТОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Структурная организация и эволюции генома представителей класса Трематод или Дигенетических сосальщиков (Trematoda), объединяющих

более 18000 видов (свыше 140 семейств) паразитов беспозвоночных и позвоночных животных, до сих пор остаются малоизученными. Трематоды отличаются от остальных червей наличием сложного жизненного цикла, связанного со сменой животных-хозяев и чередованием нескольких последовательных партеногенетических и одного гермафродитного поколения. В настоящее время расшифрованы полные последовательности ядерных геномов только двух представителей данного класса – возбудителей шистосоматоза человека *Schistosoma mansoni* и *S. japonicum*. Показано, что по сравнению с геномами других беспозвоночных они имеют относительно большой размер. Свыше трети генома этих трематод составляют повторяющиеся последовательности, представленные tandemными и рассеянными повторами, а также мобильными элементами – ретротранспозонами.

Основной целью исследования являлся поиск популяционных и видовых маркеров, пригодных для изучения структуры и эволюции генома на разных стадиях жизненного цикла возбудителей таких известных трематодозов человека и животных, как фасциолез и кожный дерматит, распространенных на территории России, Украины и Белоруссии. Для изучения вариабельности митохондриального и ядерного генома нескольких видов трематод, принадлежащих к двум семействам (Fasciolidae, Schistosomatidae), применялись современные методы молекулярной генетики, геномной инженерии (полимеразная цепная реакция со случайными и специфическими праймерами, клонирование и секвенирование) и биоинформатики.

Результаты и обсуждение

Метод мультилокусного RAPD-фингерпринтинга применяли для выявления генетической изменчивости партеногенетического потомства у представителей 9 семейств трематоды, объединенных на основании морфологии партенит в две группы: редиоидные (сем. Notocotylidae, Halipegidae, Echinostomatidae) и спороцистоидные (сем. Schistosomatidae, Strigeidae, Gorgoderidae, Vucephalidae, Diplostomatidae, Plagiorchiidae).

Показателем изменчивости трематод каждого вида/семейства являлось среднее значение доли полиморфных локусов, выявляемых при использовании одного праймера для церкарий из одной партениты (спороцисты или редии). Оказалось, что наибольшие значения этого показателя (24.5-29.4%) характерны для представителей четырех семейств спороцистоидных трематод: Schistosomatidae, Vucephalidae, Diplostomatidae, Plagiorchiidae. Для церкарий трематод из семейств Gorgoderidae и Strigeidae эти индексы оказались более низкими (17.8% и 7.5% соответственно). Несмотря на применение большого числа праймеров, в церкариальных пулах любых редий из семейств Notocotylidae, Halipegidae и Echinostomatidae зарегистрирована незначительная изменчивость, составившая 5.2-6.5%. При сравнении двух групп партенит оказалось, что уровень клональной изменчивости у спороцистоидных трематод (22.5%) почти в 4 раза выше, чем у редиоидных форм (6.2%), что отражает, по всей видимости, различия в их филогенезе [1].

На основании последовательности одного из клонированных RAPD-фрагментов *Trichobilharzia franki* (Сем. Schistosomatidae), имеющего гомологию с ретроэлементом Perere-10 генома *S. mansoni*, разработана новая молекулярно-диагностическая система для детекции трематод из рода *Trichobilharzia* (Schistosomatidae) на стадии промежуточного хозяина – моллюска [2].

Сем. Fasciolidae.

Используя полимеразную цепную реакцию со случайными праймерами (RAPD-PCR), проведен анализ генетической изменчивости печеночного сосальщика *Fasciola hepatica*, паразитирующего в печени крупного и мелкого рогатого скота Украины, Беларуси, России, Армении и Болгарии (N=98). Показано, что между различными географически изолированными популяциями на всем изученном ареале существует низкая, но достоверно-значимая дифференциация. Они группируются в три кластера, один из которых составляют различающиеся между собой украинская и белорусская популяции из западной части исследуемого ареала. Другую группу составляют три популяции из восточной части ареала и Кавказа: московская, мордовская и армянская, причем московская популяция достоверно отличается от армянской и мордовской. Обособленное положение занимает выборка фасциол из Болгарии, выделенных из печени одной коровы. Оценки внутривидовой изменчивости, а также структура дендрограмм и значение индексов подразделенности свидетельствуют об отсутствии четкой генетической дифференциации между выборками паразитов от разных животных-хозяев [3-5].

Для подтверждения видового статуса исследуемых выборок печеночных сосальщиков проведено секвенирование участка второго транскрибируемого спейсера ITS2 рДНК у представителей пяти популяций *F. hepatica* и трех популяций *F. gigantica*. Исследованные образцы *F. hepatica* из России, Беларуси, Украины, Армении и Туркмении не отличались от известных ранее последовательностей *F. hepatica* из Австралии, Испании, Венгрии, Новой Зеландии, и Уругвая. Исключение составляла одна особь из Армении, для которой найдена новая, неизвестная трансверсия. Принадлежность трех выборок из Туркменистана, Узбекистана и Таджикистана к виду *F. gigantica* также не вызывала сомнений [6].

Иная внутривидовая дифференциация обнаружена при выявлении полиморфизма двух мт генов *cox1* и *nad1* у 218 особей *F. hepatica* из России, Беларуси, Украины, Болгарии, Армении, Азербайджана, Грузии, Туркменистана, Узбекистана, Таджикистана, Турции и Китая. В изученных выборках найдено 28 митотипов, которые образуют три резко отличающиеся гаплогруппы или линии. Каждая из линий содержит основной, наиболее часто встречающийся митотип, а также ряд его производных. Митотипы *F. hepatica* из России, Беларуси и Украины входят как в состав I, так и II линии. Известные из литературных данных последовательности сосальщиков

из США и Уругвая принадлежат ко II линии, тогда как митотип фасциолы из Австралии является основным для линии I и встречается на всем изученном ареале. В Армении у фасциол найдены четыре последовательности, составляющие линию III, почти не связанную родством ни с одной из двух вышеуказанных линий. Интересно, что две основные, значительно дивергировавшие линии митотипов характерны как для популяций паразита, так и для возможных позвоночных хозяев, что объясняется, вероятно, процессом их длительной коэволюции. На основании распределения этих линий по изученному ареалу было высказано предположение об их независимом происхождении ~0.3-0.6 МYA (при скорости 1-2% нуклеотидных замен за 1 MY) [7, 8].

При изучении полиморфизма длинного (LNR) и короткого (SNR) некодирующих участков мтДНК у представителей *F. hepatica* из линий I и II показано, что амплификация LNR приводит к образованию набора из 9 фрагментов (гетероплазмия), различающихся между собой на длину известного тандемного повтора (85 п. н), описанного ранее в LNR австралийской фасциолы. Проведено клонирование и секвенирование амплификатов LNR разного размера. При сравнении нуклеотидных последовательностей LNR обнаружены 3 нуклеотидные замены, локализация которых совпадает в основных и вырожденных звеньях LNR, а также точковая гетероплазмия в первом положении вырожденного звена и четырех прилежащих к нему совершенных повторов. Частота появления мутаций в отдельных звеньях LNR составляет 4 – 4.7%, а частота гетероплазмичных сайтов варьирует от 0.1% до 1.2%. Показано, что постоянные указанные мутации могут изменять структуру и стабильность вторичных структур основного и вырожденно-го звеньев LNR. При амплификации SNR у *F. hepatica* из нескольких популяций выявлены фрагменты, структура которых отличалась от известной последовательности SNR *F. hepatica* из Австралии трансверсией t→g в положении 21. В составе обоих некодирующих участков выявлены несколько консервативных и потенциально регуляторных последовательностей [9].

Сем. Schistosomatidae.

Происхождение и расселение европейских видов птичьих шистосом из родов *Trichobilharzia*, *Bilharziella*, являющихся возбудителями кожного дерматита человека и переносимых различными видами утиных, до сих пор остаются невыясненными. Известно, что церкарии разных видов, обладая внешним морфологическим сходством, инвазируют широкий круг моллюсков из семейств Lymnaeidae (для *Trichobilharzia* spp.) и Planorbidae (для *Bilharziella polonica*). Относительно недавно для разделения европейских родов и видов шистосом был использован полиморфизм внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, а также гены 12S рPHK, 28S рPHK и *cox*.

На основании сравнения изменчивости ядерного (ITS2 рДНК) и митохондриального (*cox1*) генов птичьих шистосом группы *Trichobilharzia*

ocellata (класс Trematoda, сем. Schistosomatidae), паразитирующих на брюхоногих моллюсках озера Нарочь (Республика Беларусь). Показано, что в данном водоеме наряду с ранее известными для Европы видами *T. szidati*, *T. franki* и *T. regenti*, *B. polonica* найдены церкариальные изоляты нового неизвестного ранее вида шистосом, принадлежащего к роду *Trichobilharzia* и названного нами *Trichobilharzia sp. var narochanica* [10].

Кроме того, впервые для всех четырех исследованных видов продемонстрирована внутривидовая изменчивость митохондриального гена *cox1* у представителей рода *Trichobilharzia* и *Bilharziella*, который может оказаться весьма эффективным для “баркодинга” популяций птичьих шистосом. Как на основании нуклеотидных замен, так и на основании полиморфизма аминокислот среди рода *Trichobilharzia* можно выделить две группы изолятов, инфицирующих моллюсков *Lymnaea stagnalis* (*T. szidati*), и моллюсков из группы *Radix* (*T. franki*, *T. regenti*). Проведено сравнение полиморфизма митохондриального гена *cox1* птичьих шистосом, собранных из водоемов России (Москвы и Московской области) и Беларуси (оз. Нарочь). Показано, что для каждого из видов (*T. szidati*, *T. franki*, *T. narochanica*, *T. regenti* и *B. polonica*) характерна сложная филогеографическая дифференциация, отражающая особенности происхождения и расселения [11, 12].

Исследования проводились коллективом лаборатории организации генома ИБГ РАН (зав. лабораторией член-корр. РАН А. П. Рысков) при содействии сотрудников ЦПА РАН, ИСЭЖ СО РАН, ВИГИСа и частично финансировались из грантов РФФИ (09-04-01611а, 10-04-90060-Бел_а), НШ-2107.2008.4, ФЦП ГК № 02.740.11.0088, № П1043 и №16.740.11.0001.

Литература

1. Семенова С. К. и др. Мультилокусная изменчивость партеногенетического потомства церкарий трематод разных видов (класс Trematoda). – 2007. – ДАН. – 414(4) – С. 570-573.
2. Korsunen A. V. et al. The study of European *Trichobilharzia* schistosomes (*T. franki*, *T. szidati*, and *T. regenti*) based on the novel genome sequences. – 2010. – *Journal of Parasitology* (USA). – 96(4). – P. 802-806.
3. Семёнова С. К. и др. Анализ генетической изменчивости печёночного сосальщика *Fasciola hepatica* с помощью полимеразной цепной реакции со случайными праймерами. – 1995. – Генетика. – 31(2). – С. 273–275.
4. Морозова Е. В. и др. RAPD-изменчивость двух видов трематод (*F. hepatica* и *D. dendriticum*) из популяции крупного рогатого скота. – 2002. – Генетика. – 38(8). – С. 1155-1162.
5. Semyenova S. K. et al. RAPD variability and genetic diversity in two populations of liver fluke, *Fasciola hepatica*. – *Acta Parasitologica*. – 2003. – 48(2). – P. 125-130.
6. Semyenova S. K. et al. Polymorphism of internal transcribed spacer 2 (ITS-2) sequences and genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. – 2005. – *Acta Parasitologica*. – 50(3). – P. 240–243.
7. Морозова Е. В. и др. Полиморфизм ND1 и COI генов в популяциях печеночного сосальщика *Fasciola hepatica*. – 2004. – Генетика. – 40. – С. 817-820.

8. Semyenova S. K. et al. Genetic differentiation in Eastern European and Western Asian populations of liver fluke *Fasciola hepatica* as revealed by mitochondrial *nad1* and *cox1* genes. – 2006. – *Journal of Parasitology* (USA). – 92. – P. 523-530.

9. Корчагина Е. В. и др. Полиморфизм и структурные особенности двух некодирующих участков митохондриального генома печеночного сосальщика *Fasciola hepatica* (Plathelminthes, Trematoda). – 2009.- Мол. Биология. – 43(1). – С. 19-27.

10. Хрусанцова Г. Г. и др. Генетическая изменчивость птичьих шистосом (Класс Trematoda, сем. Schistosomatidae) озера Нарочь: идентификация нового вида в группе *Trichobilharzia ocellata*. – 2009. – ДАН. – 428(5). – С. 698-702.

11. Лопаткин А. А. и др. Полиморфизм гена *cox1* церкариальных изолятов птичьих шистосом (Класс Trematoda, сем. Schistosomatidae), собранных в водоемах Москвы и Московской области. – 2010. – Генетика. – 46(7). – С. 981–989.

12. Хрусанцова Г. Г. и др. Филогеография церкариальных изолятов птичьей шистосомы *Bilharziella polonica* (Класс Trematoda, сем. Schistosomatidae) из водоемов Беларуси. – 2011. – Генетика. – 47 (5).

Резюме

В работе обсуждаются особенности эволюции ядерных и митохондриальных генов возбудителей таких трематодозов человека и животных, как фасциолез (сем. Fasciolidae) и кожный дерматит (сем. Schistosomatidae), распространенных на территории России, Украины и Белоруссии.

In present assay we study the causative agents of fasciolosis (Family Fasciolidae) and human cercarial dermatitis (Family Schistosomatidae) obtained in Russia, Ukraine and Belorussia. The evolutionary peculiarities of nuclear and mitochondrial genes were discussed.

СЕМЧУК Л.И., РОМАШЕВ С.А., АНДРИЙЧУК Е. Н, ШЕВЧЕНКО Т.П.

ННЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Украина, 01033, г.Киев, ул. Владимирская, 64,
e-mail: Lidia_Semchuk@univ.kiev.ua

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ДИКИХ ТИПОВ ФАГОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, КАК НЕОБХОДИМЫЙ ЭТАП ПОНИМАНИЯ ЭВОЛЮЦИИ ИХ ГЕНОМОВ В ПРИРОДЕ

Фаги широко распространены во внешней среде. Согласно современным оценкам, они представляют собой самую большую группу биологических объектов на Земле. Их суммарное число составляет около 10^{31} частиц [1]. Такие высокие значения ставят вопрос об эволюционных процессах обеспечивающих их присутствие в природе и механизмах поддерживающих постоянное разнообразие.

В растительных биоценозах выявляют популяции фагов разных хозяев [2]. У вирулентных фагов жизненный цикл заканчивается лизисом хозяина. Для последующей репродукции им необходимы чувствительные бактерии. В случае их отсутствия, возникает необходимость адаптации к новому штамму. При этом серьезной проблемой является ограниченная емкость ге-

номов фагов. Обойти указанное затруднение они могут, используя ресурсы хозяина. Для фагов порядка *Caudovirales* основным механизмом эволюции считается предложенный D. Botstein,- модульный [3]. Согласно этой теории, в природе одновременно существует значительное разнообразие генотипов, представляющих собой различные комбинации генов. Они образуются при смешанной инфекции двух фагов внутри одной бактерии или при рекомбинации фага с профилами хозяина. В природе выживают только те гибриды, которые способны размножаться на присутствующих там штаммах. В таком случае, однако, возникает вопрос о том, насколько стабильны отдельные генотипы фагов и имеют ли они достаточно продолжительный срок присутствия в экосистемах. Необходимо подчеркнуть, что экология фагов фитопатогенных бактерий, циркулирующих в растительных экосистемах – одна из наименее изученных областей. В то же время, понимание таких процессов, представляется важным условием надежного прогнозирования поведения фагов, искусственно внесенных в растительные биоценозы, с целью ограничить в них численность патогенных бактерий. Они важны, также, для практики использования фагов, как мягких и специфических средств обеззараживания растений и их семян от бактериальных возбудителей инфекций.

Целью представленной работы было изучение и сравнение полевых фагов, чьи хозяева относятся к разным родам- *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Pseudomonas*. Фаги выделены в разных областях Украины с интервалом в несколько лет. Сравнение проводили методом ИФА, по полипептидному составу и путем рестрикционного анализа их ДНК

Материалы и методы

В исследованиях использовали четыре штамма фитопатогенных бактерий: *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola* IMV 7325, *Pseudomonas Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) IMV 216; *Pseudomonas syringae*: pv. *tabaci* IMV 223, *Pseudomonas* pv. *atrofaciens* IMV 1025. Они были получены из музея Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины (IMV). Фаги были выделены в нашей лаборатории из полевых растительных образцов, отобранных в разных областях Украины, в разные годы. В основу их названия положен номер штамма основного хозяина, после него использовано индивидуальное обозначение фага. Изучаемые фаги объединены в группы. Группа 223 включала фаги: 223-1/1, 223-17/1, 223-10/1, 223-14/1, подгруппа 7591(группа 223) – 7591-11/1, 7591-9/1, 7591-14/1; группа 7325: 7325/4, 7325/5, 7325-1/1, 7325-14/2, 7325-17/1; группа 216: 216V2, 216 KC; группа 1025-2, 1025-3, 1025-6, 1025-K.

В процессе работы фаги концентрировали при 50000 г, 2ч, после чего очищали в ступенчатом градиенте плотности хлористого цезия 1,4-1,6 г/см³ при 90000 г, 3 ч. После диализа против 0,1 М Трис-НСl, pH 7,2, их использовали в исследованиях.

Непрямой иммуноферментный анализ (ИФА) [4] проводили с использованием поликлональной сыворотки белых нелинейных мышей, иммунизированных очищенным фагом 223-17/1. Электрофорез белков фагов проводили в ПААГ, по Laemmli [5]. Рестрикционный анализ проводили по Маниатису [6].

Результаты и их обсуждение

Использование метода непрямого иммуноферментного анализа показало, что у всех анализируемых частиц присутствуют антигены, реагирующие с антителами иммунной сыворотки к фагу 223- 17/1. Их удельный вес у разных фагов – варьировал (рис.1).



Рис. 1. Выявление с помощью ИФА антигенов к антителам фага 223- 17/1 у вирусных разных хозяев

Интересно, что максимальное количество серологически родственных антигенов обнаружено у фагов, имеющих разных хозяев: 223- 14/1, 7325- 1/1, 7591- 11/1 и 216-V2. Можно было предположить, что они содержат одинаковые или подобные белки. Однако, сравнение их полипептидного состава, в системе Laemmli [5], не позволило выявить такой корреляции. Фаги по своему белковому составу оказались подобны строго внутри своих групп. Наиболее существенные отличия полипептидного состава выявляли у фагов группы 7325, объединяющих фаги равных семейств- *Siphoviridae* и *Podoviridae*.

Как видно из представленных на рис.2, профилей разделения белков фагов в 12% полиакриламидном геле, состав каждой из групп был подобен. Индивидуальные особенности внутри своих групп имели фаги *pv. tabaci* 223 и *pv. beticola* IMV 7325. Группа 7325 объединяла представителей двух морфотипов, что, ожидаемо, выявлялось в разнице их белкового состава. Наибольшая вариативность выявлялась в группе 223, где ряд представителей содержали дополнительные белки. Их трансляция нуждается в при-

сутствии участков геномов, длина которых должна коррелировать с количеством и молекулярной массой полипептидов (рис. 2).

Однако, рестрикционный анализ их ДНК не позволил подтвердить высказанный тезис. Фаги группы 223 имели высокую степень подобия профилей разделения фрагментов ДНК (рис. 3,4).

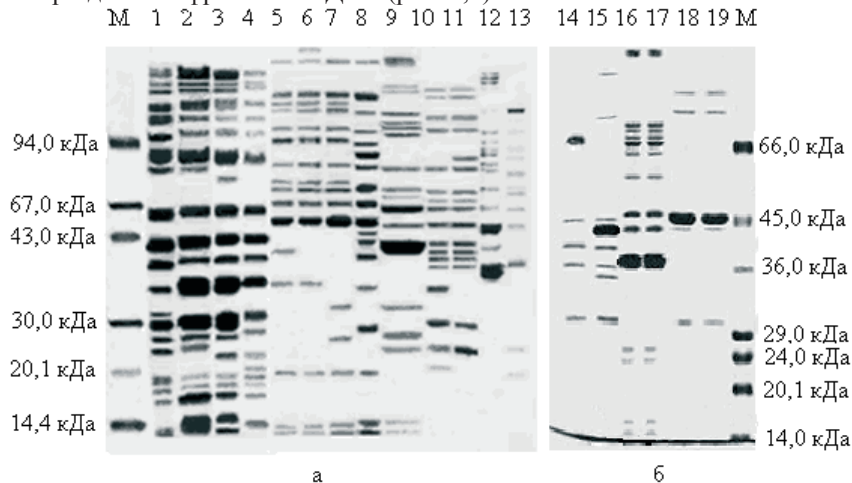


Рис. 2. Выявленные полипептиды различных групп фагов в системе Laemmli: а: 1– 7325- 10/1; 2– 7325- 14/2; 3– 7325- 17/1; 4 – 7325- 1/1; 5– 223- 17/1; 6– 223- 1/1; 7 –223- 10/1; 8 – 223- 14/1; 9 – 7591-14/1; 10 – 7591- 11/1; 11 – 7591- 9/1; 12 – 1025/6; 13 – 1025/к; б:14 –7325/4; 15 – 7325/5; 16 – 1025/2; 17 – 1025/3; 18 – 216- V2; 19 – 216-КС.

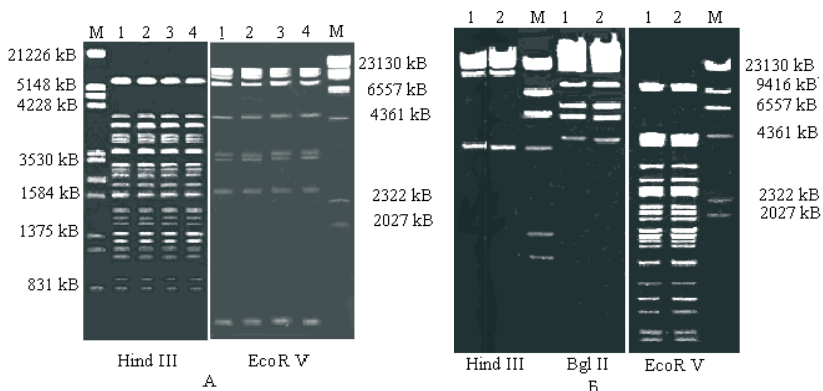


Рис. 3. Фрагменты ДНК фагов группы 1025: 1025: 1– 1025/2, 2 – 1025/3, 1025/6, 1025/К (А) и группы 216: 1–216-КС, 2– 216-V2 (Б), образованные с помощью ферментов указанных под рисунком. М-маркер молекулярной массы.

Таким образом, очевидно, что общие или подобные консервативные участки ДНК, ответственные за трансляцию белков имеющих высокое серологическое родство, присутствуют в геномах фагов разных хозяев.

Их последующая эволюция, очевидно, связана с необходимостью «коррекции специфичности» фагов, вследствие адаптации к новому хозяину.

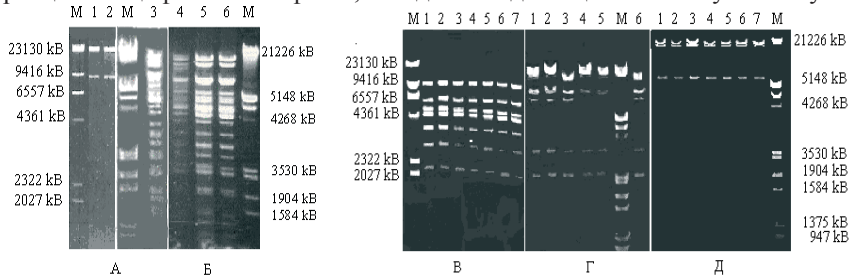


Рис. 4. Электрофоретическое разделение *Hind* III-фрагментов ДНК фагов группы 7325 (А, Б). А 1-7325/4; 2-7325/5; Б: 3-7325-1/1,4- 7325-17/1, 7325-10/1, 7325-14/2, и *EcoRV*- (В), *Hind* III-(Г), *EcoRI*-(Д) – фрагментов ДНК фагов группы 223 (подгрупп 223 и 7591): 1– 7591- 9/1, 2– 223 -10/1, 3– 7591-11/1, 4– 7591-14/1, 5– 223-14/1, 6–223- 17/1, 7-223-1/1, М – маркер молекулярной массы

Указанный тезис подтверждается исследованиями, проведенными в нашей лаборатории. Было показано, что при смешанной инфекции двух фагов, не способных давать полноценное потомство на предлагаемом хозяине, их гибриды могут обладать инфекционной активностью [7]. Однако, в таком случае сложно объяснить достаточно строгое подобие профилей разделения рестрикционных фрагментов ДНК у фагов одного хозяина, если они образованы случайным образом. Важно отметить, что изучаемые фаги выделены в разное время и в разных географических точках. В связи с чем, напрашивается парадоксальное объяснение наблюдаемых свойств, состоящее в том, что присутствующие в составе бактерий ферментные системы, являются факторами, которые «помогают» образованию новых фагов, активных против собственной бактериальной клетки.

Литература

1. *Wommack K.E & Colwell R.R.* Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. // *Microbiol. and Mol. Biol.*, – 2000. – vol. 64, №1, – P. 69-114.
2. *Андрійчук О.М., Семчук Л.І., Ромашев С.А., Ігнатенко Т.А., Яцковська Л.І., Бойко А.Л.* Динаміка виділення фагів фітопатогенних бактерій із листя та коренів цукрових буряків. // *Вісник КНУ сер. Біол.* –2004. – том 42, – С. 49-51.
3. *Botstein D.* A theory of modular evolution for bacteriophages. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1980. – vol. 354, – P. 484 – 491.
4. *Crowther J.R.* ELISA. Theory and practice. –Humana Press, – N.Y. – 1995. –P. 38 – 39
5. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* –1970. – vol. 227, №15. –P. 608 – 685.

6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М. Мир. –1984. – 430 с.

7. Андрійчук О.М., Семчук Л.І., Ромашев С.А., Ігнатенко Т.О. Аналіз частоти рекомбінацій фагів фітопатогенних бактерій та їхня роль у природі. Вісник КНУ сер. Біол. – 2006. – Н. 47. – С. 36-38.

Резюме

С целью изучить особенности процесса адаптации фагов фитопатогенных бактерий проводили сравнение их между собой. Фаги были активны против одного из штаммов: *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* или *P. syringae* pv. *atofaciens*. При этом, фаги, имеющие разных хозяев, выявляли высокое серологическое родство, но отличались по полипептидному составу. Профили разделения рестрикционных фрагментов их ДНК, в пределах группы своего хозяина, были идентичны. Исключение составляли фаги 223-14/1 и 7591-14/1 *P. syringae* pv. *tabaci*, у которых отсутствовал один из HindIII -фрагментов ДНК. Полученные результаты указывают на важную роль хозяина в эволюции геномов фагов в природе.

In order to explore features of the process of adaptation to the host, were compared four groups phages of phytopathogenic bacteria. Phages were active against one of the strains: *Xanthomonas axonopodis* pv. *beticola*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* or *P. syringae* pv. *atofaciens*. Phages different hosts showed high serological relationship, but differed in content of polypeptides. Profiles of restriction fragments DNA, within their phages group, were identical. An exception was observed in the two phages: 223-14/1 and 7591-14/1 *P. syringae* pv. *tabaci*, who was absent one of the HindIII-DNA fragments. The results suggest an important role of host in the evolution genomes of phages in nature. [Прослушать](#)

СУХАРЛЕВ В. А.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Украина, 62341, п. Малая Даниловка Дергачевского района Харьковской обл.

ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТРОФИКИ ОВЦ

Овцы – ценный вид домашних продуктивных животных, который производит питательные и диетические продукты питания, а также незаменимое сырье для промышленности. Овцы выгодно отличаются от других видов домашних животных по типу трофики, не являясь конкурентами человеку в потреблении зерна, в отличие от свиней и птицы. Они неприхотливы в кормовом отношении и могут, почти полностью обходиться только пастбищной травой и сеном [1].

Эти характеристики обусловлены эволюционными особенностями трофики вида. Овцы имеют клинообразно заостренную лицевую часть головы, острые и косо поставленные зубы, и тонкие подвижные губы. Это позволяет им поедать низкорослую, изреженную растительность и даже на скудных пастбищах находить себе корм. Они могут тщательно выбирать ко-

лоски и отдельные зерна на жнивье или травинки. Поэтому овец называют “живые косилки” или же “луговые черви”.

Овцы неприхотливы к качеству пастбищ, поедают наибольшее количество видов растений, включая горькие, сильно пахнущие и колючие травы, многие из которых сорняки. Так из 800 видов растений, потребляемых животными, овцы используют более 520, крупный рогатый скот – 460, лошади 416. Овцы поедают 132 вида соянок из 181, лошади 48, а коровы – 39; а также 46 видов полыней из 91, в то время, как лошади – 39, а коровы – 24. Овцы подвижны и выносливы, могут делать большие переходы и использовать растительность степных, полупустынных, горных и высокогорных пастбищ [2].

В ходе эволюции жвачных животных происходило адаптивное изменение отделов пищеварительного тракта. Это начинает проследиваться на стадии примитивных жвачных животных, представителем которых является археомерикс, живший 40 млн. лет назад. У них имеются все верхние резцы и клыки средних размеров. Зубы низкоронковые без развитой трущейся поверхности, что обеспечивало среднюю степень приспособленности к растительной пище.

У ранних полорогих, которые уже были жвачными, слабо дифференцированы отделы желудка; зубы среднеронковые и имеют увеличенную трущуюся поверхность, что обеспечивало им хорошую приспособленность к растительной пище.

У настоящих жвачных животных, возникших 5 млн. лет назад, отделы желудка хорошо дифференцированы. На верхней челюсти спереди у них зубов (резцов) нет, а имеется мышечный валик с бороздами. Коренные зубы высококоронковые и имеют хорошо развитую трущую поверхность. Из-за этого у жвачных высокая степень приспособленности к поеданию растительной пищи [3].

Пищеварительный аппарат овец, как и у жвачных в целом, хорошо приспособлен к перевариванию малоценных грубых кормов и высокому уровню усвоения питательных веществ. Это обуславливается большим объемом пищеварительного тракта. За данными Ю. Д. Рубана (2000, с. 30), относительный объем желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) к живой массе составляет: у свиньи – 10 %, лошади – 25 %, коровы – 33 %. При этом у свиньи от общего объема ЖКТ – объем желудка составляет 28 %, тонкого кишечника – 33 %, толстого кишечника – 38 %. У лошади эти показатели соответственно такие: 9, 30 и 61 %; у коровы – 71, 18, 11 %. То есть, у жвачных животных основной объем ЖКТ (до 71 %) занимает сложный желудок. Это вызвано способом питания жвачных, которые заглатывают корма, почти не разжевывая их. Дальнейшее пережевывание пищи жвачными животными происходит позже и в спокойном состоянии путем жвачки. До сих пор точно не доказано, почему эволюционно животные приобрели жвачный тип пищеварения. Выглядит так, что пастьба жвачных это собирание пищи, а

не питание. Большинство авторов считают, что это связано с быстрым поеданием пищи из-за боязни нападения хищников на открытом пространстве пастбищ. Мы считаем, что есть и другая причина. Она в том, что животные потребляя очень жесткие травы или сухие грубые, а потому малоценные, корма (грубостебельчатое сено, или толстые стебли как, например, у кукурузы) требуют размягчение порций принятого корма в условиях желудка, что и происходит под действием влаги, температуры и т.д. Таким образом, во время жвачки животного пережевывается корм влажный и достаточно размягченный.

У жвачных желудочно-кишечный тип пищеварения, при котором 70-85% питательного вещества корма переваривается в желудке. Переваримость питательных веществ корма у них значительно выше, чем у свиней. А у овец и коз она даже выше, чем у крупного рогатого скота. Это обусловлено тем, что длина кишечника у овец больше длины тела приблизительно в 30-35 раз, а у крупного рогатого скота – в 20 раз, лошадей – в 15, в свиней – только в 12 раз, а у кроликов – до 10 раз. При этом длина тонкого отдела кишечника овец – 26 метров и толстого – 5. Всасывающая поверхность кишечника у овец равна 2,8 м кв., что при пересчете на 1 кг живой массы значительно больше, чем у крупного рогатого скота. Тем самым увеличена площадь соприкосновения слизистой и ворсинок кишок овец с пищевой массой в них, что и обеспечивает высокую степень усвоения питательных веществ корма.

Овцы могут потребить сухих веществ кормов, как и крупный рогатый скот, до 3,3 кг на 100 кг живой массы [4].

Среди домашних животных только собака является моногастричным видом. Кролики и лошади имеют желудок и большую слепую кишку, которая выполняет роль второго желудка. В нем выделяются микробные ферменты, переваривающие клетчатку. У кроликов, например, емкость слепой кишки превышает таковую желудка в 10 раз. То есть, лошади, и кролики фактически имеют двухкамерный желудок. У верблюдов желудок трехкамерный (за счет карманов). У жвачных животных (крупный рогатый скот, овцы, козы и др.) четыре отдела желудка. При этом три первые отдела (рубец, сетка и книжка) – это преджелудки, не имеющие железистой ткани, а переваривание здесь происходит под воздействием бактерий, простейших и ферментов. Сычуг – это собственно желудок жвачных, в котором под воздействием желудочного сока переваривается до 95% сахаров и крахмала, и до 50% переваримой клетчатки. Оставшаяся часть непереваренных веществ корма переходит на переработку в кишечник.

У жвачных животных толстый кишечник представлен слепой, ободочной и прямой кишками. Собственных пищеварительных ферментов эти кишки не имеют. Но в них они поступают из тощей кишки с химусом и за счет деятельности микрофлоры. Из толстого отдела всасывается до половины аммиака. Здесь же переваривается большая часть непереваренных в вы-

шерасположенных отделах крахмала и до половины клетчатки или до 27% общей клетчатки [5].

В кишках животных переваривание питательных веществ проходит за счет пристеночного пищеварения, что повышает эффективность использования кормов для их продуктивного действия [6]. Поэтому, чем длиннее и тоньше кишки, тем больше пристеночное пищеварения и выше использование питательных веществ.

В биологии диких и домашних растительноядных животных видовой особенностью является форма экскрементов (твердых выделений), а они имеют определенное значение для людей (топливо, удобрение и т.д.). Состав, питательность и форма экскрементов зависят от вида животных. Так, твердые выделения свиней и крупного рогатого скота имеют, в основном, бесформенную полужидкую массу. Хотя при кормлении их только грубыми кормами и ограничении в воде образуются “лепешки”. У лошадей экскременты имеют форму яблок. У овец и коз – это “каштаны”, которые распадаются на отдельные “орешки”. Кролики выделяют “орешки” размером, как лецины. При этом у овец и коз, а также у кроликов “орехи” относительно сухие и тугие.

В доступной литературе по сельскохозяйственной анатомии и физиологии, а также животноводству достаточных научных объяснений этому факту нет.

Мы считаем, что объяснение необходимо искать в особенностях эволюции видов животных, ибо трофика как и форма экскрементов имеют видовое значение. То есть форма, и консистенция экскрементов животных складывались под влиянием экологических условий, в которых происходило развитие видов животных.

Например, свиньи и крупный рогатый скот, на наш взгляд, – типичные эндемики лесостепи. Они формировались в условиях сочной, растительности и достаточного количества воды в природе. Овцы – представители сухих степей, а козы – горных, бедных массивов на растительность и (часто) на воду. Кролики также живут в сухих степях и пьют воду в виде росы. Таким образом, эти условия различные и поэтому в твердых экскрементах домашних продуктивных животных (как и у диких родственных видов) количество сухого вещества следующее: крупный рогатый скот – 16, свиньи – 18 %, лошади – 24 %, овцы (козы) – 35 % [7].

То есть, у мелкого рогатого скота, в сравнении с крупным, этот показатель выше более, чем вдвое (хотя они все жвачные и питаются одинаковым кормом).

Это может указывать на то, что в отличие от свиней и крупного рогатого скота, лошади, овцы и козы, а также кролики больше извлекают влаги на заключительном этапе пищеварения, возвращая ее в кровь. Таким образом – это адаптивная реакция определенных видов животных на природную ог-

раниченность водообеспечения в сухих условиях экологии ареалов их возникновения и эволюции.

Физиологический механизм этого явления, на наш взгляд такой. Как известно, формирование каловых масс животных происходит в кишечнике. За счет волнообразной перистальтики кишечника эта масса движется в прямую кишку. В процессе этого происходит допереваривание кормов, всасывание питательных веществ и воды. Однако, мы считаем, что у лошадей, овец и коз, а также кроликов происходит сегментарное сокращение циркулярных (круглых) мышц, то есть наблюдается круговой перехват и образование сегментов (“яблок” или “каштанов” и “орехов”) из каловых масс. Таким образом, возрастает поверхность контакта их с всасывающей поверхностью стенок кишок.

Выводы

1. Эволюция трофики овец, как и других травоядных видов животных, проходила в направлении усложнения желудочно-кишечного тракта и адаптивного формирования жвачного типа пищеварения, что позволяет более эффективно использовать малоценные травянистые и грубые корма с высоким содержанием клетчатки.

2. Эволюционное формирование многокамерного желудка у жвачных животных и образование длинного кишечника позволяет за счет желудочно-кишечного и пристеночного пищеварения в кишках более полноценно переваривать корма и эффективно использовать их питательные вещества.

3. Формирование различных по форме и консистенции экскрементов травоядных видов животных – это результат адаптивных эволюционных приспособительных реакций видов животных на специфическую среду обитания.

Литература

1. *Сухарлев В. А., Яковлев К. И.* Овцы Украины: Монография / Под ред. В. А. Сухарлева. – Харьков: Эспада, 2011. – 335 с.

2. *Ерохин А. И., Ерохин С. А.* Овцеводство / Под ред. А. И. Ерохина. – М.: Изд-во МГУП, 2004. – С. 15. – Учебники и учебные пособия для высш. учеб. заведений.

3. *Рубан Ю. Д.* Эволюция крупного рогатого скота в современной и будущей селекции: Монография. – К.: Аграрная наука, 2000. – С. 29-46.

4. *Мороз В. А.* Овцеводство и козоводство / Учебники и учебные пособия для высших учебных заведений. – Ставрополь: Кн. изд., 2002. – С. 30.

5. *Цюпко В. В.* Физиологические основы питания молочного скота. – К.: Урожай, 1984. – С. 31.

6. *Гергиевский В. И.* Практическое руководство по физиологии сельскохозяйственных животных / Учебное пособ. для с.-х. вузов. – М.: “Высш. школа”, 1976. – С. 143.

7. Овцеводство / Под ред. А. И. Ерохина. – М.: Изд-во МГУП, 2004. – С. 287.

Резюме

Рассмотрены особенности трофики овец в сравнении с другими видами травоядных животных, сложившиеся в процессе их эволюционного развития.

Розглянуті особливості трофіки овець у порівнянні з іншими видами травоядних тварин, які склалися в процесі їх еволюційного розвитку.

Peculiarities of sheep tropics in comparison with other species of herbivorous animals that have been created in the process of their evolutionary development

СУХАРЛЕВ В. А.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Украина, 62341 п. Малая Даниловка Дергачевского р-на Харьковской обл.

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЭВОЛЮЦИИ ПОРОД ОВЕЦ

Н.И. Вавилов отмечал: "... для того чтобы управлять эволюцией необходимо историческое понимание ее действия" [1].

Одомашненные овцы в зоне "золотого полумесяца" Средиземноморья, куда мы относим и Понтийско-меотидную сушу Украины [2], стало возможным, вследствие таяния последнего ледника и откочовывания арктических животных на Север. Это привело к развитию земледелия и животноводства.

Открывшиеся просторы для нормального проживания людей способствовали расширению зоны овцеводства и образования экологических популяций овец, а позднее и экологических типов – основы для пород. Это привело к процессу породообразования, являющимся продолжением эволюции домашних животных. Таким образом, породообразование – это искусственная эволюция проводимая человеком, в том числе искусственным отбором и осмысленной селекцией.

Важным фактором эволюции являлась периодизация, под влиянием которой происходило изменение климата, развитие материальной культуры и породообразование животных (овец) разных направлений продуктивности.

Материалы и методы

Работа выполнена на основании научного анализа данных по овцеводству и проведенных нами опытов по скрещиванию овец короткохвостой романовской породы и длиннотощехвостых пород (меринос и кроссбред).

Результаты и обсуждение

На наш взгляд периодизация имела место при распространении и породообразовании овец, при которой образовывались популяции различных типов. Первый период в породообразовании овец – возникновение популяции короткохвостого типа овец, второй – от короткохвостых популяции длиннохвостого типа овец, третий – образование короткожирнохвостого типа популяции, четвертый – появление популяции курдючного типа, пятый – межгрупповые популяции типов овец. На основе эколого-продуктив-

ных типов образовывались породы овец разных направлений продуктивности.

Породообразование – это длинный исторический и творческий процесс, и поэтому в овце, корове и лошади (и в других видах домашних животных – В. С.) сконцентрирован труд многих сотен человеческих поколений, вкладывающийся небольшими порциями в течение многих тысяч лет и доставивший в каждом случае нечто в своем роде выдающееся [3].

С. Н. Боголюбский отмечал (1959), что за формой и длиной хвоста овец построена систематика пород овец со времен Палласа (18 ст.), учитывающая прежде всего наиболее бросающиеся в глаза морфологический критерий – различия в строении хвоста. Признак специфичный только для овец [4].

Короткий хвост овец имеет 12-14 позвонков, средний – 14-18 (опускается до скакательного сустава), длинный – 18-22 и больше (ниже скакательного сустава и может лежать на земле). Курдючные овцы имеют рудиментарный хвост, в котором 5-8 позвонков и он находится под курдюком.

Кроме этого, овечьи хвосты могут быть тощими или жирными (в зависимости от количества жиротложений). При этом у диких овец, а из пород у романовской, северной и маршевых, жиротложение в основном локализовано на внутренних органах. У остальных пород овец оно имеется в основном в подкожной клетчатке, достигая 2-3 см толщины. К последним относятся тонкорунные и полутонкорунные породы, у которых шерсть очень или достаточно жиропотная, что необходимо для защиты шерсти от неблагоприятных условий внешней среды.

Жирнохвостые и курдючные овцы имеют основную массу жира на хвосте или курдюке. Таким образом, мы породы овец разделяем на слабожирные, среднежирные и сильножирные. Сильное жиротложение локализовано в хвосте или в курдюке из-за того, что при наличии шерстного покрова и такого количества жира в подкожной клетчатке, овцы, в жаркий период года, не могут поддерживать терморегуляцию из-за перегрева тела.

Количество хвостовых позвонков у овец разных пород – это гомологичный ряд (за Н. И. Вавиловым), в который вписывается непрерывная цепь переходных форм от более коротких хвостов к более длинным. Таким же образом можно распределить наружные формы хвостов овец, с постепенным переходом от курдючных к длинножирнохвостым. По такой схеме можно разложить различные вариации нижней части S-образной формы хвостов кавказских пород овец, а также вариации в отношении места отложения жира на хвосте (4 группы) [5].

Дикие овцы имеют короткий хвост, образовавшийся (по видимому) в период оледенения. И сегодня, чем выше в горы обитает подвид горных баранов, тем относительно короче хвост. Это вписывается в правило Аллена (J. Allen, 1877), согласно которого в холодных условиях обитания организм приобретает компактное туловище с короткими периферическими частями

тела (рога, уши, ноги, хвост), что позволяет лучше сохранять тепло [6]. Поэтому первыми породами были короткохвостые овцы, которые унаследовали длину хвоста от диких. К таким породам относятся овцы Северо-западной и Северной Европы (в Украине – романовская порода, а в России – романовская и северная короткохвостая).

В условиях жаркой Центральной Азии овцы приобрели длинный хвост, что явилось ответной реакцией их организма на необходимость создания радиаторов для терморегуляции тела. При этом увеличился не только хвост, но и уши, ноги и другие части тела. Таким регионом могло быть Иранское нагорье (горные степи) с жарким (сухим) климатом. Мы считаем, что образование длинного хвоста у овец – это процесс регрессии, то есть возвращение через генетическую память к некоторым формам тела первых животных (пресмыкающиеся, динозавры и др.).

Образование жирного и длинного хвоста (длинножирнохвостых пород овец) происходило в условиях жарких, но с “голодными” периодами года территорий (скудная растительность летом и зимой). Такие условия имеются в полупустынях и пустынях. Наличие большого количества жира позволяет овцам в неблагоприятные кормовые периоды года обеспечивать организм энергией и водой. Притом пустыни Аравии и Северной Африки формировали жирный хвост овец, который очень длинный (североафриканская порода африкандер). Очень длинным был хвост и отечественной волошской породы. Хвост овец такого типа тянулся по земле и стирался, что приводило к травмам (ценным баранам привязывали под конец хвоста повозочки).

В пустынях Средней Азии формировался свой тип длинного и жирного хвоста, который имеет различные вариации. Часть из них имеют жировые подушки, являющиеся расширением мягкого основания хвоста, который продолжается в обычный короткий хвост с немногими позвонками. Он часто бывает искривлен и загнут кверху (каракульская порода). Во многих случаях и в нем образуются отложения жира. Подобных овец можно назвать полукурдючными. Во всем хвосте таких овец бывает 17-18 позвонков. Другим видоизменением жирнохвостости оказывается образование на протяжении хвоста одной, или двух жировых подушек, а если подушка одна, то она находится на подвижной части хвоста. Таких овец называют равножирнохвостыми. У них жир распределяется более равномерно по всей длине хвоста. В Аравии и Восточной Африке (Сомали) встречаются овцы с разными формами жировых накоплений в коротком наружном хвосте. Этим овец называют рудиментарнохвостыми (С. Боголюбский, 1959).

В сухих и холодных степях Бурятии и Северной Монголии у овец сохранился короткий хвост, который стал жирным (короткожирнохвостость). А в условиях Монголии, особенно в пустыне Гоби, где очень холодные зимы, короткий хвост овец уменьшился и стал рудиментарным. Он нахо-

дится под большой жировой подушкой – курдюком, который может достигать массы – 50 кг.

Таким образом, эволюционное образование жирных хвостов и курдюка у разных пород позволило распространить овец в сложные климатические зоны и создать мясосальное овцеводство, которое обеспечивает мусульманские народы не только мясом, но и жиром, и салом. Для других народов (в частности славян) жир овец является нетрадиционным и даже нежелательным фактором в системе здорового питания (из-за его большой калорийности и не только). Исходя из этого, появившаяся тенденция в Европейской России и Украине (из-за завоза татарами в Крым курдючных овец) скрещивание тонкорунных и полутонкорунных (длиннохвостых) овец с курдючными является не оправданным.

А. И. Ерохин и др. (2010) пишут, что курдючные овцы имеют не только сало курдюка, но и жиросложение на туловище в 2,5-1,5 раза выше, чем полутонкорунная куйбышевская порода [7]. Это перерасход кормов на жиросложение и нерациональное использование жира, как продукта питания.

По этому поводу К. Д. Филянский (1948) отмечал, что при скрещивании курдючных овец с тонкорунными у их помесей курдюк исчезает, но способность помесей откладывать большое количество жира остается. При этом он дислоцируется на туше, внутренних органах и в мышцах [8].

Наши данные [9], как и ряда других ученых, по скрещиванию овец романовской породы (короткохвостой) с длиннотощехвостыми породами (тонко- и полутонкорунными) показывают, что их помеси имеют не только повышенную плодовитость, но и короткий хвост. Такие овцы более технологичны, так как у них не загрязняется шерсть на задней части туловища. Поэтому отпадает необходимость ампутации длинных хвостов у ягнят после рождения, что исключает затраты и стрессовый фактор.

Наведенные особенности наследования формы хвоста у ягнят-помесей указывает на то, что первым периодом было образование короткохвостых пород овец, затем длиннотощехвостых и потом жирнохвостых, а курдючные образовались в предпоследнем периоде. В последнем периоде появились жирнохвостые овцы с формой хвоста типа каракульской породы (в виде буквы S). Это, за словами М. Ф. Иванова (1935), стало результатом скрещивания курдючных и жирнохвостых пород с короткохвостыми и длинножирнохвостыми овцами. От овец с каракульской формой хвоста появились кавказские породы с своеобразной формой хвостов, что было результатом скрещиваний с различными породами и селекционного отбора. В конце 20-го столетия появилась американская порода овец – безхвостая, которая очень технологичная.

Выводы

Породообразование – искусственный эволюционный процесс, проводимый человеком селекцией в определенных экологических условиях.

Образование овец разных направлений продуктивности происходило периодически, созданием экологических массивов и типов, с разной формой и толщиной хвоста.

Наиболее технологичными являются короткохвостые породы овец и их помеси.

Література

1. *Вавилов Н. И.* Роль советской науки в изучении проблемы происхождения домашних животных // Труды лаб. генетики: Проблемы происхождения домашних животных. Вып. 1. – Л.: Изд-во АН СССР, 1933. – С. 5-12.

2. *Сухарлев В. А.* О филогенезе овец, регионах их возникновения, одомашнения и распространения (гипотеза) // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / НАН України, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавілова. – Т. 8. – К.: Логос, 2010. – С. 74-78.

3. *Богданов Е. А.* Происхождение домашних животных. 2-е изд. перераб. и доп. С. Н. Боголюбским. – М.: Сельхозгиз, 1937. – С. 13.

4. *Боголюбский С. Н.* Происхождение и преобразование домашних животных. – М.: Советская наука, 1959. – С. 259-271.

5. *Иванов М. Ф.* Овцеводство. 3-е изд., исправл. и дополн. – М.: Сельхозлит, 1935. – С. 41-47.

6. *Ярошенко В. А.* Погода и тонкорунное овцеводство. – Л.: Гидрометеорологическое издательство, 1968. – С. 21.

7. *Ерохин А. И., Магомедов Т. А., Карасев Е. А.* Соотношение мышечной, жировой и костной тканей в тушах овец разного направления продуктивности и возраста // Овцы, козы и шерстяное дело, 2010. – №4. – С. 29-33.

8. *Филянский К. Д.* Заметки овцевода. – М.: Сельхозгиз, 1948. – 189 с.

9. *Сухарлев В. А.* Скрещивание, как метод повышения плодовитости овец // Матер. Междунар. науч.-практ. конф.: Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе. – Белгород: БГСА, 2003 – С. 60-61.

Резюме

Рассматриваются вопросы породообразования овец разных направлений продуктивности в зависимости от формы хвоста.

The questions of sheep breeds forming for different productivity directions dependent on tail form have been considered

ФЕДОРОВА Н.Б., ЧАДОВА Е.В., ЧАДОВ Б.Ф.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. акад. Лаврентьева, 10, тел.(383)3634946(1328), e-mail: bonife@bionet.nsc.ru

РОДИТЕЛЬСКИЕ ЭФФЕКТЫ УСЛОВНЫХ МУТАЦИЙ У ДРОЗОФИЛЫ

В отличие от известных в генетике мутаций, проявление которых зависит от условий среды: температуры, механических стрессорных воздействий, состава корма и т.д., проявление условных мутаций происходит только при определенных генетических условиях [1]. Если условная мутация

является леталью, то она оказывает летальное действие на особей одного генотипа, а на особей другого – не оказывает. Условные мутации могут быть как рецессивными (условные рецессивные летали, УРЛ), так и доминантными (условные доминантные летали, УДЛ), могут иметь фенотипическое проявление, могут и не иметь. Методы выделения мутаций, названных условными, позволяют получать эти мутации в строго определенной хромосоме. Однако результаты изучения закономерностей наследования условных мутаций, а также ведение в культурах демонстрируют родительские эффекты: материнский или отцовский.

Материалы и методы

Получение мутаций в X-хромосоме или аутосомах самцов дрозофилы описывалось нами ранее [2]. Два способа поддержания УДЛ в культурах отображены на рис. 1. В первом случае (рис. 1, А) ведение мутаций осуществлялось посредством инверсионного комплекса *Muller-5*, а во втором случае (рис. 1, В) – используя самок со сцепленными X-хромосомами, маркированными рецессивными маркерами *yellow*, *vermilion*, *forked*.

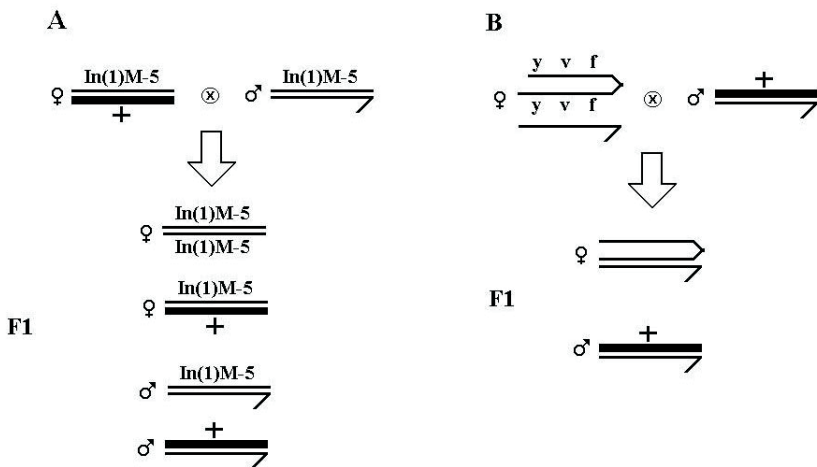


Рис. 1. Схема поддержания культур, содержащих условные доминантные мутации в X-хромосоме: А – в гетерозиготе у самок с инверсией *Muller-5* (мутантная хромосома + – жирная линия); В – в культуре со сцепленными X-хромосомами, маркированными рецессивными маркерами (*yvf/yvf*).

Результаты и обсуждение

Родительские эффекты в образовании морфозов. Одним из примечательных свойств условных мутаций является образование в каждом их поколении особей с нарушениями развития – морфозами. Дефекты развития не наследуются, но наличие мутации обеспечивает образование в каждом поколении мутантов до 26% потомков с морфологическими нарушениями

[3]. При поддержании УДЛ в X-хромосоме самок $l/In(1)M-5$ (рис.5, А) морфозы возникали не только у потомков с мутантной X-хромосомой, но и у потомков, не несущих мутантную хромосому. Это свидетельствует о материнском наследовании способности мутации вызывать морфозы в потомстве.

Однако образование морфозов у потомков, не получивших УДЛ, происходило и при поддержании мутации по отцовской линии (рис.5, Б). Дефекты развития имелись у дочерей, не получивших мутантной X-хромосомы от отца. Таким образом, в наследовании свойства вызывать морфозы имели место родительские эффекты: материнский и отцовский.

Материнский эффект в скрещиваниях на выявление УДЛ. Критерием, по которому были выделены аутомные УДЛ, являлось отсутствие потомства нормального фенотипа (без инверсии *Curly*) от скрещивания мутантного самца ($l/Curly$) с самками из культуры *yellow* (табл. 1) [2]. Однако в реципрокном скрещивании, когда УДЛ поступала от матери, потомство нормального фенотипа возникало в нормальном количестве. Особи нормального генотипа в обоих скрещиваниях являются гетерозиготами $l/+$, но в зависимости от направления скрещивания они либо появляются, либо не появляются. Такая неравноценность в результатах скрещиваний представляет собой классический материнский эффект, который принято объяснять цитоплазматическим наследованием неких генетических продуктов.

Таблица 1.

Потомство от прямого и обратного скрещиваний между культурой, несущей УДЛ в аутомне 2, и лабораторной линией *yellow*

Номер культуры самца	$\text{♀ } y \times \text{♂ } 2^*/Cy \text{ Bl } L^4$		$\text{♀ } 2^*/Cy \text{ Bl } L^4 \times \text{♂ } y$	
	Всего потомков	Доля особей с мутацией (+)	Всего потомков	Доля особей с мутацией (+)
5	303	0,06	206	0,50
7	226	0,00	162	0,46
8	239	0,03	94	0,38
9	198	0,09	89	0,43
37	254	0,00	158	0,51
44	234	0,00	161	0,40
53	231	0,00	239	0,47
62	300	0,01	104	0,44

Влияние Y-хромосомы на жизнеспособность самцов, содержащих УДЛ в X-хромосоме.

Изучение жизнеспособности мутантных самцов в зависимости от наличия/отсутствия Y-хромосомы также выявило материнский эффект. Было показано, что если самец получает от матери X-хромосому с УДЛ, его жизнеспособность не зависит от того, получил он или нет в придачу к X-хромо-

соте Y-хромосому. Если же он получает X-хромосому с условной мутацией от отца, то без комплекта с Y-хромосомой самец не выживает [5].

Родительский эффект условных рецессивных леталей 3-ей хромосомы был выявлен в реципрокных скрещиваниях четырех культур (табл. 2). Если в прямом скрещивании ♀55 × ♂ 46 потомства вообще не возникает, то в реципрокном возникают все классы F1 в ожидаемой пропорции. Разница в реципрокных скрещиваниях может быть существенной, но не настолько фатальной: при скрещивании 27 и 46 мутаций число потомков *Dichaete* в прямом направлении оказалось в 3,4 раза меньше (18,9 %), чем в обратном скрещивании (64,4 %). Поскольку набор классов и вероятности образования этих классов одни и те же, разница между прямым и обратным скрещиваниями не может быть обусловлена жизнеспособностью потомков. Следовательно, в данной ситуации имеет место материнский эффект.

Таблица 2.

Доля потомков, содержащих инверсию *Dichaete*, в реципрокных скрещиваниях четырех морфозных рецессивных летальных культур

Реципрокные скрещивания	Классы потомства						Всего потомства	Доля потомков <i>Dichaete</i> (%)
	Норма			<i>Dichaete</i>				
	Самки	Самцы	Всего	Самки	Самцы	Всего		
♀27 × ♂ 34	49	47	96	20	13	33	129	25,58
♀34 × ♂ 27	56	41	97	114	67	181	278	65,11
♀27 × ♂ 46	132	147	279	34	31	65	344	18,90
♀46 × ♂ 27	63	68	131	102	135	237	368	64,40
♀27 × ♂ 55	88	158	246	29	28	57	303	18,81
♀55 × ♂ 27	37	30	67	97	59	156	223	70,00
♀34 × ♂ 46	0	0	0	0	0	0	0	0
♀46 × ♂ 34	73	95	168	109	95	204	372	54,80
♀46 × ♂ 55	145	166	311	264	279	543	854	63,60
♀55 × ♂ 46	0	0	0	0	0	0	0	0
♀55 × ♂ 34	0	0	0	81	65	146	146	100
♀34 × ♂ 55	0	0	0	114	91	205	205	100

Репрессия летального эффекта УДЛ под действием хромосомных перестроек. Летальное действие X-хромосомных УДЛ (отсутствие дочерей в потомстве при скрещивании мутантного самца с самками *yellow*) снимается при поступлении перестройки 2 или 3 хромосомы в зиготу со стороны матери, а УДЛ – со стороны отца (табл.3). В случае реципрокного скрещивания: самки *yellow* с мутантным самцом, содержащим УДЛ и перестройку одновременно, снятия летального действия УДЛ хромосомной перестройкой не происходит [6].

Таблица 3.

Материнский эффект перестроенных аутосом на летальное действие мутаций, поступающих в зиготу со спермием (скрещивания мутантных самцов с самками $y/y; +/+; y/y; +/Cy, y/y; +/Pm$ и $y/y; +/D$)

Номер мутации у самца	Самка $y/y; +/+$		Самка $y/y; +/Cy$				Самка $y/y; +/D$			
	дочери +	сыновья у	дочери +	сыновья у	дочери +	сыновья у	дочери +	сыновья у	дочери +	сыновья у
			Cy+	Cy	Cy+	Cy	D+	D	D+	D
1	–	230	–	–	178	163	-	-	115	8
2	–	230	14	13	127	134	-	-	42	7
4	–	270	9	4	185	159	-	-	162	7
5	–	197	23	21	80	95	-	-	37	3
27	2	167	1	0	102	113	-	-	9	2
29	4	163	32	27	71	56	6	6	88	10
30	–	184	15	13	81	76	-	-	38	6
31	–	242	32	20	127	102	-	-	70	6
32	–	197	22	10	90	77	-	-	48	2
33	–	209	20	18	95	101	24	2	85	12
34	–	140	11	14	88	101	-	10	103	3

Родительский эффект в наследовании видимого проявления условной мутации. Одна из полученных методом морфозов мутация мутаций, №14, обладает фенотипическим проявлением: самки и самцы имеют укороченное и слегка утолщенное тело. Мутация получила название «бочонок» (*Small barrel, Smba*). Укорочение тела мух $Cy/14$ отображают замеры средних величин отношения длины к ширине куколок (l/w). Если у куколок нормальных линий и линии $Pm/14$ такое соотношение составляет $l/w = 14.0/4.0 = 3.5$, то у $Cy/14$ $l/w = 6,7/3.1 = 2.2$.

Родительский эффект был выявлен в процессе локализации мутации *Smba*: мутантных самцов скрещивали с самками 105 культур, содержащих делеции хромосомы 2. В каждом из скрещиваний потомство на стадии куколки в 100% случаев имело фенотип *Smba* [9].

Для изучения проявления признака *Smba* в поколениях провели скрещивание самок $Cy/14$ (*Smba*) с самцами $Pm/14$ ($Smba^+$). В F1 потомство с инверсией Cy получает вторую хромосому от отца, а потомки с инверсией Pm наследуют вторую хромосому от матери, обладающей коротким телом. Совершенно неожиданным оказалось то, что все просчитанные 131 куколки и 199 вылетевших имаго в F1 были короткими. Ярким проявлением родительского эффекта явилось наличие фенотипа *Smba* у потомства класса Cy/Pm , которое мутантную хромосому не получало вообще.

Далее в течение 14 поколений измеряли длину куколок в трех полученных в F1 культурах – $Cy/14$, $Pm/14$ и Cy/Pm (табл.4). С течением времени

во всех трех культурах наблюдалась тенденция к уменьшению количества укороченных куколок, хотя динамика этого процесса была разной. В культуре *Cy/Pm* наблюдался равномерный прирост количества длинных куколок, приведший практически к 100% их наличию в F13 – F14. В культуре *Cy/14*, начиная с F3, также наблюдалась тенденция к росту числа длинных куколок, хотя соотношение числа укороченных к длинным куколкам в поколениях колебалось. Резкие и полярные колебания в соотношениях укороченных к нормальным куколкам происходили в культуре *Pm/14* – преобладали то одни, то другие, но к F14 куколки нормальной длины преобладали полностью.

Таблица 4.

Изменение длины куколок в поколениях ведения трех культур от скрещивания самок *Cy/14* фенотипа *Smba* с самцами *Pm/14* фенотипа *Smba*⁺

Поколение	<i>Cy/14</i>		<i>Pm/14</i>		<i>Cy/Pm</i>	
	короткие куколки	длинные куколки	короткие куколки	длинные куколки	короткие куколки	длинные куколки
F2	57	60	39	25	94	104
F3	51	176	49	21	93	340
F4	18	76	55	43	39	116
F5	63	108	84	32	15	125
F7	6	40	5	18	5	59
F9	1	143	65	83	6	108
F10	6	108	105	59	5	93
F11	17	211	122	117	2	204
F12	17	277	15	111	5	223
F13	7	144	4	149	0	115
F14	13	159	2	136	1	122

Полученные данные безоговорочно свидетельствуют о наличии родительского влияния при передаче по наследству условных мутаций. Поскольку имеет место не только материнский, но и отцовский эффект, объяснить результаты исследований исключительно цитоплазматической передачей генных продуктов невозможно, тем более что в случае отцовского влияния цитоплазма в эти процессы не вовлечена.

Полагаем, что причиной родительских эффектов служит разграничение во времени и пространстве производства и реализации генных продуктов, определяющих проявление признака. Разграничение в пространстве состоит в том, что генный продукт производится в родительской клетке, а реализуется в клетке следующего поколения. Разграничение во времени связано с отсроченной реализацией продукта: производство продукта не сопровождается его моментальной реализацией, как это происходит с продуктами структурных генов. Так, с нашей точки зрения, работают регуля-

торные гены, повреждения в которых привели к возникновению найденных нами условных мутаций.

Литература

1. Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А., Федорова Н.Б. Новый класс мутаций у *Drosophila melanogaster* // Докл. РАН. 2000. Т. 373. №5. С. 714-717.
2. Чадов Б.Ф., Чадова Е.В., Копыл С.А., Артемова Е.В., Хоцкина Е.А., Федорова Н.Б. От генетики внутривидовых отличий к генетике внутривидового сходства // Генетика. 2004. Т.40. № 9. С.1157-1172.
3. Федорова Н.Б., Чадова Е.В., Хоцкина Е.А., Чадов Б.Ф. Условные мутации у *Drosophila melanogaster*: образование морфозов //
4. Lloyd V.K. Parental imprinting in *Drosophila* // *Genetica*. 2000. V. 109. P. 35-44.

Резюме

У мутаций, проявляющихся в одном генотипе, но не проявляющихся – в других (условные мутации), обнаружены родительские эффекты в наследовании. В статье рассмотрены случаи проявления материнского и отцовского эффектов.

ХОХЛОВ А. М.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, Украина, Харьковская обл., Дергачевский район, п/о Малая Даниловка, ХГЗВА, Академическая 1.

E-mail: zoovet@zoovet.kharkov

МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОПУЛЯЦИИ ДОМАШНИХ И ДИКИХ СВИНЕЙ

В отечественной и зарубежной литературе недостаточно работ, в которых пороодообразование рассматривается как процесс микроэволюции среди внутривидовых популяций, обусловленный факторами искусственного отбора, подбора и гибридизации. В понимание этой проблемы внесли определенный вклад исследования Д. К. Беляева [3], С. Н. Боголюбского [4], Ю. П. Алтухова [1], В. Н. Тихонова, К. В. Жучаева [5] и других.

Доместикация – это начальный этап преобразования вида, у которого существенно изменяется образ жизни: отбор по специфическому поведению, улучшенное содержание, усиленное кормление и др. Все это в значительной степени влияет на гормональный статус и обуславливает повышение частоты мутаций, что существенно увеличивает биоразнообразие морфологических признаков. Целенаправленным отбором селекционеры добились у свиней отсутствия сезонности размножения, высокого многоплодия, повышения мясности.

Возникают вопросы, каков же путь филогенеза этого вида, каковы генетические механизмы доместикации и генетические различия между современными породами свиней и их исходными формами [6].

Материалы и методы

Предком одомашненных свиней Украины можно считать европейского дикого кабана (*Sus scrofa ferus*), который стал генетическим корнем по-

дообразовательного процесса в Европе. По данным А. Банникова, В. Флин-та [2] *Sus scrofa ferus* появился в нижнем олигоцене в Европе и был самым первым диким животным из семейства Suidae, подвергнувшимися домести-кации.

В широкомасштабных исследованиях по выявлению аллелей domesti-кации были проанализированы, как результаты собственных исследований (на породах: крупная белая, миргородская, ландрас, эстонская беконная, крупная черная и пьетрен), так и материалы В. Н. Тихонова, В. П. Ковален-ко [4] по иммуногенетическим характеристикам некоторых аборигенных и заводских пород, а также диких свиней Европы и Азии.

Результаты и обсуждения

Межвидовая и межпородная дивергенция у свиней – это одна из важ-ных элементарных форм микроэволюции, когда в результате изменения на-правления отбора возникают генетические и фенотипические расхождения во внутривидовой популяции, вызывая широкое разнообразие по морфо-логическим особенностям. Наши многолетние исследования на популяц-иях отечественных и зарубежных породах и гибридах полностью подтверж-дают эти выводы.

Анализ генетических расстояний – это продолжение изучения генети-ческой структуры популяций, выявление особенностей генетической ди-вергенции и, как результат, приближение к пониманию процессов эволю-ции вида. Данные о величине генетических дистанций между породами свиней представлены в таблице 1.

Таблица 1

Генетические дистанции пород свиней

Сис-тема групп крови	Крупная белая – укр. ст. белая	Крупная белая – эстонская беконная	Крупная белая – ландрас	Крупная белая – миргородская	Круп. белая – северокавказская	Круп. белая – пьетрен	Круп. белая – круп. черная	Круп. белая – беркшир
F	0,0127	0,1588	0,0567	0,2166	0,1564	0,0040	0,5488	0,8880
G	0,2617	0,2044	0,1269	0,3481	0,3071	0,4783	0,3450	0,2572
K	0,2235	0,2218	0,2226	0,1231	0,1179	0,1694	0,2037	0,0980
E	0,1394	0,0370	0,0418	0,0418	0,1514	0,1539	0,1500	0,1716

Для анализа генетических расстояний было использовано 9 пород с ви-ней по двум диаллельным F и G и двум полиаллельным K и E – системам групп крови. По величине генетического расстояния крупная белая порода была ближе к породам украинская степная белая, ландрас, эстонская беконная, при участии которой они были созданы. Высокая величина дистанции между крупной белой породой и беркшир (0,8880) указывает на отсутствие между ними генетической близости и давней дивергенции этих пород, последняя из которых была создана более 350 лет назад в Англии. Чем больше

породы разошлись друг от друга, тем более высокий уровень генетической изменчивости можно ожидать у потомства, полученного от скрещивания этих пород. Сывороточный белок – трансферрин может служить у свиней маркером соответствующих структурных генов. Учитывая интерес к генетической структуре популяций предковых форм, аборигенных и заводских пород, нами были вычислены коэффициенты генетических расстояний по трансферрину между дикими животными (европейский, среднеазиатский, кавказский, уссурийский кабан), аборигенными (мангалицкая) и заводскими породами (крупная белая, ландрас, крупная черная).

По величине генетического расстояния крупная белая порода свиней ближе к европейскому и кавказскому кабану, чем к среднеазиатскому и уссурийскому, а крупная черная порода свиней генетически ближе к среднеазиатскому кабану, чем к европейскому, что подтверждает влияние восточных популяций домашних свиней на ее формирование.

Таблица 2

Генетические дистанции по трансферрину (Г)

	Sus Scrofa ferus	Кавказский	Среднеазиатский	Уссурийский	Ландрас	Крупная белая	Крупная черная	Мангалица
Sus scrofa ferus	-	0.0860	0.1100	0.1556	0.1612	0.0885	0.1658	0.2190
Кавказский	0.0860	-	0.0796	0.0961	0.0954	0.1425	0.0956	0.1330
Среднеазиатский	0.1100	0.0796	-	0.0826	0.0761	0.1621	0.0760	0.1090
Уссурийский	0.1556	0.0961	0.0796	-	0.0572	0.2223	0.0647	0.0910
Ландрас	0.1612	0.0954	0.0761	0.0572	-	0.2371	0.0065	0.0251
Крупная белая	0.0885	0.1425	0.1621	0.2223	0.2371	-	0.2380	0.2512
Крупная черная	0.1658	0.0956	0.0760	0.0647	0.0065	0.2380	-	0.0137
Мангалица	0.2190	0.1330	0.1090	0.0910	0.0251	0.2511	0.0137	-

Несмотря на выраженные различия в генетических дистанциях между популяциями домашних и диких свиней, которые позволяют оценить дифференциацию между современными заводскими и древними локальными породами, надо помнить о том, что все они произошли от единого корня – европейского дикого кабана (*Sus scrofa ferus*).

Выводы

На основании селекционно-генетического анализа популяции домашних и диких свиней сформирована парадигма генетико-популяционных

процессов, происходящих при одомашнивании свиней. Для вида *Sus scrofa* суть доместикации состояла в изменении количественных и качественных взаимоотношений в росте и развитии, которые в сочетании с последующими направленным отбором способствовали формированию современных пород свиней.

Анализ генетической дистанции между породами по аллелям групп крови и типам полиморфных белков показал, что по величине генетического расстояния крупная белая порода ближе к европейскому и кавказскому кабану, а крупная черная – к среднеазиатскому. Это подтверждает влияние восточной популяции домашних свиней (кианской группы) на ее формирование. На величину генетических дистанций оказывает влияние время расхождения между сравниваемыми породами, чем раньше они разошлись, тем выше показатель генетического расстояния между ними.

На основе иммуногенетического анализа установлено, что доместикационными аллелями у свиней является Fa, Gb, Acp, Hb, Amc, Tfa, CpB и другие. Генетическое сходство по отдельным маркерам (F, Tf, Cp и др.) в популяции дикого европейского кабана указывает на общность их происхождения, а более позднее проявление полиморфизма по отдельным локусам у азиатского кабана подтверждает выдвинутую нами гипотезу о более позднем его происхождении.

Доместикационные процессы, и создание в итоге современных пород свиней происходили, в основном, путем повышения изменчивости признаков, увеличения массы и размеров животных, их внутренних органов и костно-мышечной системы. Этот процесс происходил в условиях изоляции, ограниченности движения, спонтанного инбридинга с последующим включением селективных механизмов, обусловленных антропогенными факторами. Выдвинутая гипотеза о продолжающемся процессе доместикации у современных пород свиней, приводящему к изменению генотипического состава популяции под действием селекционного и мутационного процессов, а также новых технологий производства продукции свиноводства и перехода от вертикального до горизонтального принципа этологических отношений в стадах и группах животных.

Исходя из разработанных теоретических предпосылок микроэволюции домашних свиней, нами оценен генофонд свиней Украины и даны перспективы его использования в региональных системах разведения. Предложены методы технологического мониторинга в промышленном свиноводстве путем выбора сочетающихся пород свиней с использованием породно-линейной гибридизации, оптимизации численности половозрастных групп в пирамидальной системе воспроизводства стада. Разработаны приемы оптимизации производства свинины с учетом закономерностей доместикационного процесса в свиноводстве.

Литература.

1. Алтухов Ю. П. Генетические процессы в популяциях. – М.: Наука, 1989 – 328 с.
2. Банников А.Г., Флинт В.Е. Жизнь животных. – Т. 7., – М.: Просвещение, 1989. – С 426-434.
3. Беляев Д. К. Генетические аспекты domestикации животных // Проблемы domestикации животных и растений. – М.: Наука, 1972. – С 39-45.
4. Боголюбовский С. Н. Происхождение и преобразование домашних животных. – М.: Сов. наука 1959. – 592 с.
5. Тихонов В. Н., Жучаев К. В. Микроэволюционная теория и практика порообразования свиней. – Новосибирск, 2008. – 394 с.
6. Хохлов А. М. Внутривидовые генетические и морфологические изменения у свиней / Фактори експериментальної еволюції організмів. – Том 6, – К.: Логос, 2009. – С 92 – 96.

Резюме

В статье рассматриваются микроэволюционные процессы, происходящие в отдельных породах свиней, что приводят до смены генетической структуры популяции.

В статті розглядають мікроеволюційні процеси, що протікають в межах окремих порід свиней, що призводить до зміни генетичної структури популяції.

The article discusses mikroevolyutsionnye processes occurring in some breeds of pigs, which leads to the change of population genetic structure.

ЧИГРИН А.В., БОНДУС Р.О., УПИР Л.М.,* БЕЗХИЖКО В.І.,* ВАЩЕНКО Г.І.*

Устимівська дослідна станція рослинництва Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН, Україна, 39074, с. Устимівка, Глобинського р-ну, Полтавської обл., e-mail: udsr@ukr.net

*Великобурімська загальноосвітня школа I-III ступенів, експериментальний майданчик Міністерства освіти і науки. Україна, 19940, с. Велика Бурімка, Чорнобаївського р-ну, Черкаської обл..

ПАСЛЬОНОВІ КУЛЬТУРИ, ЯК ФАКТОР МІКРОЕВОЛЮЦІЇ КОЛОРАДСЬКОГО ЖУКА (*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA* SAY)

На батьківщині картоплі проживає більше 40 видів жуків-листодів роду *Leptinotarsa* (родина *Chrysomelidae*), проте жоден із них, використовуючи для харчування дикі види картоплі і пасльону, не зміг перейти в розряд масових. До п'ятидесятих років XIX століття колорадський жук (описаний Томасом Сейєм, як вид у 1829 р.) також був непомітною частиною складного біоценозу північно-американських прерій. Чисельність популяції жука коливалась залежно від урожаю пасльону колючого (*S. rostratum* Duh.) – головного на той час корму, що ріс у Мексиці і на південному заході США. У 1850-1860 рр. межа вирощування культурної картоплі досягла цих районів. У результаті для листодів роду *Leptinotarsa*, пов'язаних з пасльо-

новими рослинами, створилися потенціальні передумови для переходу до живлення новою для них їжею. Проте, доступним кормом, до того ж значно більш сприятливішим, порівняно з дикими видами, культурна картопля виявилася лише для одного із вище згаданих видів листоїдів, а саме для *L. decemlineata* Say, який було названо “колорадським” за місцем його першого виявлення на культурній картоплі (США, штат Колорадо, 1859 р.) [1].

Перехід *L. decemlineata* до харчування на сортах Чилійської культурної картоплі, соковиті і поживні листки яких містили невисокі концентрації речовин вторинного обміну, призвів до різкого зростання плодючості і життєдіяльності цього виду – до так званого “екологічного вибуху” масового розмноження [2]. Власне з переходу від дикої картоплі на культурну і починається історія його поширення, як сільськогосподарського шкідника у Північній Америці, а потім у Європі, Азії і Північній Африці. У більшості країн колорадський жук за досить короткий період (максимум – декілька десятиліть) став постійним елементом картопляних ценозів і суттєвим несприятливим чинником для формування урожаю культури, оскільки новий шкідник займав вільну екологічну нішу.

Таким чином біологічна система “культурна картопля – колорадський жук” почала формуватися порівняно недавно – близько 150 років тому. Незважаючи на відносно короткий період, жук добре пристосувався до використання нової кормової рослини, сортова різноманітність якої базувалася на генетичній однорідності *S. tuberosum* subsp. *chiloense*. Важливу роль у цьому зіграла і підвищена екологічна пластичність колорадського жука. Згідно сучасних уявлень вона обумовлена генетичним і еколого-фізіологічним поліморфізмом, який у нього виражений яскравіше, ніж у інших видів роду *Leptinotarsa*. Припускається, що це пов’язано із еволюційною молодістю виду. Популяції найбільш поліморфних біологічних видів мають підвищені пристосувальні можливості, що забезпечує їм високу життєздатність у мінливих умовах середовища і відносну легкість адаптації до них. За рахунок цього можливе значне розширення видового ареалу, яке супроводжується відповідними мікроеволюційними змінами генетичної структури популяцій [3, 4 і ін.].

Важливою є роль кормових рослин в мікроеволюції колорадського жука. Не виключено, що у зв’язку із внутрішньовидовою дивергенцією розширилась і видова норма його харчової спеціалізації. При цьому, жук проявляє виражену вибірковість стосовно видів, сортів та інших поліморфних форм рослин (культурна картопля *Solanum tuberosum* L. і *S. andigenum* Juz. et Buk., баклажан *S. melongene* L., томат *Lycopersicon esculentum* Mill., дикорослі картоплі – *S. demissum* Lindl, *S. chacoense* Ochoa, *S. commersonii* Dun. ex Poir. in Lam. та ін.). Тому стійкість різних сортів і форм названих рослин до шкідника відрізняється [5], у зв’язку з чим форми одного виду рослин можуть входити в різні групи харчової доступності для шкідника.

Загальну широту харчової спеціалізації *L. decemlineata* або його гістальну специфічність відображає прийнятий поділ рослин родини пасльонових на 3 групи згідно їх придатності для живлення фітофага: 1 – сприятливі, які забезпечують повноцінне живлення і розвиток у всіх фазах розвитку жука та нормальне розмноження імаго; 2 – несприятливі, які забезпечують повний життєвий цикл лише деякій частині особин або тимчасове живлення жуків; 3 – непридатні, які лежать за межами видової норми харчових адаптацій колорадського жука переважно у зв'язку з їх високою токсичністю.

Такі особливості еволюційно сформованої гістальної специфічності *L. decemlineata* мають велике адаптаційне значення і ґрунтуються на винятковій різноманітності взаємовідносин в консорних системах “пасльонові рослини – колорадський жук” на рівні внутрішньовидових форм як рослин, так і комах.

Вивчення внутрішньовидових харчових адаптацій і уточнення видової норми харчової спеціалізації колорадського жука в межах його сучасного ареалу становить як науковий інтерес, так і має практичне значення для удосконалення принципів селекції і раціонального розміщення стійких до шкідника сортів картоплі і овочів. Мета даної роботи – на різноманітному матеріалі представити генетичний потенціал роду *Solanum L.*, як основу для селекції на стійкість до колорадського жука.

Матеріали і методика

Вивчення стійкості зразків дикорослих видів картоплі проводилось у Полтавській області на базі Устимівської дослідної станції Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН в 1990-1994 рр. та 2008-2010 рр.; у Черкаській області на дослідних ділянках ботанічного саду Черкаського державного університету ім. Б. Хмельницького в 1996-2000 рр. і 2002-2004 рр. та на шкільних навчально-дослідних ділянках Великобурімської загальноосвітньої школи I-III ступенів Чорнобаївського району в 2008-2010 рр.

Зразки висаджували у горщики, які розміщували у парниках, а частину – у відкритий ґрунт. Для оцінювання методом вільного (вибіркового) харчування рослини висаджували в парниках в рядки, з відстанню в рядку 10-12 см та з міжряддями 30 см, а в полі – згідно загальноприйнятої методики, за схемою 35x70 см.

На дослідних ділянках Устимівської станції вивчалось 38 дикорослих видів картоплі (72 зразки) з Північної і Південної Америки. В умовах Черкаської області на стійкість до колорадського жука оцінювали 18 видів з двох континентів (54 зразки).

Для визначення ступеня стійкості бадилля рослин використовували 9-ти бальну шкалу, відповідно якої: 9 балів відповідає 0 або 1-10% пошкодженої листової поверхні; 7 балів – 11-25%; 5 балів – 26-50 %; 3 бала – 51-75%; 1 бал – більше 75%. Було прийнято наступні критерії стійкості рос-

лин: пошкодження листя зразків на 1, 3, 5 балів вказує на низьку стійкість до шкідника; 7 балів – рослини відносно стійкі; 9 балів – високостійкі.

Результати та обговорення

До останнього часу роботи з оцінки картоплі на стійкість до *L. decemlineata* проводились на обмеженому матеріалі. Тому було поставлено завдання – дати оцінку чисельній колекції диких видів картоплі відділу бульбоплодів Всеросійського інституту рослинництва (ВІР), включаючи раніше не вивчені зразки. Цією роботою передбачалося встановити локалізацію стійкості до колорадського жука і виявити нові осередки даної стійкості.

Попередніми дослідженнями було встановлено, що стійкі види ростуть переважно як в ареалі поширення жука, тобто в Північній Америці, так і дуже далеко від цього ареалу – в південно-східній частині Південної Америки. Ці свідчення ґрунтувались на обмеженому матеріалі і потребували внесення точніших даних. Тому нами було вивчено по більшості видів ряд зразків із різних місць як згаданих ареалів, так і ареалів інших видів, які знаходяться між вищезгаданими.

Серед нових надходжень в колекцію ВІР або тих, що раніше не вивчались на стійкість до шкідника, в умовах Полтавської області високостійкими (9 балів) виявились 11 видів: *S. pinnatisectum* Dun., *S. lesteri* Hawk. et Hiert., *S. chomatophilum* Bitt., *S. albornozii* Corr., *S. multiinterruptum* Bitt., *S. chiguidenum* Ochoa., *S. blanco-galdosii* Ochoa., *S. hypacrarthrum* Bitt., *S. multidissectum* Hawk., *S. avilesii* Hawk. et Hiert., *S. neorosii* Hawk et Hiert. 3 них лише 2 з Північної Америки, а всі інші з Південної Америки, переважно на більшість їх з різних районів Перу.

Із матеріалу, що вивчався нами в умовах Черкаської області високу стійкість (9 балів) до колорадського жука проявили 8 видів: *S. jamesii* Torr., *S. michoacanum* (Bitt) Rydb., *S. comersonii* Dun., *S. tarijense* Hawk., *S. berthaultii* Hawk., *S. microdontum* Bitt., *S. kurtzianum* Bitt. et Wittm., *S. vernei* Bitt. Як бачимо, і в даному випадку переважна більшість із виділених по стійкості до шкідника – це південно-американські види, переважно з Болівії і Аргентини.

Великобурімська ЗОШ (Черкаська область, Чорнобаївський район) – експериментальний заклад Всеукраїнського рівня, який працює над проведенням дослідно-експериментальної роботи за темою “Формування національно-свідомого господаря землі як складова виховання громадянина держави в умовах сільської школи.” У варіативній складовій навчального плану включено додаткові курси за вибором, факультативи. На заняттях “Оснoв агрономії” учні вивчають та застосовують на практиці знання щодо технології вирощування овочевих культур. Для цього проводиться цілий ряд дослідів. З метою більш досконалого вивчення рослинництва в Україні, і зокрема в Посуллі де розміщені Чорнобаївський район Черкаської області та Глобинський район Полтавської області, школа співпрацює з Устимівською дослідною станцією рослинництва Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр’єва НААН.

З 2008 року досліджується стійкість пасльонових культур до колорадського жука. Вивчається 70 зразків овочевих культур і картоплі отриманих з Устимівської ДСР. Подібні дослідження дозволять уточнити видову норму харчової спеціалізації жука та оцінити його реальну і потенціальну небезпеку для різних видів пасльонових рослин і одночасно виявити джерела стійкості до шкідника серед рослинних ресурсів.

Рослини вирощувалися без проведення хімічного обробітку. Оцінка проводилась шляхом обстеження зразків, що вивчались за 4 показниками заселення і пошкодження рослин шкідником:

- 1-середня чисельність жуків, що перезимували (екз. на 1 рослину);
- 2-середнє число кладок яєць (на 1 рослину);
- 3-середнє число личинок III-IV віку (на 1 рослину);
- 4-середній бал пошкодження листової поверхні.

Довгий час баклажан вважався безумовно сприятливою і сильно пошкоджуваною кормовою рослиною нарівні з культурною картоплею, а томат несприятливою. Проте нами відмічена широка варіація виживання личинок на різних сортах цих рослин: на баклажанах Донської-14, Длинный фиолетовый 239 та ін. -40-65%; Алмаз, Деликатес – 5-20%; на томатах Чайка, Котыгорошко, Хабаровский розовый та ін. – 0-6%; Бородинский ранний, Белый налив, Гранд – 9-22%; Атма, Дружба, Любимий, Ouson, Nemadae – 25-40%. Ймовірно, у баклажана, як і у картоплі, є генетичні ресурси для селекції на стійкість до колорадського жука. В той же час жук реально небезпечний і для томатів, так як володіє відповідним адаптивним потенціалом на популяційному рівні

Висновки

Серед диких співродичів картоплі в якості генетичних джерел стійкості до колорадського жука виділено 4 північно-американських види: *S. jamesii*, *S. lesteri*, *S. michoacanum*, *S. pinnatisectum*; 15 південно-американських: *S. albornozi*, *S. avilesii*, *S. berthaultii*, *S. blanco-galdosii*, *S. chiguidentum*, *S. chomatophilum*, *S. comersonii*, *S. hypocrarthurum*, *S. kurtzianum*, *S. microdontum*, *S. multidissectum*, *S. multiinterruptum*, *S. neorosii*, *S. tarjense*, *S. vernei*.

Дані наших спостережень підтверджують той факт, що стійкі до колорадського жука види ростуть як в ареалі його поширення, тобто у Північній Америці, так і в Південній Америці, на території якої знаходиться більше 85 % всіх дикорослих і культурних видів картоплі. Це представляє великі перспективи для подальшого вивчення генетичного різноманіття видів картоплі і використання їх в селекційному процесі.

3. Відмічена різноманітність внутрішньовидових особливостей реакцій колорадського жука на кормові рослини, зокрема – високу адаптованість окремих форм до томатів, це може об'єктивно вказувати на те, що в результаті внутрішньовидової диференціації *L. decemlineata*, його загальна видова норма харчової спеціалізації уже не відповідає попереднім характеристикам і потребує додаткового аналізу.

Література

1. *Шатино И.Д.* Иммуитет полевих культур к насекомим и клещам. – Л.: ЗИН АН СССР. – 1985. – 321 с.
2. *Элтон Ч.* Экология нашествия животных и растений. – М.:ИЛ. – 1960. – 230 с.
3. *Фасулати С.Р.* Микроэволюционные аспекты воздействия сортов картофеля на структуру популяций колорадского жука // Изменчивость насекомых вредителей в условиях научно-технического прогресса в сельском хозяйстве. – Сб. научн. тр. ВИЗР, 1988. – С. 71–83.
4. *Фасулати С.Р., Чигрин А.В.* Вплив стресових факторів (кліматичних умов і кормових рослин) на формування популяції колорадського жука // Екологічний стрес і адаптація в біологічних системах. – Тернопіль. – 1998. – С. 111–113.
5. *Чигрин А.В., Безхижеко В.І., Галушка С.В.* Оцінка зразків пасльонових культур на стійкість до колорадського жука в умовах Посулля // Стан та перспективи розвитку рослинницької галузі в умовах змін клімату. – Харків. – 2009. – С. 195–197.

Резюме

На большом видовом материале представлено генетический потенциал рода *Solanum*, как основу для селекции на устойчивость к колорадскому жуку. Подтвержден тот факт, что устойчивые к вредителям виды растут, как в ареале распространения жука, так и далеко за его границами. Показан потенциал угрозы *L. decemlineata* для разных видов пасленовых растений и одновременно выявлены источники устойчивости к нему среди растительных ресурсов.

На широкому видовому матеріалі представлено генетичний потенціал роду *Solanum*, як основу для селекції на стійкість до колорадського жука. Підтверджено той факт, що стійкі до шкідника види ростуть, як в ареалі поширення жука, так і далеко за його межами. Показано потенційну небезпеку *L. decemlineata* для різних видів пасльонових рослин і одночасно виявлено джерела стійкості до нього серед рослинних ресурсів.

On the big specific material it is presented genetic potential of sort *Solanum*, as a basis for selection on stability to a bug. That fact is confirmed, that kinds steady against wreckers grow, as in an area of distribution of a bug, and is far behind its borders. The potential of threat *L. decemlineata* for different kinds *Solanaceae* plants sources of stability to it among vegetative resources also are simultaneously revealed.

ШТАРК О.Ю., ПРОВОРОВ Н.А., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.

*Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии (ГНУ ВНИИСХМ Россельхозакадемии), Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3;
e-mail: oshark@yandex.ru*

ЭВОЛЮЦИЯ МУТУАЛИСТИЧЕСКИХ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ СИМБИОЗОВ: ГИПОТЕЗЫ И ФАКТЫ

Симбиоз, или «сосуществование неродственных организмов», играет ключевую роль в эволюции, способствуя образованию новых форм жизни и развитию новых типов экологических взаимодействий [1, 2]. Согласно современным представлениям о симбиозе, существуют два крайних его слу-

чая: мутуалистический (обоюдовыгодный) и паразитический (антагонистический) симбиозы. Мутуализм представляет собой особую экологическую и эволюционную стратегию, при которой симбиотическая система приобретает новые физиологические функции (адаптации), не характерные для каждого из партнеров симбиоза в отдельности.

В процессе эволюции растительно-микробных симбиозов можно выделить несколько направлений: формирование у растения механизмов защиты от внедрения посторонних агентов и контроля интенсивности защитных реакций, механизмов адаптации микросимбионта к тканям растения, способности к образованию специализированных симбиотических структур, а также механизмов усвоения питательных веществ, полученных симбиотрофным путем. Формирование того или иного типа взаимодействий (мутуализм или антагонизм) происходило под жестким селективным давлением, обусловленным экологическим преимуществом данного типа.

Мутуалистические симбиозы высших растений с полезными почвенными микроорганизмами (ППМ) широко распространены в природе, и наряду с их важной экологической ролью, обладают высоким потенциалом использования в адаптивном сельскохозяйственном производстве. Наиболее важны для сельского хозяйства арбускулярная микориза (АМ) и бобово-ризобийный симбиоз (БРС), являющиеся эндосимбиозами, а также эпифитные и/или эндофитные ассоциации с бактериями, стимулирующими рост растений (PGPB, от англ. «Plant Growth Promoting Bacteria»). Благодаря симбиозам с ППМ улучшается минеральное питание (преимущественно, азотное и фосфорное) и водоснабжение растений, повышается их устойчивость к патогенам и стрессам; некоторые ППМ выделяют биологически активные вещества, непосредственно стимулирующие рост растений [3].

АМ формируется большинством наземных растений (80-90%) и грибами филума *Glomeromycota*. Симбиоз облигатен для грибов и характеризуется низкой специфичностью взаимодействия партнеров. Симбиотический компартмент, арбускула, обеспечивающий тесную метаболическую интеграцию партнеров, представляет собой сильно разветвленную внутриклеточную грибную структуру [4]. АМ существует уже около 400 млн. лет и считается предковой формой симбиоза высших растений с микроорганизмами, что подтверждается данными палеоботаники и молекулярной филогении, основанной на анализе последовательностей консервативных генов растений и грибов [2, 5-7]. Оставаясь на протяжении сотен миллионов лет практически без морфологических изменений, грибы *Glomeromycota* являются поистине «живыми ископаемыми» [6]. Они представляют собой уникальную монофилетическую группу, произошедшую от общего предка, появившегося в эволюции раньше, чем первые наземные растения [5]. Предполагается, что именно симбиоз с грибами АМ позволил растениям перейти к наземному образу жизни, а анатомия корневой системы совре-

менных микотрофных растений свидетельствует о том, что она эволюционировала в симбиозе с АМ грибами [8].

БРС появился в эволюции значительно позже АМ, поскольку возраст Бобовых (*Fabáceae*) насчитывает около 60 млн. лет [9]. При БРС на корнях растений развиваются специализированные структуры – клубеньки, фиксирующие атмосферный азот. Бактерии в клубеньках дифференцируются в бактериоды, находящиеся внутри специализированных внутриклеточных компартментов – симбиосом. Клубеньковые бактерии, или ризобии, принадлежат к различным филогенетически удаленным друг от друга таксонам: (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* и др.) [10, 11]. Напротив, все растения, способные формировать азотфиксирующие клубеньки, включая БРС и актиноризу (с актинобактериями *Frankia* sp.), принадлежат к единому таксону – кладе Розиды I (Эурозиды I) [9]. Вероятно, общий предок этой клады не формировал клубеньки, но уже имел преадаптации, позволившие этим симбиозам появиться в ходе эволюции. Эти преадаптации могут быть разделены на две относительно независимые группы: (1) различные механизмы, необходимые для формирования АМ, в том числе контроль микросимбионта в тканях растения; (2) способность растения формировать специальные ткани/органы и внутриклеточные компартменты, характерные для различных азотфиксирующих симбиозов [2].

С использованием методов генетики, клеточной и молекулярной биологии был получен обширный материал для анализа преадаптаций первой группы. Было выявлено множество сходных процессов в ходе развития БРС и АМ, а также «общих» генов бобовых (*Sym*-генов и «симбиозинов»), участвующих в них. Секвенирование ряда «общих» *Sym*-генов показало, что они *кодируют* ключевые компоненты общего для обоих симбиозов сигнального каскада (общего симбиотического пути, или CSP, от англ. «common symbiotic pathway») [3, 6, 12-15]. Некоторые из описанных процессов, в частности регулируемых генами CSP, также задействованы в механизмах взаимодействия растений с актинобактериями, РГРВ и битрофными патогенами [7, 13, 16-18]. Таким образом, некоторые растительные гены, вовлеченные во взаимодействие растений и грибов АМ, были «заимствованы» растениями для использования в программах развития БРС и других мутуалистических растительно-микробных симбиозов, а также, возможно, в системах устойчивости растений к патогенам. Более того, генетическая система растения, контролирующая развитие АМ, по-видимому, в значительной степени перекрывается с генетической системой, контролирующей развитие корней и минеральное питание растений, поскольку очевидно, что эволюция корневой системы современных наземных растений происходила при постоянном взаимодействии с грибами АМ [8].

Экспериментальный мутагенез растений позволяет смоделировать процесс эволюции растительно-микробных симбиозов, в частности БРС и АМ. Предполагается, что фенотипы мутантов бобовых по *Sym*-генам, про-

являющиеся как остановка развития симбиоза на различных стадиях, отражают отдельные этапы его эволюции [14].

Процесс перехода от АМ к морфологически более выраженному симбиозу, БРС, сопровождался повышением уровня специфичности взаимодействий, что отразилось в сужении круга партнеров, способных к образованию симбиоза. Среди БРС наиболее эволюционно развитый симбиоз, формируемый «галегоидными» бобовыми, проявляет и наиболее строгую специфичность [10]. Высокая специфичность БРС обусловлена синтезом ризобияльных липохитоолигосахаридных молекул (Nod-фактора), специфической сигнальной молекулы строго определенной структуры, рецепция которой растением приводит к запуску CSP и, как следствие, формированию БРС [3, 5, 12, 14]. Напротив, специфичность АМ относительно невысока, поскольку в формировании этого симбиоза задействованы достаточно универсальные и консервативные регуляторные системы растения [5, 7]. Выделяемая грибами АМ сигнальная молекула, Мус-фактор, по структуре оказалась очень близкой к Nod-фактору, однако значительно менее сложной [15].

В эволюции симбиотрофии наземных растений наблюдаются две противоположные стратегии. «Первые» наземные растения не имели нормальной корневой системы, позволяющей не только закрепляться на поверхности, но и эффективно усваивать питательные вещества из почвы. Поэтому, очевидно, они были облигатными биотрофами [5, 8]. Одной из новых стратегий, приобретенных в ходе эволюции, является отказ от симбиотрофии и переход к «автотрофному» питанию. Крайними случаями этой стратегии является полный отказ от симбиотрофии у Капустных (*Brassicaceae*) (ранее Крестоцветных) и некоторых коммерческих сортов бобовых, селекцию которых проводили на фоне высоких доз минеральных удобрений. Большинство современных растений являются миксотрофами, способными как к автономному, так и симбиотрофному усвоению питательных веществ, и образуют разные типы симбиозов. Противоположная стратегия – полный отказ от фотосинтеза и формирование мико-гетеротрофных ассоциаций, например, у некоторых орхидей [2, 4].

Важную роль в эволюции взаимодействий растений и микроорганизмов играют конвергенция и параллельная эволюция. Растения обладают универсальными генными системами [19], способными контролировать базовые функции эндосимбиоза. Таким образом, по-видимому, растения-хозяева развивали сходные механизмы в ходе коэволюции с различными микроорганизмами [2]. В свою очередь, различные группы ППМ приобретали сходные механизмы адаптации к существованию в непосредственном контакте с различными тканями растений, используя более древнюю программу развития АМ [2, 20]. Действительно, микросимбионты многих других мутуалистических растительно-микробных симбиозов, включая клубеньковые бактерии [10, 11], представляют собой полифилетические группы,

что свидетельствует о более позднем появлении этих симбиозов в ходе параллельной эволюции.

Наиболее яркий пример адаптации микроорганизмов – приобретение различными неродственными видами клубеньковых бактерий способности к синтезу Nod-фактора. Эта молекула, близкая по структуре к Мус-фактору грибов АМ [15], является нехарактерным для бактерий хитин-подобным соединением. Предполагается, что «первые» ризобии использовали стратегию «молекулярной мимикрии», и впоследствии способность к синтезу Nod-фактора распространилась среди почвенных бактерий путем горизонтального переноса генов [2]. Некоторые ризобии образуют клубеньки и без участия Nod-фактора [21]. Поэтому, вероятно, существуют механизмы адаптации, не связанные с программами развития АМ.

Существует несколько гипотез происхождения клубеньковых бактерий. Согласно наиболее распространенному мнению, ризобии могли произойти от патогенных бактерий или РGPB, например агробактерий, что подтверждается экспериментами с использованием генетической трансформации бактерий, или азоспирилл, на что может указывать их таксономическое сходство с некоторыми ризобиями [2, 10]. Эта гипотеза подтверждается также тем, что ризобии могут выступать в качестве РGPB (ризосферных и эндофитных) для некомплементарных видов бобовых и широкого спектра небобовых растений [22], таким образом, вероятно, отражая ранние этапы эволюции клубеньковых бактерий.

По мнению авторов, наиболее вероятными предшественниками «первых» ризобий являются бактерии-спутники АМ грибов, среди которых есть внутриклеточные или обитающие на поверхности мицелия (включая бактерии-азотфиксаторы) [23, 24]. Именно грибы АМ могли служить эффективным средством доставки бактерий в ткани растений, и, возможно, «первые» ризобии получили гены, необходимые для синтеза хитин-подобных сигналов, напрямую от грибов [25]. Обнаружено таксономическое родство бактерий, формирующих БРС с относительно древним подсемейством бобовых Мимозовые (*Mimosoideae*), с некоторыми бактериальными эндосимбионтами грибов АМ [11, 24]. Для понимания роли этих бактерий в эволюции БРС необходимы дальнейшие сравнительные молекулярно-генетические исследования разнообразных видов ризобий и бактериальных спутников грибов.

Таким образом, предполагается, что эволюция различных мутуалистических растительно-микробных систем происходила путем преобразования АМ в БРС и другие симбиозы. Однако данное преобразование не сопровождалось вытеснением исходного грибного симбионта. Существование подобной исторической преемственности позволяет рассматривать эти симбиозы как единый «эволюционный растительно-микробный континуум» [2]. При этом «многосторонний» симбиоз (растения + грибы + бактерии) может рассматриваться как предковый по отношению к «двухстороннему» симбиозу (например, азотфиксирующим клубенькам). Продемонс-

трировано, что инокуляция бобовых комплексом ППМ более эффективна по сравнению с моноинокуляцией. Кроме того, выявлен высокий уровень полиморфизма бобовых по отзывчивости на комплексную инокуляцию [3]. Полученные знания о механизмах эволюции симбиозов растений будут способствовать созданию новых коммерческих сортов растений как биоинженерными методами [2, 7], так и традиционными методами селекции [3, 13]. Селекция растений на повышение эффективности их взаимодействия с комплексом ППМ позволит «вернуть» растения к естественному, симбиотрофному типу питания и эффективно использовать потенциал мутуалистических растительно-микробных симбиозов в практике адаптивного растениеводства.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (Гос. контракты № 02.740.11.0276, 16.512.11.2155, П1304), грантов: президента РФ (НШ-3440.2010.4), РФФИ (09-04-91054, 10-04-00961, 10-04-01146), NWO-047.117.2005.006 (Нидерланды).

Литература

1. Margulis L. 1998. Symbiotic planet: a new look at evolution. Perseus Books Group, Amherst, MA
2. Проворов Н.А. 2009 // Ж. общ. биол. 70(1):10–34.
3. Shtark O.Y. et al., 2010 // Soil microbiology and sustainable crop production, G.R. Dixon, E.L. Tilston. (eds) Dordrecht: Springer. P. 119–196
4. Smith S.E., Read D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, 3rd ed. Maryland Heights, USA: Elsevier, Academic Press. 800 p.
5. Schüßler A. 2002 // Plant Soil 244:75–83
6. Parniske M. 2008 // Nature Rev. Microbiol. 6:763–775
7. Markmann K., Parniske M., 2009 // Trends Plant Sci. 14(2):77–86
8. Brundrett M.C. 2002 // New Phytol. 154:275–304.
9. Sprent J. 2007 // New Phytol. 174:11–25.
10. Sprent J. 2001 // Nodulation in Legumes. Kew, Royal Botanical Gardens: Cromwell
11. Press Ltd. 146 p.
12. Balachandar D. et al., 2007 // Biotechnol. Molec. Biol. Rev. 2:49–57
13. Жуков В.А. и др. 2009 // Генетика. 45(11):1449–1460.
14. Genre A. et al. 2009 // Plant Physiol. 149:1424–1434 .
15. Provorov N.A. et al. 2010. Developmental genetics of plant-microbe symbioses. NY, USA: Nova Science Publishers, 152 p.
16. Maillet F. et al. 2011 // Nature. 469:58–64.
17. Parniske M. 2000 // Curr. Opin. Plant Biol. 3:320–328
18. Takemoto D., Hardham R. 2004 // Plant Physiol. 136:3864–3876
19. Sanchez L. et al. 2005 // Plant Physiol. 139:1065–1077
20. Cronk Q.C.B et al. 2002. Developmental genetics and plant evolution. Boca Raton: CRC Press. 543 p.
21. Проворов Н.А. и др. 2008 // Генетика. 44(1):12–28 .
22. Deakin W.J., Broughton W.J. 2009 // Nature Rev. Microbiol. 7:312–320 .
23. Sessitsch A. et al. 2002 // Crit. Rev. Plant Sci. 21:323–378..

24. *Barea J.M. et al.* 2005 // *J. Exp. Botany*. 56(14):1761–1788 .
25. *Artursson V. et al.* 2006 // *Environ. Microbiol.* 8:1–10.
26. *Hirsch A.M. et al.* 2001 // *Plant Physiol.* 127:1484–1492.

Резюме

Бобово-ризобиальный и другие растительно-микробные симбиозы сформировались на основе преадаптаций, возникших у растений в ходе коэволюции с грибами арбускулярной микоризы. Эти симбиозы, включая арбускулярную микоризу, могут рассматриваться как единый «эволюционный растительно-микробный континуум». Полученные знания могут быть использованы в адаптивном растениеводстве.

Legume-Rhizobium and other plant-microbe symbioses formed on the basis of pre-adaptations that occurred in the plants during coevolution with arbuscular mycorrhizal fungi. The symbioses, including arbuscular mycorrhiza can be considered as a single “evolutionary plant-microbial continuum”. The obtained knowledge can be used in sustainable agriculture.

МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

БЕЛОЗОРОВА О.А.

ГУ “Інститут дерматології и венерології АМН України”, Україна, 61057,
Харьков, ул. Чернышевского, 7/9, e-mail:olya_abe@yahoo.com

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗНЫХ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ГЕНА *OMP1 CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Инфекции, вызванные *Chlamydia trachomatis* относятся к наиболее распространенным инфекциям человека, среди них мочеполовой хламидиоз, паховая лимфогранулема, болезнь Рейтера, трахома и др. [1]. Ежегодно во всем мире фиксируются 90 миллионов новых случаев заражения, при этом 75% случаев хламидиоза протекают бессимптомно.

Одним из основных интегральных мембранных белков *C. trachomatis* является главный белок наружной мембраны или МОМР (Major Outer Membrane Protein). Данный белок занимает более 60% поверхности клетки и относится к группе поринов. Он во многом определяет структурную интеграцию внеклеточного инфекционного элементарного тельца в клетку-хозяина и преобразование элементарного тельца во внутриклеточное ретикулярное, обеспечивающее дальнейшее развитие возбудителя [6].

Белок МОМР *C. trachomatis* является высокоиммуногенным. Антигена к МОМР предупреждают инфекцию элементарными тельцами *C. trachomatis*, что свидетельствует о его протективных свойствах, он не только вызывает выработку специфических антител, но и активизирует Т-лимфоциты, включая CD4+ и CD8+ Т-клетки, усиливает секрецию ФНО- γ [6]. МОМР содержит целый ряд эпитопов, характеризующихся родо-, видо- и серовароспецифичностью [2, 5], он состоит из пяти константных и четырех варибельных доменов [3]. Последние отличаются по своей первичной структуре у различных серотипов хламидий и играют важную роль в формировании специфического иммунитета.

Учитывая высокую иммуногенность МОМР большой интерес представляет использование его для диагностики, а также, возможно, для иммунопрофилактики и иммунотерапии хламидиозов. Вместе с тем, получение очищенного протеина МОМР стандартными методами из биомассы возбудителя является достаточно трудной задачей. В связи с этим представляется перспективным использовать для получения препарата МОМР современных молекулярно-биологических методов, т.е. клонирование, а затем и экспрессию МОМР в клетках *Escherichia coli*.

Учитывая ряд особенностей структуры и физико-химических свойств МОМР представляется целесообразным получить не весь МОМР, а его отдельные фрагменты. Белок МОМР кодируется геном *omp1* размером около 1100 пар нуклеотидов. Экспрессия гена такого размера не всегда проходит достаточно просто. Кроме того, МОМР как мембранный белок характеризуется гидрофобностью и в чистом виде образует трудно растворимые агрегаты, что затрудняет его использование.

Также следует отметить, что различные векторные системы для клонирования в бактериальных клетках обеспечивают разную эффективность включения ДНК-вставки в плазмидный вектор, а при использовании низкокопийных векторов значительно снижает вероятность получения достаточного количества генно-инженерного продукта.

В связи с этим **задачей** настоящего исследования явилось клонирование фрагментов гена *omp1 C. trachomatis* в клетках *E. coli* с использованием двух векторных систем.

Материалы и методы

Для клонирования использовали ампликоны фрагментов гена *omp1*, полученных из клинических образцов больных с урогенитальным хламидиозом, находившихся на лечении в ГУ «Институт дерматологии и венерологии АМН Украины».

Выделение ДНК из культуры *C. trachomatis* проводили гуанидиновым методом [7].

Аmplифицировали три фрагмента МОМР: VS1+VS2, VS3+VS4 и VS4. Для этого использовали пары праймеров: 5'-tcggatccggagtgtaaatggtctcgagc-3'/5'atgcaagctactgtaactgcgtattgtctg3', 5'tcggatcctctccatacgctcaatc3'/5'caactgcagacaaaattatacaattaatagaagcgg-3' и 5'ctagttattgctcagcgtgg3'/5'ccgcgaaataatcagactca3'. Амплификацию проводили на амплификаторе Терцик («ДНК технология», Россия). Режимы амплификации были одинаковыми для трех фрагментов: денатурация 96°C 20 секунд, отжиг 57°C 15 секунд, синтез 75°C 40 секунд.

Полученные ампликоны анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% геле агарозы с добавлением бромида этидиума с последующим визуальным контролем образовавшихся фрагментов на трансиллюминаторе («Биоком», Россия) при длине возбуждающего света 310 нм. Очистку ампликона от Taq-полимеразы и трифосфатов проводили с помощью протеиназы К [7].

Для получения липких концов, полученные ампликоны обрабатывали рестриктазами BamHI и Hind III, PstI (Fermentas, Литва).

Для клонирования использовали векторы pQE-80L (Qiagen) молекулярной массой 4.7 тысяч пар нуклеотидов и pRSETa (Invitrogen) с молекулярной массой 2.9 тысяч пар нуклеотидов, несущие гены устойчивости к ампициллину. Они так же подвергались обработкам соответствующими

рестриктазами. Лигирование ампликонов и плазмидной ДНК проводили по стандартной методике для липких концов [7].

Полученными конструктами трансформировали бактериальные клетки штаммов *E. coli* XL1-Blue и BL21(DE3)pLysE. Компетентные клетки получали с использованием хлористого кальция [7]. Скрининг полученных клонов проводили путем посева одиночных колоний после трансформации на среду LB с последующей инкубацией в течение ночи при 37°C. После чего проводилась ПЦР на фрагмент гена *omp1* для выявления клеток, несущих необходимую ДНК-вставку (рис. 1).

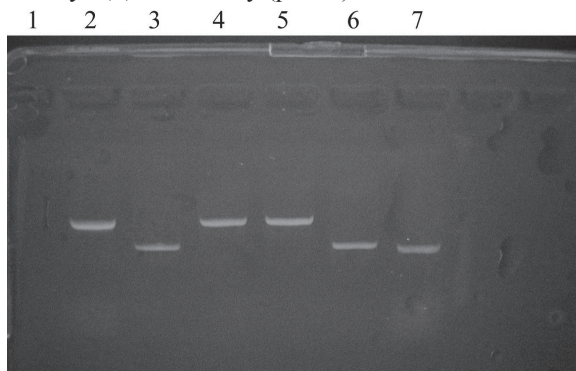


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР на фрагменты гена *omp1 Chlamydia trachomatis*, полученная при выявлении трансгенных колоний. Трек 1 – отрицательный контроль амплификации, треки 2, 4, 5 – ампликоны третьего и четвертого домена гена *omp1*, треки 3, 6, 7 – ампликоны четвертого домена гена *omp1*.

Для подтверждения наличия вставки было также проведено секвенирование генноинженерных конструкций на секвенаторе ABI Prism Genetic Analyzer 3100 фирмы Applied Biosystems с использованием соответствующих праймеров. Результат секвенирования анализировали программой “Chromas Lite”.

Фрагмент полученной секвенограммы вектора pRSETa, содержащего два домена гена *omp1 Chlamydia trachomatis*, приведен на рис. 2.

Результаты и обсуждение

Было проведено клонирование трех фрагментов гена *omp1 C. trachomatis* в разных бактериальных экспрессирующих векторах – pRSETa и pQE-80L. Первый фрагмент содержал первый и второй домены, второй – третий и четвертый, а третий – четвертый домен соответствующего гена. В значительной степени успех клонирования зависел от качества и степени очистки плазмидной ДНК.

50 60 70 80 90 100 110 120
ГСТСАТСАТСАТСАТСАТСАТГГТАТГГГСТАГСАТГАСТГГТГГАСАГСАААТГГГТГСГГГАТСТГТАСГАСГ

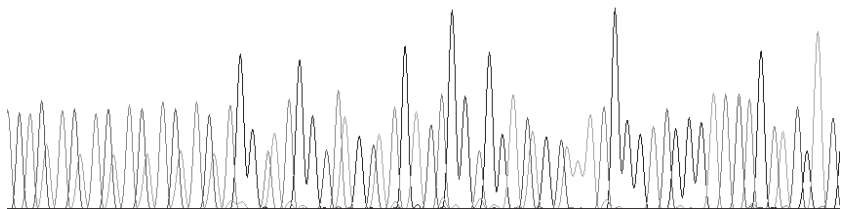


Рис. 2. Фрагмент электрофореграммы, полученной при секвенировании вектора pRSETa, содержащего два домена гена *omp1 Chlamydia trachomatis*.

При выделении плазмидной ДНК с помощью метода щелочного лизиса в ряде случаев получали препарат ДНК, плохо расщепляющийся рестриктазами. Мы предполагаем, что данные серии препарата плазмидной ДНК были частично денатурированы слишком длительным действием щелочи.

Важным моментом является также часто наблюдаемое загрязнение образцов выделяемой плазмиды РНК и геномной ДНК, которые могут нарушать процесс связывания ампликонов с плазмидной ДНК по сайтам рестрикции. Удалось значительно снизить уровень загрязнения плазмидной ДНК тщательным соблюдением температурного режима при выделении препарата, а также добавлением в литическую смесь РНКазы на конечных этапах процесса выделения.

Среди методов контроля клонирования следует особо отметить проведение ПЦР для идентификации трансгенных колоний *E. coli* среди общей массы колоний после высева трансформированных клеток на плотную среду. Этот метод отличается относительной дешевизной и доступностью проведения в сравнении с другими, такими как секвенирование, для которого требуется дополнительное дорогостоящее оборудование. Однако, именно этот метод позволяет исключить часто наблюдаемое при клонировании образование артефактных структур и комплексов встраиваемых ампликонов, а также возможные нарушения структуры плазмидной ДНК. К сожалению, даже амплификация клонируемого фрагмента с помощью специфических праймеров не позволяет выявить образование таких артефактных структур.

Выводы

Получены клоны фрагментов гена *omp1 Chlamydia trachomatis* из клинических образцов, которые могут быть использованы для получения рекомбинантных фрагментов главного белка наружной мембраны хламидий.

Наиболее эффективными методами контроля клонирования являются ПЦР на ДНК-вставку и секвенирование клонируемого фрагмента чужеродной ДНК.

Литература

1. *Мавров Г.И.* Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика. – Киев. – 2005. – 524 с.
2. *Batteiger, B. E., Newhall, W.J., Terho, V. P. et al.* Antigenic analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* with murine monoclonal antibodies. // *Infection and Immunity*. – 1986. – Vol. 53, P. 530-533.
3. *Choi TY, Kim DA, Seo YH.* Evaluation of serotyping using monoclonal antibodies and RFLP for *Chlamydia trachomatis* serotype identification // *Journal of Korean Medical Sciences*. – 2001. – Vol. 16, N 1. – P.15-19.
4. *Justrand M., Falk L., Fredlund H. et al.* Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 Genotypes among Sexually Transmitted Disease Patients in Sweden // *J.Clin.Microbiol.* 2001. – v.39, No.11. – P.3915-3919.
5. *Falk L, Lindberg N, Jurstrand M et al.* Genotyping of *Chlamydia trachomatis* would improve contact tracing // *Sexually Transmitted Infections*. – 2003. – Vol. 30, N 3. P. 205-210.
6. *Findlay H. E., McClafferty H., Ashley R. H.* Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein // *BMC Microbiology*. – 2005. – Vol.5, No.5.
7. *Sambrook, J., Russell, D.W.* Molecular cloning: a laboratory manual, the third edition.- Cold Spring Harbor laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. – 2222 p.

Резюме

Методами молекулярного клонирования були отримані клоны трьох фрагментів гена *omp1* в експрессионних векторах pQE-80L і pRSETa. В подальшому клоны можуть бути використані для отримання рекомбінантних білків *Chlamydia trachomatis*.

Методами молекулярного клонування були отримані клоны трьох фрагментів гена *omp1* у експрессионних векторах pQE-80L та pRSETa. В подальшому, клоны можуть бути використані для отримання рекомбінантних білків *Chlamydia trachomatis*.

Three fragments of the *omp1* gene were cloned in expression vectors pQE-80L and pRSETa. These clones can be used for obtaining of recombinant proteins of *Chlamydia trachomatis*.

**БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р.¹, ФЕДОРОВИЧ Д.В.¹, БОРЕЦЬКИЙ В.Ю.¹,
ФАЮРА Л.Р.¹, ПИНЯГА Ю.В.¹, СИБІРНИЙ А.А.^{1,2}.**

¹ Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: boretsky@cellbiol.lviv.ua

² Department of Biotechnology and Microbiology, Rzeszów University, Ćwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów, Poland

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ SEF1p ТА YAP1p У РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ ТА МЕТАБОЛІЗМУ ЗАЛІЗА У ДРІЖДЖІВ *PICHIA GUILLIERMONDII*

Здатність дріжджів *Pichia guilliermondii* синтезувати великі кількості рибофлавіну (РФ) в умовах недостатнього забезпечення клітин за-

лізом викликає значний інтерес [1,2]. Ця властивість здатність до надсинтезу РФ мають також *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces subglobosus*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Candida famata*, *Candida albicans* [2, 6, 8, 9, 10].

Здатність *P. guilliermondii* до схрещування дозволяє застосовувати методи гібридологічного аналізу [10]. Окрім того встановлено нуклеотидну послідовність геному цих дріжджів і розроблено методи інсерційного та делеційного мутагенезу [7]. Таким чином *P. guilliermondii* є модельним об'єктом для вивчення генетичних механізмів регуляції біосинтезу вітаміну В₂ і гомеостазу заліза. У *P. guilliermondii* виділено 9 комплементарних груп мутантів (*rib80*, *rib81*, *hit1*, *red1-red6*), що конститутивно надсинтезують РФ, і дві групи мутантів (*rib83*, *rib84*), які нездатні до надсинтезу РФ [2, 9]. Цікаво, що пошкодження будь-якого із цих генів призводить до дефектів як в регуляції біосинтезу РФ, так і в транспорті заліза в клітини *P. guilliermondii*. Згадані мутації приводять також до оксидативного стресу, що може свідчити про участь стресового активатора транскрипції Yap1p у регуляції біосинтезу РФ та метаболізму заліза у *P. guilliermondii*. [4], Описано нездатний до надсинтезу РФ інсерційний мутант *C. famata*, дефектний за геном *SEF1* [5]. Можна припустити, що ортолог транскрипційного фактора Sef1p також задіяний у регуляції РФ у *P. guilliermondii*. У даній роботі описано конструювання та дослідження фенотипових характеристик штамів *P. guilliermondii* із делеціями генів, що кодуєть транскрипційні фактори Yap1p та Sef1p.

Матеріали і методи

Для делеції генів використано штам *P. guilliermondii* R66 (*ura3*, *hisX*) [7]. Дріжджі вирощували у синтетичному середовищі як описано раніше [8]. При вирощуванні ауксотрофних мутантів вносили відповідні амінокислоти та аденін – 40 мг/л та уридин – 400 мг/л. Отримання гібридів та основні принципи сегрегаційного аналізу описані в [8]. Трансформацію дріжджів *P. guilliermondii* з використанням оцтовокислого літію проводили як описано [7]. Визначення негемінового заліза проводили з 2,2'-дипіридиллом; вміст флавінів в культуральній рідині визначали флюорометрично на апараті ЕФ-3М.

Конструювання делеційних касет і штамів. Фрагмент хромосомної ДНК *P.guilliermondii* довжиною 4,7 т.п.н., що містить ген PGUG_03868.1 (позначений *PgSEF1*) з промоторною і термінаційною послідовностями, ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції із праймерами, що несли 5' кінцеві EcoRI сайти (SEFd1 ATGAATTCATATAGCTTAACTACTTC і SEF2r ACGAATTCGTTGATTTGTGTGACCAC), використовуючи геномну ДНК штаму *P.guilliermondii* ATCC6260 як матрицю. Отриманий фрагмент ДНК гідролізували по EcoRI сайтах, і лігували в EcoRI сайт плазміди pUC57. За виключенням структурного гена *PgSEF1*, уся послідовність сконструйованої плазміди pSEF1 була ампліфікована, із прай-

мерами BseI AAAGATCTTTTTAGGGTGAATTAGTG та RBS2 CTAGATCT AGTGATGACTTTTTGGGG. Даний ПЛР-продукт очищали, гідролізували за допомогою ендонуклеази BglII і лігували з 1,5 т.п.н. BamHI-фрагментом плазмиди рGKURA3, що містить модифікований ген *URA3 S. cerevisiae*. Сконструйована рекомбінантна плазміда рSEF1URA3 містила *URA3*-ген *S. cerevisiae*, розміщений між промоторною і термінаторною (~1,0 т.п.н. кожна) ділянками гена *PgSEF1*. EcoRI-фрагмент плазмиди рSEF1URA3 використовували як делеційну касету *sef1::URA3* для трансформації *ura3* мутанта (R-66) *P. guilliermondii*. Для ідентифікації $\Delta sef1$ мутантів *P. guilliermondii*, геномну ДНК прототрофних за уридином трансформантів тестували за допомогою ПЛР на присутність “гібридного” ДНК-сигналу, використовуючи праймери Ura32г CGGGATCCGGTAATAACTGA TATAATT та JB12 GTTATGACACAAGAAGCAGATAATG.

Фрагмент хромосомної ДНК *Pguilliermondii ATCC6260*, довжиною 3,4 т.п.н., що містить ген PGUG_00664.1 (позначений *PgAp1*) з промоторною і термінаторною послідовностями, ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції із праймерами, що несли 5' кінцеві XbaI сайти (JB44 GGTCTAGACCGTGAACCT CTTTTAT та JB45 CATCTAGATGAATCTTTGGAATAATCGAT), і клонували у XbaI сайт вектора рUC19. За виключенням структурного гена *PgAp1*, уся послідовність сконструйованої плазмиди рGAP1 була ампліфікована, використовуючи праймери що несли 5' кінцеві BglII сайти (JB46 CAAGACTTTGATTATATAGTTCGTGCATCA та JB47 TCAGATCTGATAAGTTTTCGTAAAAGG) і використана для клонування 1,5 т.п.н. BamHI-фрагмента плазмиди рGKURA3, що містить ген *URA3 S. cerevisiae* (див. вище). Отримана плазміда рGAP1URA3 містила *URA3*-ген *S. cerevisiae*, розміщений між промоторною (1,0 т.п.н.) і термінаторною (1,0 т.п.н.) ділянками гена *PgAp1*. XbaI-фрагмент плазмиди рGAP1URA3 використовували як делеційну касету *gap1::URA3* для трансформації *ura3* мутанта (R-66) *P. guilliermondii*. Для ідентифікації $\Delta gap1$ мутантів *P. guilliermondii*, геномну ДНК трансформантів (прототрофи за уридином) тестували за допомогою ПЛР на присутність “гібридного” ДНК-сигналу, використовуючи праймери Ura32г (див. вище) та JB48 GCAGATCCAAT TTGCTACCACAA.

Результати та обговорення

Ідентифікація та делеція генів транскрипційних факторів. Пошук гомологій до білка Sef1p *C. famata* (*D. hansenii* : DEHA0C17930g) [5] у геномі *P. guilliermondii* виявив кілька подібних білків, серед яких найбільш подібними є PGUG_03868.1, PGUG_00835.1 та PGUG_05411.1, що мають характерну послідовність, здатну формувати Zn(2)-Cys(6) двоядерний кластер. Проте, поліпептид, що кодується геном PGUG_00835.1, є значно меншої довжини (621 амк. залишок). В той же час поліпептид PGUG_03868.1 (821 залишок) за рівнем подібності до Sef1p *C. famata* суттєво переважає PGUG_05411.1. Таким чином, саме ген PGUG_03868.1 розміщений у пос-

лідовності 1115630-1118095– 4-го суперконтігу геному *C. guilliermondii*, кодує білок, що є найбільш вірогідним ортологом білка Sef1p *C. famata* (DEHA0C17930g). Фрагмент хромосомної ДНК *P.guilliermondii*, що містить ген PGUG_03868.1 клонували як описано у попередньому розділі і використовували для конструювання делеційної касети. Делеційну касету *sef1::URA3* вводили у клітини *ura3* штама (R-66) *P. guilliermondii* і за допомогою ПЛП аналізу ідентифікували кілька $\Delta sef1$ мутантів, у яких структурний ген *PgSEF1* було заміщено геном *URA3 S. cerevisiae* за механізмом гомологічної рекомбінації.

Пошук гомологій до білка Uap1p *C. albicans* (WO1: CAWG_02548.1) [3]. виявив потенційний олігопептид PGUG_00664.1, який має 221 (42%) ідентичний залишок та 78 споріднених замін (16%), що в сумі становить, 58% гомології. Таким чином, ген PGUG_00664.1 (*PgYAP1*), розміщений у послідовності 1164199-1165587 + 1-го суперконтігу геному *C. guilliermondii*, кодує білок, що є вірогідним ортологом білка Cap1p *C. albicans*. Як і у попередньому випадку, було сконструйовано касету із геном *URA3 S. cerevisiae*, що фланкований промоторною і термінаторною послідовностями гена *Pgyap1*, яку трансформували у клітини *ura3* мутанта *P. guilliermondii* (R-66). За допомогою ПЛП аналізу серед прототрофних за уридином трансформантів ідентифікували мутанти, у геномі яких структурний ген *PgYAP1* було заміщено геном *URA3 S. cerevisiae* за механізмом гомологічної рекомбінації.

За умов фізіологічного забезпечення залізом (3,6 мкМ) сконструйовані штами $\Delta sef1-1$ та $\Delta uap1-2$ практично не відрізнялись від вихідного штаму R66 (дикого типу) за продуктивністю флавіногенезу (рис). Проте виявилось, що вміст негемінового заліза у клітинах мутанта $\Delta uap1-2$ знижений приблизно в 1,8-2,2 рази порівняно до мутанта $\Delta sef1-1$ та вихідного штаму R66. $\Delta uap1-2$ мутант зберіг здатність до надсинтезу рибофлавіну за умов дефіциту заліза (0,18 мкМ), але його флавіногенна активність була знижена у 2,5-3,5 рази порівняно до вихідного штаму R66. В той же час, мутант $\Delta sef1-1$ повністю втратив здатність до надсинтезу РФ за цих умов, що характерно для описаного раніше мутанта *rib83* [8]. Тому було проведено генетичний аналіз сконструйованого нами мутанта *P. guilliermondii* $\Delta sef1$.

Для цього мутант *P. guilliermondii* $\Delta sef1 hisX$ було схрещено із штамом *P. guilliermondii* L3 (*adeX*), *P. guilliermondii* *rib81 adeX* та *P. guilliermondii* *rib83 adeX*. Встановлено, що всі диплоїди, крім *rib83x* $\Delta sef1$, зберігали здатність до регуляції біосинтезу РФ за участі йонів заліза, що свідчить про рецесивний характер мутації $\Delta sef1$. У той же час, ні диплоїд *rib83x* $\Delta sef1$, ні отримані із нього гаплоїдні сегреганти не були здатні до надсинтезу РФ за умов дефіциту заліза. Отримані гаплоїдні сегреганти генотипу *rib81* $\Delta sef1$ також були нездатними до надсинтезу РФ. Таким чином, отримані результати свідчать, що мутація *rib83* лежить у гені *SEF1*.

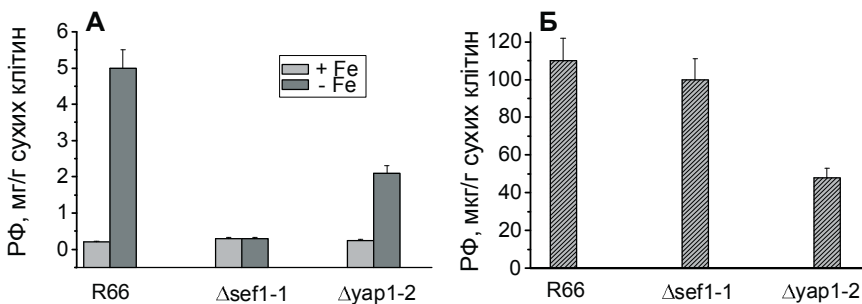


Рис. Продуктивність флавіногенезу (А) та вміст заліза в клітинах (Б) сконструйованих мутантів *P. guilliermondii*

Таблиця

Вплив мутації *Δsef1* на продуктивність флавіногенезу штамів *P. guilliermondii*

Штам*	Походження	Продуктивність флавіногенезу, μг/ мг сухої ваги клітин	
		Вміст заліза у середовищі 60μМ	Вміст заліза у середовищі 0.18μМ
Δsef1-1	Дана робота	0.31±0.04	0.31±0.04
R-66	[7]	0.20±0.03	4.5±0.4
rib83-	[8]	0.31±0.04	0.5±0.05
L2	[8]	0.25±0.04	8.2±0.4
rib81-130-1	[8]	5.5±0.3	8.0±0.4
Δsef1 / SEF1	Дана робота	0.28±0.04	3.2±0.3
Δsef1 RIB81 / SEF1 rib81	Дана робота	0.50±0.05	6.3±0.4
Δsef1 rib81	Дана робота	0.21±0.03	0.23±0.03
Δsef1 RIB83 / SEF1 rib83	Дана робота	0.09±0.02	0.24±0.03
S1	Дана робота	0.24±0.03	0.30±0.04
S2	Дана робота	0.22±0.03	0.29±0.04
S3	Дана робота	0.25±0.04	0.31±0.04

* вказано тільки мутації та гени, що мають відношення до регуляції біосинтезу РФ

Висновки. У дріжджів *P. guilliermondii* транскрипційні фактори SEF1p та YAP1p залучені у регуляцію біосинтезу РФ та поглинання заліза.

Література

1. Сибірний А.А., Федорович Д.В., Борецький Ю.Р., Вороновський А.Я. Мікробний синтез флавінів. Київ: Наукова думка, 2006, 191с.
2. Шавловський Г.М. Логвиненко Е.М. Сверхсинтез флавинов у мікроорганізмів та його молекулярні механізми // Прикл. біохімія та мікробіологія. – 1988. – Т. 24, №4. – С. 435-447.

3. Alarco AM and Raymond M. The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans* // J. Bacteriol. – 1999.- vol. 181, № 3. – P.700-70

4. Boretsky Y., Protchenko O., Prokopiv T., et al Mutations and environmental factors affecting regulation of riboflavin synthesis and iron assimilation also cause oxidative stress in the yeast *Pichia guilliermondii* // J Basic Microbiol. –2007.- vol.5, – P.371-377.

5. Dmytruk, K.V., Voronovsky, A.Y., Sibirny, A.A. Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. Curr. Genet. –2006.- vol.50, P.183-191.

6. Knight S.A., Lesuisse E., Stearman R., Klausner R.D., Dancis A. Reductive iron uptake by *C. albicans*: role of copper, iron and TUP1 regulator // Microbiology, –2002.- v.148, P.29-40.

7. Pynyaha Y., Boretsky Y., Fedorovych D., et al Deficiency in frataxin homologue *YFH1* in the yeast *Pichia guilliermondii* leads to missregulation of iron acquisition and riboflavin biosynthesis and affects sulfate assimilation. Biometals. –2009, –vol.22, – P.1051-1061.

8. Sibirny A.A. Nonconventional Yeasts in Biotechnology. Springer-Verlag, Heidelberg. 1996. – 489p.

9. Sibirny AA, Voronovsky AY. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Springer. Heidelberg. – 2009. – 438p.

10. Tanner F, Voinovich C., Van Lanen J.M. Riboflavin production by *Candida* species // Science., –1945.- vol.101, P.180 – 181.

Робота підтримана проектом № 45 міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України “Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій”

Резюме

Ідентифіковано і клоновано гени *P. guilliermondii*, що кодують транскрипційні фактори SEF1p та YAP1p. Сконструйовано штами із делеціями цих генів, які характеризуються значними змінами продуктивності флавіногенезу та вмісту заліза в клітинах. Таким чином, у *P. guilliermondii* фактори SEF1p та YAP1p залучені у регуляцію біосинтезу рибофлавіну та поглинання заліза.

Ідентифіковані гени *P. guilliermondii*, кодируючі транскрипційні фактори SEF1p та YAP1p. Сконструйовані штами з делеціями цих генів, характеризуються значними змінами продуктивності флавіногенезу та вмісту заліза в клітинах. Таким чином, у *P. guilliermondii* фактори SEF1p та YAP1p залучені у регуляцію біосинтезу РФ та поглинання заліза.

P. guilliermondii genes coding for transcription factors YAP1p and SEF1p were identified and cloned. *P. guilliermondii* strains deleted in genes *PgYAP1* and *PgSEF1* were constructed. Significant changes in both iron content and RF production were observed in constructed strains. Obtained results suggested that both transcription factors are involved in regulation of iron acquisition and RF biosynthesis by *P.guilliermondii*.

ВИНИЧЕНКО Н.А.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: vinia@bionet.nsc.ru

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ОБРАБОТКИ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ И САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА ПЦР-ПРОФИЛИ ФЕРМЕНТНЫХ ЛОКУСОВ

Обнаружено, что после помещения проклюнувшихся семян различных видов растений в условия повышенной температуры и пониженной влажности, молодые растения претерпевают глубокую физиологическую и биохимическую перестройку, значительно повышающую их жароустойчивость [1]. На основе этого явления был разработан метод предпосевого закаливания. В процессе закаливания помимо повышенной жароустойчивости, закаленные растения обнаруживают ярко выраженную тенденцию к усилению роста. Исследования показали, что стимуляционный эффект от закаливания связан с переходом хроматина в активное состояние [1]. Признак высокой жароустойчивости закаленных растений передается следующим поколениям, и это изменение носит характер длительной модификации, поскольку постепенно исчезает через несколько поколений [1].

Активизация хроматина в процессе температурной обработки семян можно отследить при помощи модифицированного метода ISSR-амплификации [2].

Материалы и методы

Растительный материал. Семена пшеницы сорта Новосибирская-15 были разделены на 3 группы по 35 зерен в каждой. Контрольную группу проращивали в чашке Петри при комнатной температуре. Вторую группу после набухания помещали на 1 час в термостат при температуре 40°C в условиях пониженной влажности. После чего проращивали в чашке Петри при комнатной температуре. Третью группу семян после набухания помещали на 1 сутки в холодильник при температуре 4°C, после чего проращивали в чашке Петри при комнатной температуре. На 6-е сутки после прорастания, растения были высажены в теплицу. Аналогичным образом после промывания в течение 24 ч проточной водой были обработаны три группы семян сахарной свеклы.

Выделение ДНК, ПЦР-амплификация. Суммарную ДНК растений выделяли из проростков стандартным СТАВ-методом [3].

Для проведения ПЦР-амплификации была использована следующие праймеры: для пшеницы *wh-malic1*, специфичный к локусу *me1* пшеницы, контролирующему цитозольные изоферменты ME1; *wh-got1*, специфичный к локусу *Got1*, контролирующему глутаматоксалоацетаттрансаминазу-1 пшеницы. Для сахарной свеклы использовали праймер *b-got1*, специфичный к локусу *Got1*, контролирующему глутаматоксалоацетаттрансаминазу-1 свеклы

В паре со специфическими праймерами использовали микросателлитный праймер mic2.

ПЦР-реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 10-200 нг суммарной ДНК, 65 мМ трис-НСl (рН 8.0), 16 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.05% твин-20, 1.5 мМ MgCl₂, 0.2 мМ каждого из dNTP, 1мкМ каждого праймера, 2.5 ед. акт. *Taq*-полимеразы. Был использован следующий температурный режим:

Предварительная денатурация – 94⁰ С (4 мин.)

Далее 30 циклов – 94⁰ С (1 мин.), 52⁰ С (42 сек.), 72⁰ С (4 мин.)

Последний цикл – 72⁰ С (7 мин.)

Продукты амплификации разделяли в 5% полиакриламидном геле (0.5xTBE буфер) и окрашивали бромистым этидием.

Результаты и обсуждение

Сравнение динамики прорастания контрольных и обработанных различными температурами семян

В процессе прорастания семян и дальнейшего роста были проведены замеры длины проростков до высаживания в теплицу и высоты надземной части растений, высаженных в теплице.

У пшеницы в первые дни прорастания наблюдается отставание в росте обработанных высокой температурой проростков. Но уже на 6-е сутки наблюдается выравнивание, а на 12-е сутки опытные растения, обработанные высокой температурой, уверенно обгоняют в развитии контрольную группу (Таблица 1). Растения, полученные из семян, обработанных низкой температурой, также до 6-х суток отстают в росте от контрольных, но на 12-е сутки начинают их обгонять.

Таблица 1.

Динамика роста контрольных и обработанных различными температурами растений пшеницы

Время после замачивания	Контрольная группа	Обработка высокой температурой	Обработка низкой температурой
2 сутки, средняя длина проростка	25мм	21мм	1мм
4 сутки, средняя длина проростка	103мм	96мм	55мм
6 сутки, средняя длина проростка	161мм	161мм	122мм
12 сутки, средняя высота надземной части растений	180 мм	232мм	185мм

Обработанные высокой температурой проростки свеклы в первые дни обгоняют в росте контрольную группу, на 17-ый день у высаженных в теплицу растений наблюдается некоторый спад роста, но в дальнейшем это отставание исчезает, и при замерах 42-го дня уже заметно значительное превосходство в росте опытных растений над контрольными (Таблица 2). Обработанные низкой температурой проростки в первые трое суток заметно

отстают от контроля, но на 17-ые сутки они от контроля не отличаются, а на 42-ые они также заметно превосходят контрольную группу.

Таким образом, воздействие низкой и высокой температуры оказывает существенное влияние на динамику роста растений пшеницы и сахарной свеклы.

Таблица 2.

Динамика роста контрольных и обработанных различными температурами растений сахарной свеклы

Время после замачивания	Контрольная группа	Обработка высокой температурой	Обработка низкой температурой
3 сутки, средняя длина проростка	23мм	29мм	3мм
17 сутки, средняя высота надземной части растений	95мм	86мм	92мм
42 сутки, средняя высота надземной части растений	475 мм	612мм	587мм

Динамика изменения ПЦР-профилей ферментных локусов контрольных и обработанных растений пшеницы и сахарной свеклы.

На электрофореграммах ПЦР-профилей растений пшеницы и сахарной свеклы не было обнаружено внутригрупповых различий. Поэтому на рисунках представлено по одному ПЦР-профилю от каждой группы. По мере развития растения происходит изменение ПЦР-профилей ферментных локусов.

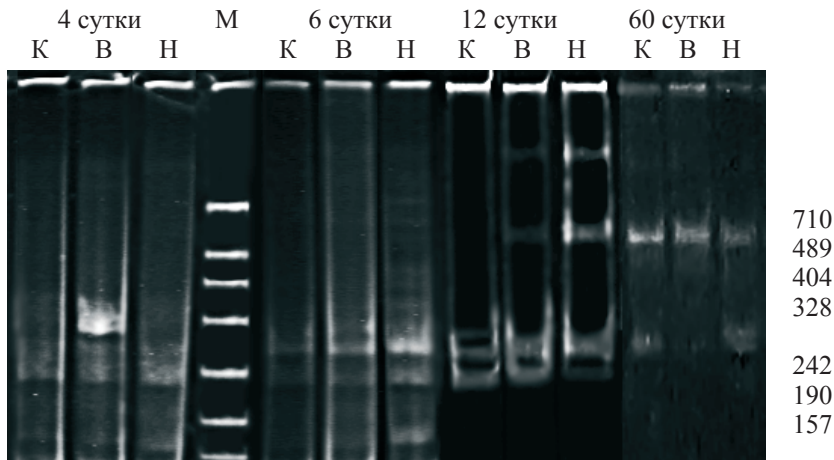


Рис. 1. Динамика изменения ПЦР-профилей локуса *Mel* контрольных и обработанных растений пшеницы. К – контрольная группа, В – обработка температурой 40°C, Н- обработка температурой 4°C, М – маркер.

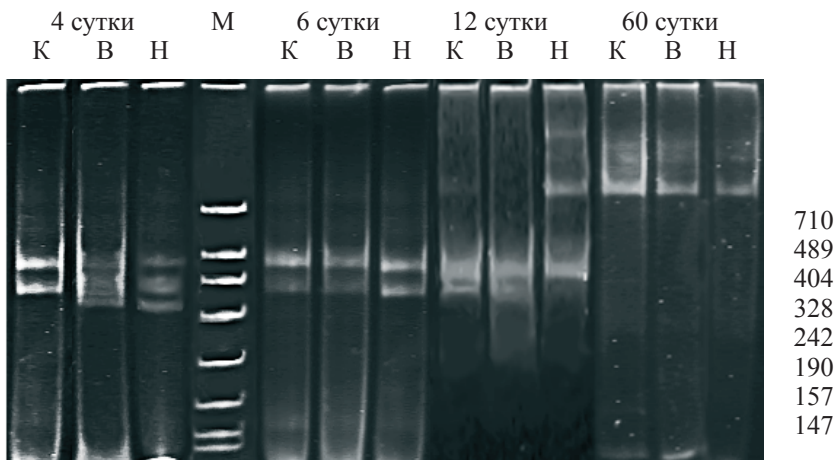


Рис. 2. Динамика изменения ПЦР-профилей локуса *Got1* контрольных и обработанных растений пшеницы. К – контрольная группа, В – обработка температурой 40°C, Н- обработка температурой 4°C, М – маркер.

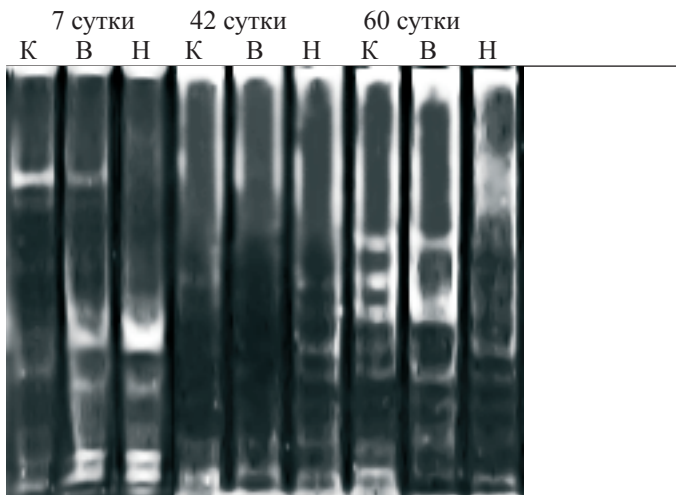


Рис. 3. Динамика изменения ПЦР-профилей локуса *Got1* контрольных и обработанных растений сахарной свеклы. К – контрольная группа, В – обработка температурой 40°C, Н- обработка температурой 4°C.

Например, различия ПЦР-профилей локуса *Me1* у растений пшеницы между группами наблюдаются на 4, 6 и 12 сутки (рис. 1), хотя ДНК, выде-

ленная на 60 сутки после прорастания, уже не показывает межгрупповых различий по данному локусу.

На рисунке 2 видны межгрупповые различия ПЦР-профилей локуса *Got1* у пшеницы на 4-е и 12 сутки после прорастания, хотя на 6 и 60 сутки различий в структуре хроматина у контрольных и опытных растений не выявлено.

У сахарной свеклы межгрупповые различия достаточно хорошо проявляются не только в начале прорастания, но и на более поздних сроках, на 42-й и 60-й день. Это хорошо видно на примере ПЦР-профилей локуса *Got1* (рис. 3). Следует отметить, что данная особенность свойственна и прочим ферментным локусам сахарной свеклы, данные по которым здесь не приводятся.

Выводы

Температурная обработка прорастающих семян пшеницы и сахарной свеклы влияет на ПЦР-профили ферментных локусов, что проявляется в появлении или исчезновении определенных полос в спектре. Эти изменения свидетельствуют об изменении состояния хроматина в районах хромосом, несущих данные ферментные локусы. Можно сделать вывод о том, что наблюдаемые изменения в динамике роста обработанных растений (стимуляция или ингибирование) представляют собой следствия изменений в геноме, связанных с изменением состояния хроматина.

Литература

1. Генкель П.А. Физиология жаро- и засухоустойчивости растений. – Москва. – 1982.
2. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Модификация метода ISSR – амплификации для изучения изменчивости аллелей локуса *Adh1* в агамоспермном потомстве сахарной свеклы // Фактори експериментальної еволюції організмів (Збірник наукових праць). Київ: «Логос». – 2006. – Т. 3. С. – 80-84.
3. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. –1987. – Vol. 19. – P. 11-15.

Резюме

Было показано, что воздействие высоких и низких температур на прорастающие семена оказывает влияние на ПЦР-профили ферментных локусов растений пшеницы и сахарной свеклы. Это свидетельствует об изменении состояния хроматина и может служить объяснением наблюдаемым изменениям скорости роста растений, а также известному из литературы повышению устойчивости растений к колебаниям температуры и влажности.

It was shown that exposure to high and low temperatures for germinating seeds affects the PCR-profiles of wheat and sugar beet enzyme loci. These changes indicate a change in chromatin state and may explain the observed changes in growth rate, and also known from the literature increasing resistance to variations in temperature and humidity.

**ЖУКОВ В.А., ГРИШИНА О.А., ЖЕРНАКОВ А.И., НЕМАНКИН Т.А.,
РЫЧАГОВА Т.С., СУЛИМА А.С., ТИТОВ В.С., ФЕДОРИНА Я.В.,
ШТАРК О.Ю., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии Россельхозакадемии,
Россия, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: zhukoff01@yahoo.com*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В ИЗУЧЕНИИ МУТУАЛИСТИЧЕСКИХ СИМБИОЗОВ

Растения семейства Бобовые (Fabaceae) способны к образованию мутуалистических (взаимовыгодных) симбиозов с полезными почвенными микроорганизмами (ППМ): арбускулярной микоризы (АМ) с гломусовыми грибами [9] и бобово-ризобияльного симбиоза (БРС) с клубеньковыми бактериями (ризобиями) [10]. Взаимодействия с симбиотическими грибами и бактериями улучшают водный статус и минеральное питание растения необходимыми элементами, прежде всего фосфором и азотом, а также повышают устойчивость растений к фитопатогенам и абиотическим стрессам [7].

В современной концепции земледелия бобовые культуры являются ключевым компонентом технологий производства сельскохозяйственной продукции [5; <http://www.grainlegumes.com/aep/>]. Применение микробных препаратов (микробиологических удобрений) на основе ППМ позволяет снизить затраты на агрохимикаты и уменьшить хемотропную нагрузку на окружающую среду, что соответствует принципам адаптивного земледелия [2]. По этой причине изучение генетических систем растения, ответственных за формирование мутуалистических симбиозов, представляет собой задачу, важную как для фундаментальной науки, так и ее прикладных аспектов.

Значительный успех в изучении генетических основ формирования мутуалистических симбиозов был достигнут за счет вовлечения в исследования модельных бобовых растений лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel.) Larsen) и люцерны слабоусеченной (*Medicago truncatula* Gaertn.), которые обладают сравнительно небольшим геномом и легко подвергаются молекулярно-генетическим манипуляциям. Сходство структурной организации геномов различных бобовых растений позволяет «переносить» достижения генетики, геномики и транскриптомики модельных бобовых на сельскохозяйственно-ценные бобовые культуры, такие как горох посевной (*Pisum sativum* L.) [13]. В данном сообщении освещены итоги и перспективы исследований генетического контроля развития симбиозов, образуемых горохом посевным, на основании комбинирования методологий классической и обратной генетики, а также сравнительной геномики.

Материалы и методы

Генетическое картирование: Для создания молекулярных маркеров были использованы последовательности генов гороха с известной локализацией в геноме (описание генов и последовательности праймеров приведены в работах [4, 14]). Фрагменты генов были амплифицированы и секвенированы у исследуемых линий гороха, затем на основании анализа полиморфизма были определены эндонуклеазы рестрикции, позволяющие различать аллельные состояния маркера. Позиции генов, гомологичных маркерам, были определены в геноме люцерны слабоусеченной путем компьютерного анализа.

В работе были использованы следующие мутантные линии гороха: SGENod-2 (*Pssym14*), RisNod24 (*Pssym36*), SGEFix-1 (*Pssym40*), RisFixV(*Pssym42*) и SGEcrt(*Pscrt*).

Картирование проводили на выборках поколения F₂ от скрещивания мутантных линий с тестерной линией NGB1238, имеющей нормальный фенотип клубнеобразования. Картирование генов *PsCrt* и *PsEr1* проводили на выборке F₂ (SGEcrt x I-x) (линия I-x, нормальная в отношении развития корневой системы, но несущая мутантную аллель *Pser1*, любезно предоставлена проф. Н. Уиденом (Prof. N. Weeden, Montana State University, MT, USA)).

Молекулярно-биологические процедуры: Геномную ДНК из растений гороха выделяли с использованием буфера СТАВ по модифицированному протоколу [8]; ПЦР проводили в термоциклерах iCycler™ (Bio-Rad, США) и Personal Cyler (Biometra, Германия). Секвенирование осуществляли на автоматическом приборе CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США) по протоколу производителя. Праймеры были синтезированы компанией «Евроген», Москва, Россия. Анализ рестрикционных фрагментов проводили в 3% агарозном геле.

Компьютерный анализ: В работе были использованы следующие программы и сайты:

– данные по секвенированию нуклеотидных последовательностей обрабатывали с помощью программного обеспечения автоматического секвенатора CEQ™ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, США). В программах Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) и ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) проводили множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей.

– подбор необходимых эндонуклеаз рестрикции для детекции полиморфизма фрагментов осуществляли в программе dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>).

– построение генетических карт проводили с помощью программы MapL98 (Prof. Yasuo Ukai, Graduate School of Agricultural Life Science, the University of Tokyo).

– определение позиций генов, гомологичных использованным маркерам, в геноме люцерны слабоусеченной, проводили путем поиска по алгоритму BLAST на сайтах http://www.medicago.org/genome/cvit_blast.php и http://www.medicagohapmap.org/advanced_search_page.php?seq.

– экспрессионный профиль генов-кандидатов в различных тканях растения оценивали путем поиска по алгоритму BLAST в базе данных MtGEA: *M. truncatula* Gene Expression Atlas / Noble Foundation (<http://bioinfo.noble.org/gene-atlas/v2>).

Результаты и обсуждение

Для определения нуклеотидных последовательностей симбиотических генов гороха, затронутых мутациями, используется методология сравнительного картирования, основанная на достижении сравнительной геномики бобовых растений. Для картирования мутантных генов в геноме гороха создан набор ген-специфичных молекулярных маркеров, распределенных по всем хромосомам гороха посевного [1]. Данные маркеры относятся к типу CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) и основаны на амплификации фрагмента определенного гена и специфичном расщеплении только одной из его аллелей определенной эндонуклеазой рестрикции [6].

Набор маркеров был использован для картирования симбиотических генов гороха *PsSym36*, *PsSym40* и *PsSym42*, позиции которых в геноме гороха были неизвестны. Для точного картирования генов *PsSym14*, *PsCrt* и *PsEr1*, ранее локализованных во II, V и VII группах сцепления, были также использованы маркеры, принадлежащие соответствующим группам сцепления.

В результате работы гены *PsSym42* и *PsSym40* были локализованы в V и VII группах сцепления, соответственно. Для последующей точной локализации данных генов были использованы маркеры, созданных на основе генов люцерны слабоусеченной, локализующихся в хромосомах 7 и 3, гомологичных V и VII группам сцепления гороха. На основании данных точного картирования гена *PsSym40* был выбран вероятный ген-кандидат люцерны слабоусеченной *MtEFD*, мутация в котором приводит к фенотипу, сходному с мутантным фенотипом *Pssym40* (появление множества мелких белых клубеньков с нарушенным строением симбиотических компартов) [11]. Секвенирование гена, гомологичного гену *MtEFD*, у мутантной линии SGEFix-1 (*Pssym40*) позволило выявить нуклеотидную замену в рамке считывания, приводящую к возникновению стоп-кодона и, вероятно, к синтезу укороченного белка. Таким образом, была идентифицирована последовательность гена гороха *PsSym40*, кодирующего транскрипционный фактор, участвующий в этилен-зависимом сигналинге при формировании азотфиксирующих клубеньков.

На основании результатов картирования гена *PsSym14* и сопоставления полученной генетической карты с физической картой генома люцерны, был

также выявлен вероятный ген-кандидат, гомологичный гену *LjCERBERUS* лядвенца японского. Мутанты лядвенца по этому гену характеризуются нарушениями ранних стадий развития азотфиксирующего симбиоза и подобны по фенотипу мутантам по гену гороха *Pssym14* [3, 12]. В настоящее время проводится секвенирование гена гороха, гомологичного *LjCERBERUS*, у мутантов по *Pssym14*.

На основании проведенной точной локализации гена *PsCrt* был также осуществлен поиск генов-кандидатов в фрагменте генома люцерны слабосусеченной, гомологичном верхней части V группы сцепления гороха, где был локализован ген *PsCrt*. Мутантов люцерны с фенотипом, подобным фенотипу *PsCrt*, не описано, поэтому при выборе генов-кандидатов использовали следующий подход. Был оценен экспрессионный профиль генов-кандидатов в различных тканях растения (согласно данным базы MtGEA), а также фенотип, описанный для мутантов арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. по гомологичным генам (www.arabidopsis.org). В результате были идентифицированы 4 гена-кандидата, последовательности которых были амплифицированы у гороха посевного. В настоящее время проводится секвенирование кодирующих участков генов-кандидатов у мутантной линии SGE_{Crt} и исходной линии SGE для выявления тождественности одного из них гену *PsCrt*.

Выводы

Применение подходов сравнительной генетики и геномики позволяет быстро и эффективно выявлять последовательности ключевых генов гороха, ответственных за функционирование симбиотических систем, изучать их полиморфизм и выяснять особенности развития симбиозов, отличающих горох посевной от других бобовых растений. Полученные знания могут быть использованы для создания новых сортов гороха посевного, эффективно взаимодействующих с ППМ. В целом, понимание генетических основ функционирования симбиотических систем, образуемых бобовыми растениями, является необходимой основой менеджмента «адаптивного» земледелия.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки (Гос. контракты №№ 02.740.11.0276, 16.512.11.2155 и П1304), грантов Президента РФ для поддержки ведущих научных школ (НШ-3440.2010.4), РФФИ (09-04-91054-НЦНИ_а, 10-04-00961-а, 10-04-01146-а), NWO-047.117.2005.006 (Нидерланды).

Литература

1. Жуков В.А., Неманкин Т.А., Овчинникова Е.С., Кузнецова Е.В., Жернаков А.И., Титов В.С., Гришина О.А., Сулима А.С., Борисов Я.Г., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Создание серии ген-специфичных молекулярных маркеров для сравнительного картирования геномов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) и диплоидной люцерны (*Medicago truncatula* Gaertn.) // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. / НАН України, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І.

Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов ред.) [та ін.] – К.: Логос, 2003-2010. Т. 9: Присвяч. 110-річчю від дня народж. Теодосія Григоровича Добржанського. – 2010.-500 с. С. 30-34.

2. *Кожемяков А.П., Чеботарь В.К.* 2005. Биопрепараты для земледелия // Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве) / под ред. И.А. Тихоновича и Ю.В. Круглова. – Москва.- 2005.- С. 18-54.

3. *Цыганов В.Е., Ворошилова В.А., Кукалев А.С., Якоби Л.М., Азарова Т.С., Борисов А.Ю., Тихонович И.А.* Гены гороха (*Pisum sativum* L.) Sym14 и Sym35 контролируют инициацию роста инфекционной нити в процессе развития симбиотических клубеньков // Генетика. – 1999. – Т. 35, № 3.- С. 352-360.

4. *Aubert G., Morin J., Jacquin F., Loridon K., Quillet M.C., Petit A., Rameau C., Lejeune-Henaut I., Huguet T., Burstin J.* Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume *Medicago truncatula* // Theor. Appl. Genet. – 2006. – vol. 112, № 6. – P. 1024-1041.

5. *Graham P.H., Vance C.P.* Legumes: importance and constraints to greater use // Plant Physiology. – 2003. – vol. 131, № 3. – P. 872-877.

6. *Konieczny A., Ausubel F.M.* A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers // Plant J. – 1993. – vol. 4, № 2. – P. 403-410.

7. *Provorov N.A., Shtark O.Y., Zhukov V.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A.* Developmental genetics of plant-microbe symbioses. NOVA Science Publishers Inc., New York, 2010. 135 p.

8. *Rogers S.O., Bendich A.J.* Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biol. – 1985. – vol. 5. – P. 69-76.

9. *Schüßler A., Schwarzott D., Walker C.* A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution // Mycol. Res. – 2001. – vol. 105, № 12. – P. 1413-1421.

10. *Sprent J.I.* Nodulation in Legumes. – Kew, Royal Botanical Gardens: Cromwell Press Ltd. – 2001. – 146 p.

11. *Vernie T., Moreau S., de Billy F., Plet J., Combiere J.P., Rogers C., Oldroyd G., Frugier F., Niebel A., Gamas P.* EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula* // Plant Cell. – 2008. – vol. 20, № 10. – P. 2696-2713.

12. *Yano K., Shibata S., Chen W.L., Sato S., Kaneko T., Jurkiewicz A., Sandal N., Banba M., Imaizumi-Anraku H., Kojima T., Ohtomo R., Szczyglowski K., Stougaard J., Tabata S., Hayashi M., Kouchi H., Umehara Y.* CERBERUS, a novel U-box protein containing WD-40 repeats, is required for formation of the infection thread and nodule development in the legume-Rhizobium symbiosis // Plant J. – 2009. – vol. 60, № 1. – P. 168-180.

13. *Young N.D., Udvardi M.* Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes // Curr. Opin. Plant Biol. – 2009. – vol. 12, № 2. – P. 193-201.

14. *Zhukov V.A., Kuznetsova E.V., Ovchinnikova E.S., Rychagova T.S., Titov V.S., Pinaev A.G., Borisov A.Y., Moffet M., Domoney C., Ellis T.H.N., Ratet P., Weeden N.F., Tikhonovich I.A.* Gene-based markers of pea linkage group V for mapping genes related to symbioses // Pisum Genetics. – 2007. – vol. 39. – P. 10-20.

Резюме

Описано применение подходов сравнительной генетики и геномики бобовых растений для выявления последовательностей ключевых генов гороха, ответственных за функционирование симбиотических систем.

The application of approaches of comparative genetics and genomics of leguminous plants is described, which are used for identification sequences of key genes of pea responsible for the functioning of the symbiotic systems.

КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: svetak@bionet.nsc.ru

ВЛИЯНИЕ ДОЗЫ АЛЛЕЛЕЙ *MDH1* И *MDH2* НА СООТНОШЕНИЕ ФЕНОТИПОВ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В АГАМОСПЕРМНОМ ПОТОМСТВЕ ТРИПЛОИДНОГО РАСТЕНИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Доза гена является одним из мощных факторов изменчивости у живых организмов и у растений в частности. Изменение дозы гена возможно при изменении уровня плоидности растения [1], амплификации генов [2] и политении хромосом [3]. Ранее нами было сделано предположение о том, что высокий уровень политении у растений сахарной свеклы может приводить к агамоспермному способу репродукции [4]. Агамоспермия – широко распространенный способ размножения у цветковых растений, основная особенность которого заключается в том, что развитие зародыша семени происходит при участии генома только одного родителя [5]. У сахарной свеклы существуют мейотическая и митотическая агамоспермия [6]. При мейотической агамоспермии зародыш образуется из клеток зародышевого мешка, образовавшегося после мейоза, что является основой полиморфизма в таких потомствах. При митотической агамоспермии зародыш семени образуется из клеток, не прошедших мейоз. Потомства, образующиеся таким путем теоретически должны быть однородны, однако в них также был выявлен полиморфизм маркерных ферментов [4, 7, 8].

В настоящее время предложена модель механизма, определяющего полиморфизм в потомствах, полученных путем митотической агамоспермии [9]. В основе этой модели лежит предположение о политении (эндоредупликации) хромосом в клетках зародышевого мешка, нуцеллуса или интегументов и об удалении избыточных копий хроматид из клетки, перешедшей к эмбриональному развитию. Согласно предложенной модели потеря избыточных копий хроматид (участков хроматид) происходит случайным равновероятным образом, в результате чего из множества присутствовавших в клетке хроматидных копий остаются в начавшей эмбриональное развитие клетке только две. Соотношение фенотипических классов в таком

случае определяется соотношением числа нитей хроматид в районах гомологичных хромосом, несущих аллели гетерозиготного маркерного локуса [9]. Предыдущие исследования проводились нами на диплоидных растениях сахарной свеклы, способных к агамоспермному размножению. В то же время представляет интерес рассмотрение соотношений фенотипических классов в потомствах триплоидных растений, у которых по данным литературы склонность к агамоспермии выше, чем у диплоидов.

Материалы и методы

В данное исследование были взяты семена сахарной свеклы, предоставленные С.И. Малецким и Е.И. Малецкой, представляющие собой агамоспермное потомство, полученное от пыльцестерильного триплоидного растения коммерческого сорта Irys в беспыльцевом режиме. В качестве маркерного признака были выбраны изоферментные спектры малатдегидрогеназы-1 и малатдегидрогеназы-2 (MDH1 и MDH2), контролируемые, соответственно, локусами *Mdh1* и *Mdh2*. Электрофоретический анализ проводили на индивидуальных семенах в крахмальном геле по стандартным методикам, описанным ранее [10]. Сканирование электрофореграмм проводили при помощи прибора Biodoc.

Теоретические расчеты частот фенотипов проводили по предложенному Холдейном методу, в основе которого лежит использование гипергеометрической схемы распределения вероятностей, применяемой для описания комбинаторных процессов [11]. Соответствие выявленных соотношений теоретически ожидаемым частотам оценивали с помощью критерия χ^2 [12].

Результаты и обсуждение

У сахарной свеклы на электрофореграммах выявляются две полиморфные зоны ферментативной активности малатдегидрогеназы: MDH1 (зона I) и MDH2 (зона II), контролируемые, соответственно, локусами *Mdh1* и *Mdh2* [13].

В исследованном агамоспермном потомстве, полученном от триплоидного растения сахарной свеклы, был выявлен полиморфизм по обеим зонам MDH. Полиморфизм по MDH2 представлен двумя фенотипическими классами (рис. 1), из которых класс SS выявлен в 150 семенах, а класс FS всего лишь в 22. Полиморфизм потомства по MDH2 указывает на гетерозиготность исходного материнского растения по гену *Mdh2*. Высокая частота аллеля *Mdh2-S* в агамоспермном потомстве позволяет предположить, что его доза у исходного материнского растения была выше, чем у аллеля *Mdh2-F*, что обеспечивалось двумя путями: 1) данное триплоидное растение несло две хромосомы с аллелем *Mdh2-S* и лишь одну хромосому с аллелем *Mdh2-F*, 2) аллель *Mdh2-S* был представлен числом копий, более, чем в 10 раз превышающем копийность аллеля *Mdh2-F*. Используя формулы, предложенные Дж. Холдейном [11], был проведен подбор вариантов копийности аллелей. Наиболее вероятное состояние аллелей локуса *Mdh2* у исход-

ного материнского растения следующее: аллель *Mdh2-F* – представлен 2 хроматидами одной хромосомы, аллель *Mdh2-S* – 8 хроматидами в другой хромосоме, и 16 хроматидами – в третьей хромосоме. Такому состоянию локуса *Mdh2* теоретически соответствует соотношение 1FF : 48FS : 276SS. Выявленное соотношение фенотипов хорошо соответствует теоретически ожидаемому ($\chi^2=1.091$; $P > 0.05$). Для обозначения такого состояния локуса предложен термин «полигенотип локуса», характеризующий число хромосом, аллельный состав, и число хроматид, несущих тот или иной аллель [14]. Таким образом, полигенотип локуса *Mdh2* у такого растения можно представить в сокращенном виде как $F_2S_8S_{16}$.

MDH1 была представлена тремя фенотипическими классами в соотношении 50FF : 75FS : 39SS. Основная часть гетерозиготных спектров MDH1 (FS) имеет симметричное распределение интенсивности изоферментов, характерное для диплоидных гетерозигот (рис. 1). Учитывая, что предыдущая оценка соотношений фенотипических классов MDH2 указывала на высокую копияность одного из аллелей, то наиболее вероятное объяснение выявленному соотношению заключается в том, что у данного растения две хромосомы несут аллель *Mdh1-F*, а одна хромосома – *Mdh1-S*, причем аллель *Mdh1-F* представлен в каждой из двух хромосоме 4 хроматидами, а аллель *Mdh1-S* – 8 хроматидами. Теоретическое соотношение фенотипов при такой копияности аллелей составляет 7FF : 16FS : 7SS. Выявленное соотношение довольно хорошо соответствует теоретически ожидаемому ($\chi^2=5.3886$; $P > 0.05$). Таким образом, полигенотип локуса *Mdh1* у этого растения можно представить в сокращенном виде как $F_4F_4S_8$.

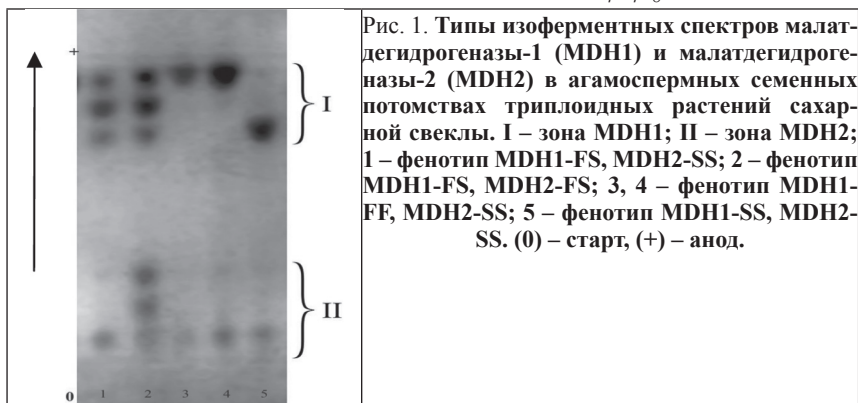


Рис. 1. Типы изоферментных спектров малатдегидрогеназы-1 (MDH1) и малатдегидрогеназы-2 (MDH2) в агамоспермных семенных потомствах триплоидных растений сахарной свеклы. I – зона MDH1; II – зона MDH2; 1 – фенотип MDH1-FS, MDH2-SS; 2 – фенотип MDH1-FS, MDH2-FS; 3, 4 – фенотип MDH1-FF, MDH2-SS; 5 – фенотип MDH1-SS, MDH2-SS. (0) – старт, (+) – анод.

Таким образом, выявленные соотношения фенотипических классов можно интерпретировать как результат политении участков хромосом, несущих аллели маркерных ферментных генов. Обращает на себя внимание различие в степени политении, рассчитанной у разных локусов: общая политенизация в локусе *Mdh1* равна 16, а в локусе *Mdh2* – 26. Это хорошо со-

гласуется с известными данными о разной степени политении в различных участках хромосом растений [15].

Рассчитанная степень политении различается в участках хромосом независимо от того, несут они разные аллели или аллели с одинаковым фенотипическим проявлением. Различие степени политении аллелей, имеющих одинаковое фенотипическое проявление, например, при полигенотипе по локусу *Mdh2 F₂S₈S₁₆*, может быть обусловлено различиями в происхождении аллелей. Известно, например, что у кукурузы в алкогольдегидрогеназном локусе *Adh1* существует 14 вариантов аллелей *Adh1-F* и 6 вариантов аллелей *Adh1-S* [16]. По-видимому, от особенностей структуры аллелей зависит их предрасположенность к определенной степени политении. Предполагаемая по результатам проведенного эксперимента высокая степень политении у аллеля *Mdh2-S* хорошо согласуется с его высокой частотой в популяциях сахарной свеклы. Высокая степень политении и, следовательно, большая доза одного из аллелей вызывает резкое смещение частот аллелей в агамоспермном потомстве индивидуального растения.

Рассмотренный механизм потери избыточных копий политенизированных участков хромосом возможен как при мейотической агамоспермии, так и при митотической агамоспермии. При мейотической агамоспермии соотношения, соответствующие свободному комбинированию участков хроматид, несущих аллели маркерного локуса, выявляются при удалении маркерного локуса от центромеры на расстояние более 50 сантиморганид. При тесном же сцеплении маркерного локуса с центромерой свободное комбинирование участков хроматид отсутствует, и возникает смещенное соотношение фенотипов, в большей степени соответствующее хромосомному расщеплению. Смещение в соотношении фенотипов при мейотической агамоспермии происходит вследствие диминуции избыточных копий участков хроматид. Комбинаторный процесс, обусловленный расхождением хромосом в мейозе и приводящий к полиморфизму при мейотической агамоспермии, можно обозначить термином «мейотическая автосегрегация». При митотической агамоспермии происходит «митотическая автосегрегация», обусловленная лишь диминуцией эндоредуплицированных участков хроматид, которая возможна при любом расположении маркерного локуса на хромосоме.

Работа финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009-2011 гг. и грантом РФФИ № 11-04-00424-а.

Литература

1. *Osborn T.C., Pires J.C., Birchler J.A. and et al.* Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids // *Trends in Genet.* – 2003. – V.19, №3. – P. 141–147.
2. *Cullis C.A.* Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax // *Annals of Botany.* – 2005. – V. 95. – P. 201–206.
3. *Carvalho G.* Plant polytene chromosomes // *Genet. Mol. Biol.* – 2000. – V. 23, № 4. – P. 1043–1050.

4. *Levites E.V., Denisova F.Sh., Kirikovich S.S. and Judanova S.S. (Maletskaya S.S.)* Ratios of phenotypes at the *Adh1* locus in the apozygotic offspring in sugarbeet (*C*₁ generation) // Sugar Tech. – 2000. – V. 2, № 4. – P. 26–30.

5. *Gustafsson A.* Apomixis in higher plants // Lunds. Univ. Arsskz. N.S. – Sect. 2. – 1946. – V. 42, № 3. – P. 1–67.

6. *Levites E.V.* New classification of the reproduction modes in sugar beet // Sugar Tech. – 2002. – V. 4, № 1–2. – P. 45–51.

7. 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.

8. *Levites E.V., Shkutnik T., Shavorskaya O.A., Denisova F.Sh.* Epigenetic variability in agamosperous progeny of sugar beet // Sugar Tech. – 2001. – V. 3, № 3. – P. 101–105.

9. *Levites E.V.* Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech. – 2005. – V. 7, № 2–3. – P. 67–70.

10. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. – Новосибирск: Наука, 1986. – 144 с.

11. *Haldane J.B.S.* Theoretical genetics of autopolyploids // J. Genet. – 1930. – V. 22, № 3. – P. 359–372.

12. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: «Вышэйш. Школа», 1973. – 320 с.

13. *Levites E.V., Юдина P.C., Малецкий С.И.* Генетический контроль НАД-зависимой малатдегидрогеназы у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Докл. АН СССР. – 1980. – Т. 255, № 4. – С. 989–991.

14. *Levites E.V.* Эндоредупликация как фактор изменчивости в половых и агамоспермных потомствах растений. – «Биология развития: морфогенез репродуктивных структур и роль соматических, стволовых клеток в онтогенезе и эволюции» (Матер. междунар. Конф.). – Москва. – 2010. – С. 77–80.

15. *Cionini P.G., Cavallini A., Corsi R., Fogli M.* Comparison of homologous polytene chromosome in *Phaseolus cocineus* embryo suspensor cells: morphological, autoradiographic and -cytophotometric analyses // Chromosoma. – 1982. – V. 86. – P. 383–396.

16. *Woodman J.G., Freeling M.* Identification of a genetic element that controls the organ-specific expression of *Adh1* in maize // Genetics. – 1981. – V. 98, № 2. – P. 357–378.

Резюме

Изучены соотношения фенотипических классов MDH1 и MDH2 в агамоспермном потомстве триплоидного растения сахарной свеклы. Показано, что соотношение фенотипических классов ферментов довольно хорошо соответствует расчетам, основанным на предположении о политении хромосом, приводящей к различным соотношениям доз аллелей ферментных генов в материнском растении. Полученные данные подтверждают предположение о специфическом механизме изменчивости при агамоспермии, основанном на равновероятной потере избыточных копий аллелей маркерных генов клеткой, вступившей в эмбриогенез.

The phenotypic classes ratios of MDH1 and MDH2 in the agamosperous progenies of a triploid plant were studied. It was shown that the ratios of enzyme phenotypic classes are in accord with calculations based on the hypothesis that chromosome polyteny leads

to different ratios of doses of enzyme allele genes in the maternal plant. The obtained data confirm the hypothesis that a specific mechanism of agamosperous progeny variability is based on the equiprobable loss of excessive copies of marker allele genes by cell have been entered embryogenesis.

КУЗОВКОВА А.А., РЕШЕТНИКОВ В.Н.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: floraia@nm.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ НУКЛЕОИДОВ ОЗИМОЙ РЖИ (*SECALE CEREALE*) С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА

Пластиды высших растений обладают кольцевым геномом (пластомом) из 120-200 тысяч пар оснований, который содержит гены, кодирующие белки, участвующие в фотосинтезе и транспорте электронов, а также компоненты, необходимые для транскрипции и трансляции внутри органеллы. Пластом организован с помощью белков, которые компактизируют ДНК в структуры, известные как нуклеоиды [1]. Помимо структурных ДНК-связывающих белков, нуклеоиды содержат все ферменты, необходимые для транскрипции и репликации, а также транскрипционные факторы, что позволяет изолированным нуклеоидам активно реплицироваться и транскрибироваться [2]. В высших растениях характеристики нуклеоидов изменяются в ходе развития пластиды. Во время развития пропластид в фотосинтетически компетентные хлоропласты и во время интерконверсий между различными типами пластид нуклеоид подвергается изменениям по морфологии, размеру и локализации внутри органеллы [1,3]. Предполагают, что эти ремоделирующие события осуществляются через модификации в составе и количестве белков нуклеоида, которые по-видимому играют критическую роль в определении структуры и функционировании ДНК-белковых комплексов [4]. Идентификация этих белков чрезвычайно трудна в присутствии таких высоко количественных хлоропластных белков с доминирующими метаболическими активностями, как фотосинтетические белки. Необходимо применять биохимические подходы, которые помогут разделить эти белки друг от друга.

Цель наших исследований состояла в 1) разработке схемы фракционирования нуклеоидных хлоропластных белков озимой ржи и 2) выявлении изменений в субпротеомах хлоропластных нуклеоидов озимой ржи, происходящих в процессе развития растения.

Материалы и методы

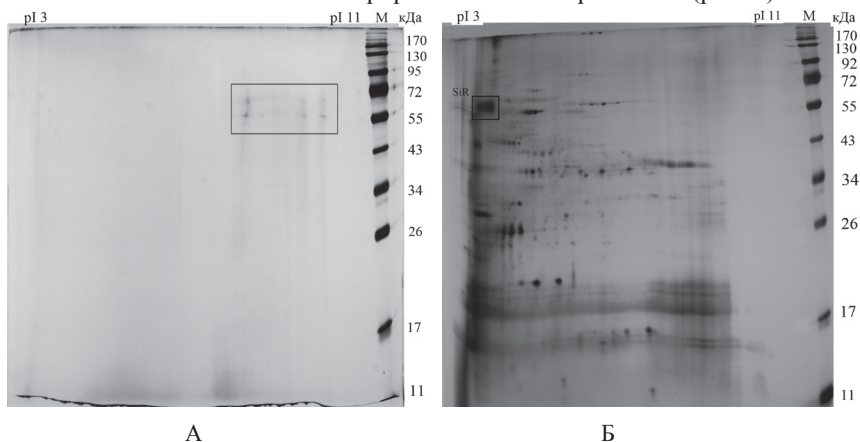
Объектами исследований были 96- и 168-часовые проростки озимой ржи сорта Лота. Зерновки ржи обеззараживали и замачивали в течение 12 ч в небольшом количестве водопроводной воды для набухания (эти часы

учитывали в возрасте проростков). Далее проростки выращивали на покрытых марлей решетках на водопроводной воде при 22°C, освещенности 3-5 клк. Световой день — 16 ч. Хлоропласты выделяли по Гавриленко [5] с некоторыми модификациями. В качестве среды выделения использовали 50мМ трис-НСl буфер (pH 7.8) с 0,4М сахарозой, 4мМ цистеином, 0,1мМ ЭДТА и 10мМ MgCl₂. Для выделения нуклеоидов хлоропластов из проростков озимой ржи нами был применен метод ультрацентрифугирования с использованием детергента Nonidet Nr-40, разработанный Cannon et al. [6] для выделения нуклеоидов из хлоропластов сои. Оценку качества выделенных нуклеоидов озимой ржи проводили по уровню флуоресценции красителя DAPI, связавшегося с двуцепочечной нуклеоидной ДНК. Из нуклеоидов 20 мМ трис-НСl-буфером (pH 7.0) с 0,5 мМ ЭДТА, 7 мМ 2-меркаптоэтанолом, 0,4 мМ диизопропилфлуорофосфата и 2 М NaCl фракционировали ДНК-связанные и остаточные белки, как описано в [7]. Нуклеоидные белки очищали с помощью набора реагентов «2D Clean-Up Kit» (GE Healthcare, США). Содержание белка в образце определяли, используя набор реагентов «2D Quant Kit» (GE Healthcare). Нуклеоидные белки разделяли методом 2D-электрофореза. В качестве 1-го направления использовали изоэлектрофокусирование на Immobiline Dry Strip pH 3-11 NL, длиной 11 см (GE Healthcare, США), как 2-ое направление – электрофорез в щелочной системе в денатурирующих условиях по Laemmli [8]. Изофокусирование проводили по инструкции GE Healthcare при комнатной температуре на приборе Multiphor II (Amersham Pharmacia, Швеция), используя аксессуары для стрипов (GE Healthcare). Режим изофокусирование: 1-ый шаг – 300 В в течение 4 ч, 2-ой шаг – 1200 В в течение 14,5 ч. После изофокусирования стрипы уравнивали по прописи GE Healthcare с буферными системами для вертикального электрофореза белков в денатурирующих условиях в щелочной системе. Использовали ПААГ (60 % (м/о), C = 3) толщиной 0,1 см с концентрацией мономеров 12 % (о/о) в разделяющем и 6 % (о/о) – в концентрирующем геле. Электрофорез проводили при силе тока 20 мА в течение 40 мин и далее 30 мА в течение 4 ч 50 мин. После разделения белки фиксировали и окрашивали набором реагентов «PageSilver™» (Fermentas, Литва). При электрофорезе использовали окрашенные белки-маркеры диапазона молекулярных масс (ММ) 11-170 кДа (Fermentas, Литва). ПААГ фотографировали с помощью цифровой фотокамеры и обрабатывали в программе 2D Phoretix.

Результаты и обсуждение

Используя вышеописанную схему исследований, нами с помощью 2D-электрофореза исследованы изменения в структурной организации нуклеоидов в процессе биогенеза хлоропластов озимой ржи. Давно установлено, что в биогенезе хлоропластов важную роль играет не только процесс образования хлорофилла, но и организация элементов транскрипционно-трансляционной системы хлоропластов. Нами получены и первично проанали-

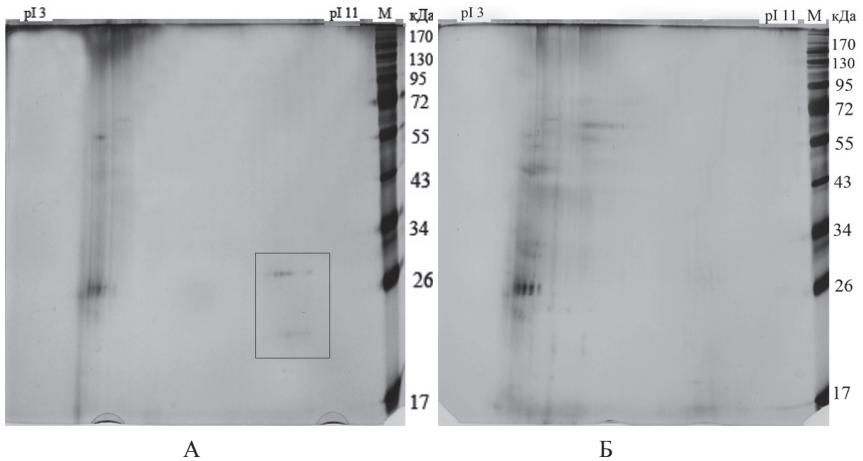
зированы 2D-протеомные карты ДНК-связанных и остаточных нуклеоидных белков 96- и 168-часовые проростков озимой ржи Лота (рис. 1).



М – белки-маркеры молекулярных весов в кДа

Рис. 1. Двумерное разделение ДНК-связанных нуклеоидных белков хлоропластов 96- (А) и 168-часовых (Б) проростков озимой ржи Лота

Установлено, что субпротеомы хлоропластных нуклеоидов 96-часовых проростков кардинально отличается от такового 168-часовых проростков. Так, в протеомной карте нуклеоидных ДНК-связанных белков 96-часовых проростков (рисунок 1А) обнаружены 10 белковых пятен с pI в диапазоне 8-11, которые образуют пару белковых «бус» из 5 «бусин» (белки с различными значениями pI, но с одинаковыми ММ в 57 и 67 кДа). Данные белки, по-видимому, являются изоформами или предварительно были подвержены пост-трансляционным модификациям. Поскольку эти белки не присутствуют в субпротеоме хлоропластных нуклеоидов более зрелых, 168-часовых проростков, возможно, они выполняют ту же функцию, что ДНК-связывающий белок пластидной оболочки молодых растений гороха (PEND). Этот белок с ММ 130 кДа состоит из 2-х субъединиц по 70 кДа и локализован во внутренней мембране хлоропластов молодых растений гороха, но исчезает из органелл в более старых листьях. Экспрессия PEND коррелирует с ранней стадией развития пластиды, на которой, как было обнаружено, нуклеоиды связаны с оболочкой пластиды [9]. PEND связывается с определенными последовательностями хпДНК, вероятно прикрепляя нуклеоиды к мембране оболочки и обеспечивая якорь для репликации и транскрипции пластома и его сегрегацию во время деления органеллы. Этим bZIP-белок сходен с ядерными факторами транскрипции [9].



М – белки-маркеры молекулярных весов в кДа

Рис. 2. Двумерное разделение остаточных нуклеоидных белков хлоропластов 96- (А) и 168-часовых (Б) проростков озимой ржи Лота

В субпротеоме нуклеоидных остаточных белков 96-часовых проростков (рисунок 2А) также присутствует пара белковых «бус»: одни «бусы» состоят из 4-х белков с Мм 30 кДа и рI в диапазоне 8-10, а другие — из 2-х белковых пятен с Мм 22 кДа и рI в диапазоне 9-10.

В отличие от 96-часовых проростков озимой ржи, основу протеома нуклеоидных ДНК-связанных белков 168-часовых проростков (рисунок 1Б) составляют белки с рI в диапазоне 4-7, лишь единичные имеют рI в области 8-9. Общее количество белков – 70, их ММ находятся в диапазоне 10-80 кД. Около 10 белков формируют «бусы» на 2D-электрофореграммах. Как и в работе Cannon et al. [6], посвященной анализу нуклеоидных белков хлоропластов сои, главным мажорным белком субпротеома ДНК-связанных нуклеоидных белков хлоропластов озимой ржи является белок с ММ около 68 кД. Данный белок по сведениям Cannon et al. [6] обладает способностью компактизировать хлоропластную ДНК. Sato et al. [10] среди нуклеоидных белков гороха также выявили мажорный белок с Мм около 70 кД, являющийся сульфитредуктазой с ДНК-компактизирующей способностью (SiR). Следует обратить внимание, что SiR не присутствует в субпротеоме нуклеоидных ДНК-связанных белков 96-часовых проростков озимой ржи.

На 2D-электрофореграмме остаточных нуклеоидных белков (рисунок 2Б) обнаружены белковые зоны с рI от 4 до 10 и ММ от 10 до 90 кД.

Выводы. 1) Разработана схема фракционирования нуклеоидных хлоропластных белков озимой ржи на основе методик, примененных Cannon et al. [6] при исследовании нуклеоидов сои. 2) При биогенезе хлоропластов озимой ржи белковая составляющая нуклеоидов развивается параллельно

с другими белковыми комплексами. В частности, протеом хлоропластных нуклеоидов 96-часовых проростков озимой ржи Лота кардинально отличается от такового 168-часовых проростков.

Литература

1. *Kuroiwa T.* The replication, differentiation, and inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei.– *Int. Rev. Cytol.* – 1991. – Vol. 128. – P.1–62.
2. *Sato N.* Was the evolution of plastid genetic machinery discontinuous? – *Trends in Plant Science.* –2001. – Vol. 6, № 4. – P. 151–155.
3. *Hashimoto H.* Changes in distribution of nucleoids in developing and dividing chloroplast and etioplasts of *Avena sativa*.– *Protoplasma.* – 1985. – Vol.127. – P.119–127.
4. *Nakano T., Sato F., Yamada Y.* Analysis of nucleoid-proteins in tobacco chloroplasts.– *Plant Cell Physiol.* – 1993. – Vol.34. – P. 873–880.
5. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание. – М.: Высшая школа.– 1975. – 392 с.
6. *Cannon G.C. et al.* The 68 kDa DNA compacting nucleoid protein from soybean chloroplasts inhibits DNA synthesis *in vitro*.– *Plant Molecular Biology.* – 1999. – Vol. 39. – P. 835–845.
7. *Chi-Ham C.L. et al.* The DNA-compacting protein DCP68 from soybean chloroplasts is ferredoxin:sulfite reductase and co-localizes with the organellar nucleoid.– *Plant Molecular Biology.* – 2002. – Vol. 49. – P. 621–631.
8. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T.– *Nature.* – 1970. – V.227. – P.680–685.
9. *Sato N. et al.* Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids.– *Plant Cell .* – 1998. – Vol. 10. – P. 859–872.
10. *Sato N. et al.* The 70-kDa major DNA-compacting protein of the chloroplast nucleoid is sulfite reductase.– *FEBS Letters.* – 2001. – Vol. 487. – P.347–350.

Резюме

Для протеомного анализа разработана схема фракционирования нуклеоидных хлоропластных белков озимой ржи. Протеом хлоропластных нуклеоидов 96-часовых проростков озимой ржи кардинально отличается от такового 168-часовых проростков.

For the proteomic analysis the schema of winter rye chloroplast nucleoid fractionating was developed. The chloroplast nucleoid proteome of the 96-hours winter rye seedlings is distinct cardinally from the proteome of the 168-hours seedlings.

ПАНЧУК І.І., КАСІЯНЧУК Р.М., ВОЛКОВ Р.А.

*Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012, e-mail: irina.panchuk@gmail.com*

ДИФЕРЕНЦІЙНА ТРАНСКРИПЦІЯ ГЕНІВ АРХ АРАБІДОПСИСУ ЗА ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ ТА МІДІ

Одним з результатів антропогенного впливу на біосферу є накопичення в ґрунтах солей важких металів (ВМ) у доступних для рослин формах

[2, 4]. Переважна більшість ВМ у підвищених концентраціях є токсичними для рослин: зокрема спостерігаються сповільнення росту та хлороз, порушуються процеси фотосинтезу та дихання [12, 19] та окисно-відновна рівновага [10, 14], втрачається активності багатьох ферментів, що в кінцевому рахунку призводить до загибелі.

Вважається, що пошкодження, викликані ВМ, в першу чергу спричинені оксидативним стресом, який є наслідком збільшення внутрішньоклітинних концентрацій активних форм кисню (АФК), таких як пероксид водню, супероксид та гідроксил радикали [2, 5, 9]. АФК активують процеси перикисного окиснення ліпідів мембран, білків та ДНК [3]. Довгий час вважалось, що АФК мають лише негативний вплив на клітину. Проте нещодавно було доведено, що АФК є також сигнальними молекулами, які регулюють експресію генів, зокрема за дії різних форм стресу. Зважаючи на таку поліфункціональність, фізіологічно важливою є регуляція та підтримання оптимальних концентрацій АФК в клітині, а не повне їх розщеплення [6, 15, 17, 18].

Вміст АФК в клітині регулюють неферментативна та ферментативна антиоксидантні системи. До останньої належать супероксиддисмутаза, аскорбат, гваякол та глутатіон пероксидази, каталаза та інші ферменти. Зокрема рівень пероксиду водню у рослинній клітині значною мірою залежить від активності аскорбат пероксидази (АРХ) [7].

АРХ виконують важливу роль у захисті рослинної клітини в умовах теплового, сольового та світлового стресів [8, 11, 16]. Це пов'язано із стрес-індукованим зростанням експресії АРХ, яке може контролюватись як на транскрипційному, так і пост транскрипційному рівні. АРХ можуть також приймати участь у захисті рослин від оксидативного стресу, викликаного зростанням внутрішньоклітинних концентрацій ВМ [13]. Проте можливі механізми активації АРХ на початкових етапах відповіді рослин на гострий стрес, викликаний ВМ, все ще не з'ясовані. Відповідно, дана робота присвячена вивченню впливу іонів кадмію та міді на рівень мРНК восьми генів *Apx* у *Arabidopsis thaliana*.

Матеріали та методи

Для дослідження використовували рослини *A. thaliana* екотипу Columbia 0 віком 4,5-5-тижнів. Рослини вирощували у ґрунті в культивачній кімнаті за температури 20°C в умовах 16-годинного світлового дня. Для проведення стресової обробки відокремлювали надземну частину рослин від кореневої системи і місце зрізу занурювали в рідке середовище Мурасіге-Скуга (0,5x MS), що містило хлорид кадмію або хлорид міді у концентраціях 0,5 та 5 мМ. Обробку проводили у темряві при температурі 20°C протягом 2-х (короткотривалий стрес) та 12-ти (довготривалий стрес) годин. Як показує досвід нашої лабораторії, 2 години відповідають мінімальному часу, за якого слід очікувати накопичення токсиканта та розвитку стресової

відповіді у листках. Контрольні рослини інкубували на середовищі без додавання хлориду кадмію або міді.

Виділення поліА⁺-мРНК і кДНК та умови проведення кількісної RT-PCR на ампліфікаторі iCyler (Bio-Rad, США) з використанням генспецифічних праймерів були описані раніше [11]. Результати піддавали статистичній обробці із застосуванням *t*-тесту [1].

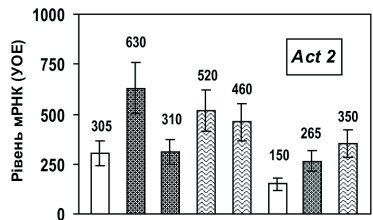
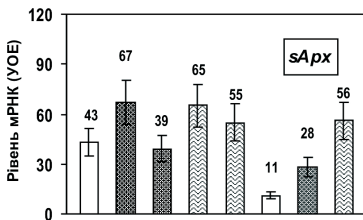
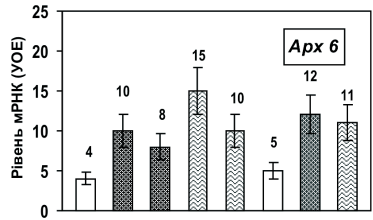
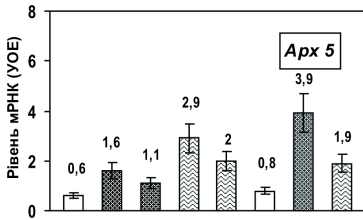
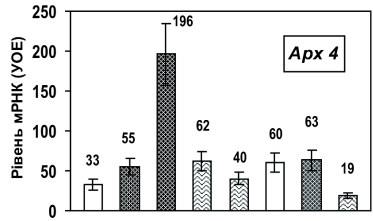
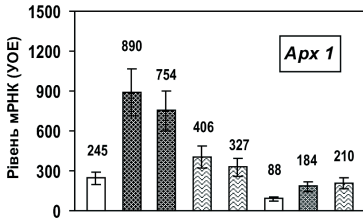
Результати та їх обговорення

Для вивчення можливих змін у транскрипції генів, що належать до мультигенної родини *Arx* арабідопсису за дії іонів Cd²⁺ та Cu²⁺ було проведено визначення рівня мРНК восьми генів із використанням кількісної ПЛР у реальному часі (real time RT-PCR). Для порівняння було також визначено рівень мРНК актину *Act 2*, рівень експресії якого у тканинах листа вважається відносно стабільним.

Отримані нами дані показують (Рисунок), що в умовах короткотривалої дії різних концентрацій іонів кадмію рівень мРНК *Arx 1* зростає у 3-4 рази у порівнянні з контролем, тоді як іони міді викликали зростання рівню цієї мРНК лише у 1,3-1,7 рази. В умовах довготривалого стресу обидва метали викликали підвищення рівню мРНК *Arx 1* приблизно у 2 рази. Цікавим виявився характер експресії *Arx 4*: рівень мРНК цього гену зростає у 6 разів лише за впливу вищої концентрації іонів кадмію протягом 2 годин, тоді як всі інші варіанти стресової обробки призводили до зростання рівню мРНК не більше, ніж у 2 рази, а за дії іонів міді протягом 12 год навіть спостерігалось зниження рівню мРНК у 3 рази. В умовах короткотривалої обробки обидва метали мали подібний вплив на експресію генів *Arx 5* та *Arx 6*: іони міді викликали зростання рівня мРНК у 3-4 рази, а кадмію – лише у 2-2,5 рази. Проте довготривала обробка призводила до різної реакції: рівень транскриптів *Arx 5* зростає у 6,5 разів за дії іонів кадмію і лише у 3,2 рази за дії іонів міді. В той же час рівень мРНК *Arx 6* зростає у 2,2-2,4 рази під впливом обох ВМ. Рівень мРНК *sArx* майже не змінювався після короткотривалої обробки, але зростає у 5 разів після довготривалої обробки іонами міді. Рівень мРНК інших генів – *Arx 2*, *Arx 3* та *tArx* – змінювався несуттєво, або не змінювався взагалі після всіх застосованих варіантів обробки.

Висновки

Надмірне підвищення концентрації іонів ВМ у клітинах листка арабідопсису викликає зростання рівня мРНК генів, що кодують різні ізоформи АРХ, що імовірно пов'язано із посиленням транскрипції цих генів. Отже, АРХ задіяна у відповіді рослинної клітини на стрес, викликаний іонами ВМ. Проте різні ізоформи АРХ імовірно грають різну роль у захисті клітини, оскільки рівень транскриптів різних *Arx* зростає по-різному. З другого боку, іони двох досліджених ВМ по-різному впливають на транскрипцію генів *Arx*. Це можна пояснити тим, що кадмій та мідь мають різ-



Іон металу Концентрація (мМ)	—		Cd		Cu	
	—	—	0,5	5	0,5	5
Час обробки	2 год.			12 год.		

—	Cd		Cu		—	
	0,5	5	0,5	5	0,5	0,5
		2 год.		12 год.		

Рисунок. Рівні мРНК генів, що кодують різні ізоформи *Apx* у листках *Arabidopsis thaliana* після обробки хлоридами кадмію (Cd) та міді (Cu) протягом 2 та 12 годин. Рівень поліА⁺-мРНК визначали методом кількісної RT-PCR. Рівні експресії представлено у порівнянні з рівнем мРНК для актину-2 у нестресованому листі, який прийнято за 100 умовних одиниць експресії (YOE).

ний механізм дії, зокрема, по-різному впливають на концентрацію АФК та окисно-відновний стан клітини.

Література:

1. Лакін Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
2. Пацула О., Демків О. Каталіаза та адаптація рослин соняшника до токсичної дії кадмію та свинцю // Вісник Львів УН-ТУ. – 2003. – Вип. 34. – С. 225-230.

3. Aravind P., Narasimha M., Prasad V. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte // Plant Physiol. Biochem. – 2003. – Vol. 41. – P. 391-397.

4. Das P., Samantaray S., Rout G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review // Environ. Pollut. – 1997. – Vol. 98, № 1. – P. 29-36.

5. Dixit V., Pandey V., Shyam R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52, № 358. – P. 1101-1109.

6. Hung S.-H., Yu C.-W., Lin C. H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants // Bot. Bull. Acad. Sin. – 2005. – Vol. 46. – P. 1-10.

7. Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants // Trends Plant Sci. – 2004. – Vol. 9, № 10. – P. 490-498.

8. Mullineaux P., Ball L., Escobar C. Are diverse signaling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. – 2000. – Vol. 29, № 355. – P. 1531-1538.

9. Olmos E., Martinez-Solano J. R., Piqueras A., Hellin E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line) // J. Exp. Bot. – 2003. – Vol. 54, № 381. – P. 291-301

10. Pál M., Horváth E., Janda T., Páldi E., Szalai G. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize // J. Plant Nutr. Soil Sci. – 2006. – Vol. 169. – P. 239-246.

11. Panchuk I.I., Völkov R.A., Schöffl F. Heat stress- and HSF-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2002 – 129 – P. 838-853.

12. Panou-Filotheou H., Bosabalidis A.V., Karataglis S. Effect of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) // Anals Bot. – 2001. – Vol. 88. – P.207-211.

13. Romero-Puertas M. C., Corpas F. J., Rodríguez-Serrano M., Gómez M., del Río L. A., Sandalio L. M. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants // J. Plant. Physiol. – 2007. – Vol. 164. – P. 1346-1357.

14. Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gomez M., Romero-Puertas M.C., del Rio L.A. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52, № 364. – P. 77-84.

15. Schützendübel A., Polle A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization // J. Exp. Bot. – 2002. – Vol. 53, № 372. – P. 1351-1365.

16. Sofó A., Dichio B., Xiloyannis C. Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes // Funct. Plant Biol. – 2005. – Vol. 32. – P. 45-53.

17. Völkov 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. 733-746.

18. Yang T., Poovaiah B. W. Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium-calmodulin // Proc. Nat. Acad. Sci. – 2002. – Vol. 99, № 6. – P. 4097-4102.

19. Yruela I. Copper in plant // Braz. J. Plant Physiol. – 2005. – Vol. 17. – P. 145-156.

Резюме

Определение содержания мРНК восьми генов, кодирующих изоферменты аскорбат пероксидазы (АРХ) показало, что это содержание увеличивается при накоплении ионов кадмия и меди в тканях листа. В частности, обработка хлоридом кадмия приводила к возрастанию содержания мРНК *Apx 1*, *Apx 4* та *Apx 5*, тогда как обработка хлоридом меди вызывала накопление транскриптов *Apx 5*, *Apx 6* и *sApx*. Дифференциальная транскрипция генов *Apx* может быть частью клеточного стрессового ответа, который является специфичным по отношению к различным тяжелым металлам.

Визначення вмісту мРНК для восьми генів, які кодують ізоферменти аскорбат пероксидази (АРХ) показало, що цей вміст збільшується при накопиченні іонів кадмію та міді у тканинах листа. Зокрема, обробка хлоридом кадмію призводила до зростання вмісту мРНК *Apx 1*, *Apx 4* та *Apx 5*, тоді як обробка хлоридом міді спричиняла накопичення транскриптів *Apx 5*, *Apx 6* та *sApx*. Диференційна транскрипція генів *Apx* може бути частиною стресової відповіді клітини, яка є специфічною по відношенню до різних важких металів.

Quantification of mRNA levels of eight genes coding for ascorbate peroxidase (APX) isoenzymes demonstrated that the levels increase in response to accumulation of cadmium and copper ions in leaf tissues. Especially, treatment with cadmium chloride results in increase of *Apx 1*, *Apx 4* and *Apx 5* mRNA levels whereas copper chloride induces accumulation of *Apx 5*, *Apx 6* and *sApx* transcripts. The differential transcription of *Apx* genes can contribute to cellular stress response, which appears to be specific for different heavy metals.

ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л.

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150
e-mail: pidpala@ukr.net*

ФРАГМЕНТИ ЯДЕРНИХ ПСЕВДОГЕНІВ У МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ГЕНОМАХ PRIMATES

Молекулярно-генетичні та цитологічні дані свідчать про те, що в утворенні еукаріотної клітини брали участь як мінімум три прокаріотні компоненти. Припускають, що ядро клітини успадковане від архей [1], мітохондрії споріднені з альфа-протеобактеріями [2], а хлоропласти, ймовірно, походять від давніх ціанобактерій [3]. Одним із найцікавіших проявів ядерно-цитоплазматичних взаємодій є потік генів (чи їхніх фрагментів) від органел до ядра [4]. Такі послідовності названо NUMT-псевдогенами (NUPT-вставками) (NUMT-nuclear mitochondrial, NUPT-nuclear plastid). Переважно вони інтегрують у міжгенні ділянки або в інтрони [5].

У ядерному геномі людини присутні послідовності усіх генів мтДНК та її некодуючої ділянки [6]. Загальна кількість NUMT-вставок налічує по-

над 600 і становить близько 0,016 % від ядерного геному. Вони рівномірно розподілені між усіма хромосомами, а також у межах кожної індивідуальної хромосоми [7,8]. Результати аналізу послідовностей NUMT-псевдогенів у приматів вказують на те, що вони є важливими філогенетичними маркерами [9,10].

Чи можливий зворотній потік ДНК із ядра до органел? Зазначають, що якщо такий процес і відбувається, то вкрай рідко [11]. Наприклад, у мт-геномі *Arabidopsis thaliana* виявлено фрагменти ядерних ретротранспозонів [12]. Для мт-геномів приматів є лише дані про наявність послідовностей, які гомологічні фрагментам про- та еукаріотних мобільних генетичних елементів [13,14]. Тому метою даного дослідження був пошук фрагментів ядерних псевдогенів у мт-геномах приматів.

Матеріали і методи

Проаналізовано 39 мтДНК від 31 сучасного виду і 2 послідовностей мтДНК від викопних форм приматів. Перелік видів і номери послідовностей мтДНК у GenBank наведено у табл. За допомогою програми Censor (<http://www.girinst.org/censor>) [15] визначали відомі на сьогодні псевдогени на основі бази даних REPBASE [16]. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей фрагментів здійснювали з використанням програми DIALIGN 2.2.1 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/spool//dialign/>) [17].

Результати та обговорення

У переважній більшості досліджуваних мт-геномів приматів виявили послідовності, гомологічні фрагментам ядерних псевдогенів LSU-rRNA_Hsa (28S рРНК *Homo sapiens*) та LSU-rRNA_Mfr (28S рРНК *Montastraea franksi*, *Cnidaria*) (табл.). У всіх випадках послідовності, гомологічні ядерним фрагментам (довжиною від 98 до 182 п.н.) присутні у гені *MT-RNR2*, що кодує 16S рРНК. На рис.1 наведено координати вихідних послідовностей та їхніх делетованих варіантів. Серед мокроносих мавп ядерні псевдогени присутні у *Daubentonia madagascariensis* (LSU-rRNA_Mfr) та у *Propithecus coquereli* (LSU-rRNA_Hsa). Найбільше різноманіття варіантів характерне для собакоголових мавп (табл.). У всіх тонкотілих мавп присутній фрагмент LSU-rRNA_Hsa із координатами 4350/4348-4527, який відсутній у мокроносих мавп, мартишкових (окрім *Macaca sylvanus*) і в усіх досліджених мт-геномах гоміноїдів. Цікаво, що у деяких видів тонкотілих мавп цей фрагмент присутній або із послідовністю LSU-rRNA_Hsa (різні варіанти від вихідної послідовності із координатами 3724-3907), або із фрагментом LSU-rRNA_Mfr. Останній присутній також у більшості видів мартишкових, окрім *Papio hamadryas*.

Серед гоміноїдів у мт-геномах обох видів горил виявлено послідовності, гомологічні фрагментові LSU-rRNA_Mfr. Така ж послідовність присутня у мтДНК людини (AY195779, Фінляндія, гаплогрупа W), причому частота мутацій у межах даного фрагмента вища. У мт-геномах представників роду *Homo* також виявили послідовність LSU-rRNA_Hsa із координатами

натами 3753-3900, а у випадку людини (EF060340) – із координатами 3726-3900. Цікаво, що за частотою гомології послідовність фрагмента LSU-rRNA_Hsa (3753-3900) однакова як у архаїчних представників роду *Homo* (у людини Алтайської та у неандертальця), так і у представника людини сучасного виду (табл., рис.2), мтДНК якої відповідає Кембріджській еталонній послідовності (NC_012920) і належить до гаплогрупи H [18].

Таблиця

Послідовності, гомологічні фрагментам псевдогенів 28S рРНК у мтДНК сучасних і вимерлих приматів

n/n	Організм	Реєстраційний номер у GenBank	Псевдоген, назва			
			LSU-rRNA_Hsa		LSU-rRNA_Mfr	
			координати у межах псевдогена	гомологія, %	координати у межах псевдогена	гомологія, %
1.	<i>Homo sapiens</i>	NC_001807	3753-3900	0,6667		
2.	<i>Homo sapiens</i>	NC_012920	3753-3900	0,6599		
3.	<i>Homo sapiens</i>	EF060340	3726-3900	0,6437		
4.	<i>Homo sapiens</i>	AM263183	3753-3900	0,6531		
5.	<i>Homo sapiens</i>	AY195779			2854-3001	0,6507
6.	<i>Homo sapiens neanderthalensis</i>	NC_011137	3753-3900	0,6599		
7.	<i>Homo sapiens Altai</i>	NC_013993	3753-3900	0,6599		
8.	<i>Pan troglodytes</i>	NC_001643	-		-	
9.	<i>Pan troglodytes</i>	EU095335	-		-	
10.	<i>Pan troglodytes (isolat Jenny)</i>	X93335	-		-	
11.	<i>Pan paniscus</i>	NC_001644	-		-	
12.	<i>Gorilla gorilla</i>	D38114			2854-3001	0,6531
13.	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	X93347			2854-3001	0,6531
14.	<i>Pongo abelli</i>	NC_002083			2827-3001	0,6437
15.	<i>Pongo pygmaeus</i>	NC_001646	3726-3907	0,6354		
16.	<i>Hylobates lar</i>	NC_002082			2854-3008	0,6340
17.	<i>Chlorocebus aethiops</i>	NC_007009			2827-3001	0,6532
18.	<i>Chlorocebus pygerythrus</i>	NC_009747			2827-3001	0,6590
19.	<i>Chlorocebus sabaues</i>	NC_008066			2827-3001	0,6590
20.	<i>Chlorocebus tantalus</i>	NC_009748			2827-3001	0,6590
21.	<i>Macaca mulatta</i>	NC_005943			2827-3008	0,6722
22.	<i>Macaca sylvanus</i>	NC_002764	4350-4527	0,6591	2827-3001	0,6494

Продовження табл.

n/n	Організм	Ресстрацій-ний номер у GenBank	Псевдоген, назва			
			LSU-rRNA_Hsa		LSU-rRNA_Mfr	
			координати у межах псевдогена	гомологія, %	координати у межах псевдогена	гомологія, %
23.	<i>Macaca thibetana</i>	NC_011519			2827-3001	0,6575
24.	<i>Papio hamadryas</i>	Y18001	3726-3841	0,6724		
25.	<i>Colobus guereza</i>	NC_006901	3726-3900 4348-4527	0,6609 0,6800		
26.	<i>Ptilocolobus badius</i>	NC_008219	4350-4527	0,6763	2827-3001	0,6705
27.	<i>Semnopithecus entellus</i>	NC_008215	4350-4527	0,6571	2827-3001	0,6437
28.	<i>Trachypithecus obscurus</i>	NC_006900	3726-3841 4350-4527	0,6552 0,6936		
29.	<i>Presbytis melalophos</i>	NC_008217	4348-4527	0,6857		
30.	<i>Pygathrix nemaeus</i>	NC_008220	4350-4527	0,6763		
31.	<i>Rhinopithecus roxellana</i>	NC_008218	3726-3907 4350-4527	0,6298 0,7011		
32.	<i>Nasalis larvatus</i>	NC_008216	3726-3900 4350-4527	0,6379 0,6821		
33.	<i>Cebus albifrons</i>	NC_002763	-		-	
34.	<i>Tarsius bancanus</i>	NC_002811	3724-3900	0,6536		
35.	<i>Eulemur mongoz</i>	NC_010300	-		-	
36.	<i>Lemur catta</i>	NC_004025	-		-	
37.	<i>Propithecus coquereli</i>	NC_011053	3726-3823	0,6735		
38.	<i>Daubentonia madagascariensis</i>	NC_010299			2827-3016	0,6436
39.	<i>Nycticebus concang</i>	NC_002765	-		-	

Положення нуклеотиду А у позиції 117 в межах фрагмента псевдогена відповідає характерній для гаплогрупи Н мутації 2706А [19]. Відомо, що гаплогрупа Н виникла у західній Азії (Алтаї) близько 30 тис. років тому, а з часом поширилась у Європу і на сьогодні є однією із найрозповсюджениших гаплогруп серед європейської популяції [20]. У одного із представників *H. sapiens*, який походить із Вірменії і належить до гаплогрупи Н14а присутня мутація, якої немає ні у досліджуваних мт-геномах архаїчних людей (*H.s.neanderthalensis* і *H.s.Altai*), ні у носія Кембріджської еталонної послідовності. Кому із архаїчних людей могла належати ця мутація, і яким чином збереглась у одного із представників людини сучасного виду? Також виявлено, що у *H. sapiens*, який є носієм гаплотипу М1а2 (представ-

ник народу коптів, Єгипет), присутня послідовність LSU-rRNA_Hsa (3726-3900), яку із досліджуваних приматів виявлено у гоміноїдів лише для *Pongo pygmaeus* (табл.). На підставі порівняння нуклеотидної послідовності даного фрагмента, ця послідовність за деякими позиціями відрізняється від еволюційно ближчого представника й іноді несе такі ж мутації, як еволюційно віддаленіші представники приматів, зокрема *Papio hamadryas* чи *Colobus guereza* (рис.3). Чи можна це пояснити повторними замінами одного сайту, чи тим, що носіями таких мутацій були архаїчні гомініди, які могли одержати їх внаслідок міжвидових і міжродових схрещувань? У попередньому своєму дослідженні на основі порівняння розподілу бактеріальних IS-фрагментів у мтДНК ми припустили, що такі випадки могли мати місце серед перехідних форм гоміноїдів [14].

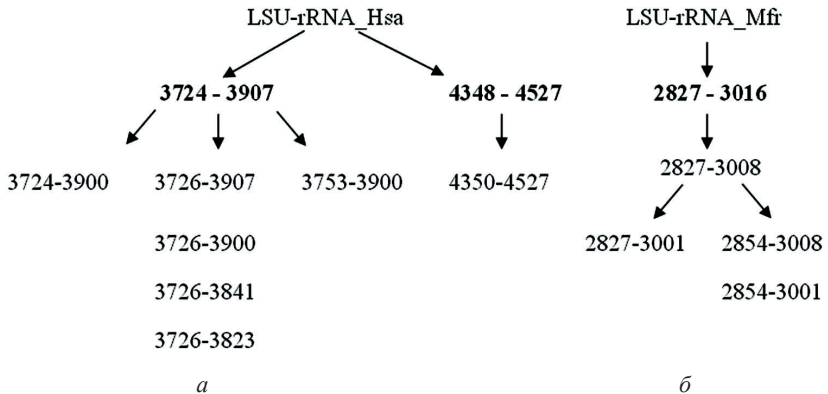


Рис. 1. Варіанти фрагментів ядерних псевдогенів у мт-геномах приматів: а – LSU-rRNA_Hsa; б – LSU-rRNA_Mfr. Координати вихідних послідовностей позначено жирним шрифтом

Для філогенетичних досліджень приматів використовують великий арсенал маркерів, кожен із яких має свої обмеження. Якщо розглядати мітохондріальні маркери, то саме гени рРНК відзначаються низькою швидкістю мутацій, що і дозволяє їх використовувати для досліджень на різних таксономічних рівнях [21]. На основі одержаних результатів пропонуємо використовувати мітохондріальні ядерні псевдогени (MTNU-mitochondrial nuclear), за аналогією до NUMT-псевдогенів [10], для реконструкції еволюції роду *Homo*.

а	1	AAGGTAGCAT	AATCACTTGT	TCCTTAAATA	GGGACCTGTA	TGAATGGCTC
б	1	AAGGTAGCAT	AATCACTTGT	TCCTTAAATA	GGGACCTGTA	TGAATGGCTC
в	1	AAGGTAGCAT	AATCACTTGT	TCCTCAAATA	GGGACCTGTA	TGAATGGCTC
г	1	AAGGTAGCAT	AATCACTTGT	TCCTTAAATA	GGGACCTGTA	TGAATGGCTC
д	1	AAGGTAGCAT	AATCACTTGT	TCCTTAAATA	GGGACCTGTA	TGAATGGCTC
а	51	CACGAGGGTT	CAGCTGTCTC	TTACTTTTAA	CCAGTGAAAT	TGACCTGCCC
б	51	CACGAGGGTT	CAGCTGTCTC	TTACTTTTAA	CCAGTGAAAT	TGACCTGCCC
в	51	CACGAGGGTT	CAGCTGTCTC	TTACTTTTAA	CCAGTGAAAT	TGACCTGCCC
г	51	CACGAGGGTT	CAGCTGTCTC	TTACTTTTAA	CCAGTGAAAT	TGACCTGCCC
д	51	CACGAGGGTT	CAGCTGTCTC	TTACTTTTAA	CCAGTGAAAT	TGACCTGCCC
а	101	GTGAAGAGGC	GGGCATGACA	CAGCAAGACG	AGAAGACCCT	ATGGAGCTT
б	101	GTGAAGAGGC	GGGCATAACA	CAGCAAGACG	AGAAGACCCT	ATGGAGCTT
в	101	GTGAAGAGGC	GGGCATAACA	CAGCAAGACG	AGAAGACCCT	ATGGAGCTT
г	101	GTGAAGAGGC	GGGCATAACA	CAGCAAGACG	AGAAGACCCT	ATGGAGCTT
д	101	GTGAAGAGGC	GGGCATAACA	CAGCAAGACG	AGAAGACCCT	ATGGAGCTT

Рис. 2. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей фрагментів LSU-rRNA_{Hsa} (3753-3900) у мт-геномах представників роду *Homo*: а – *Homo sapiens* NC_001807; б – *Homo sapiens* NC_012920; в – *Homo sapiens* AM263183; г – *Homo sapiens neanderthalensis* NC_011137; д – *Homo sapiens Altai* NC_013993

а	1	--AACGGCCG	CGGTACCCTG	ACCGTGCAAA	GGTAGCATAA	TCACTTG TTC
б	1	--AACGGCCG	CGGTACCCTG	ACCGTGCAAA	GGTAGCATAA	TCACTTG TTC
в	1	--AACGGCCG	CGGTACCCTG	ACCGTGCAAA	GGTAGCATAA	TCACTTG TTC
г	1	--AACGGCCG	CGGTACCCTG	ACCGTGCAAA	GGTAGCATAA	TCACTTG TTC
а	49	<u>CT</u> TAAATAGG	GACCT <u>GT</u> TATG	AATGGCT <u>CCA</u>	CGAGGGTTCA	<u>GCT</u> GTCTCTT
б	49	TTTAAATGAG	GACT <u>TG</u> TATG	AATGGCT <u>CCA</u>	CGAGGGTTCCG	<u>ACT</u> GTCTCTT
в	49	TTTAAATAGG	GACTCGCATG	AATGGCAACA	CGAGGGTTCA	<u>GCT</u> GTCTCTT
г	49	<u>CT</u> TAAATAGG	GACTCGCATG	AACGGCAACA	CGAGGGTTCA	<u>ACT</u> GTCTCTT
а	99	ACTTT <u>TA</u> ACC	AGTGAAATG	ACCTGCCCGT	GAAGAGGCGG	GCATGACACA
б	99	ACTTT <u>TA</u> ACC	AGTGAAATG	ACCTGCCCGT	GAAGAGGCGG	GCATAACATA
в	99	ACTTT <u>TA</u> ACC	AGTGAAA---	-----	-----	-----
г	99	ACTTTCAACC	AGTGAAATG	ACCTGCCCGT	GAAGAGGCGG	GCATAACATA
а	149	GCAAGACGAG	AAGACCCTAT	GGAGCTT---	----	
б	149	ACAAGACGAG	AAGACCCTAT	GGAGCTTCAA	TCTA	
в	116	-----	-----	-----	-----	
г	149	ATAAGACGAG	AAGACCCTAT	GGAGCTT---	----	

Рис. 3. Вирівнювання нуклеотидних послідовностей фрагментів LSU-rRNA_{Hsa} (3726-3900) у мт-геномах приматів: а – *Homo sapiens* EF060340; б – *Pongo pygmaeus* NC_001646; в – *Papio hamadryas* Y18001; г – *Colobus guereza* NC_006901

Висновки

У мт-геномах приматів виявили послідовності, гомологічні фрагментам ядерних псевдогенів (MTNU–псевдогени), які пропонуємо розглядати як потенційні філогенетичні маркери.

Література

1. *Saruhashi S., Hamada K., Miyata D. et al.* Comprehensive analysis of the origin of eukaryotic genomes // *Genes Genet.Syst.* - 2008.- vol.83, № 4.- P. 285-291.
2. *Esser C., Ahmadinejad N., Wiegand C. et al.* A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes // *Mol.Biol.Evol.* - 2004.- vol.21, № 9.- P. 1643-1660.
3. *Martin W., Russell M.J.* On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells // *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* - 2003.- vol.358, № 1429.- P. 59-83.
4. *Kleine T., Maier U.G., Leister D.* DNA transfer from organelles to the nucleus: the idiosyncratic genetics of endosymbiosis // *Annu.Rev. Plant.Biol.* - 2009.- vol.60.- P. 115-138.
5. *Timmis J.N., Ayliffe M.A., Huang C.Y., Martin W.* Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes // *Nat.Rev.Genet.* - 2004.- vol.5, № 2.- P. 123-135.
6. *Газзев А.И., Шайхаев Г.О.* Ядерно-митохондриальные псевдогены // *Мол. биол.* - 2010. Т. 44, № 3.- С. 405-417.
7. *Woischnik M., Moraes C.T.* Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome // *Genome Res.* - 2002.- vol.12, № 6.- P. 885-893.
8. *Tourmen Y., Baris O., Dessen P.* Structure and chromosomal distribution of human mitochondrial pseudogenes // *Genomics.* - 2002.-80, № 1.- P. 71-77.
9. *Schmitz J., Piskurek O., Zischler H.* Forty million years of independent evolution: a mitochondrial gene and its corresponding nuclear pseudogene in primates // *J.Mol. Evol.* - 2005.- vol.61, №1.-P. 1-11.
10. *Hazkani-Covo E.* Mitochondrial insertions into primate nuclear genomes suggest the use of numts as a tool for phylogeny // *Mol.Biol.Evol.* - 2009.- vol.26, № 10.- P. 2175-2179.
11. *Thorsness P.E., Weber E.R.* Escape and migration of nucleic acids between chloroplasts, mitochondria, and the nucleus // *Int.Rev.Cytol.* - 1996.- vol.165.- P. 207-234.
12. *Knoop V., Unseld M., Marienfeld J. et al.* Copi-like, gypsy-like and LINE-like retrotransposon fragments in the mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* // *Genetics.* - 1996.- vol. 142, № 2.- P. 579-585.
13. *Підпала О.В., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л.* Фрагменти бактеріальних IS-елементів і мобільних генетичних елементів еукаріотів у мтДНК людини // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології.- 2007.- т. 1.- С. 498-502.
14. *Підпала О.В., Яцишина А.П., Лукаш Л.Л.* Погляд на еволюцію *Hominoidea* на основі розподілу IS-фрагментів у мтДНК // Фактори експериментальної еволюції організмів.- 2010, т. 9.- С. 60-64.
15. *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.

16. Jurka J., Kapitonov V.V., Pavlicek A. et al. Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements // Cytogenet. Genome Res.- 2005.- vol.110, № 1-4. P. 462-467.

17. Morgenstern B. DIALIGN: multiple DNA and protein sequence alignment at BiBiServ // Nucleic Acids Res.- 2004.- vol. 32.- W33-36.

18. Andrews R.M., Kubacka I., Chinnery P.F. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA // Nat.Genet.- 1999.- vol. 23, № 2.- P.147.

19. van Oven M., Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation // Hum. Mutat.- 2009.- vol. 30, № 2.- E386-394.

20. Pereira L., Richards M., Goios A. et al. High-resolution mtDNA evidence for the late-glacial resettlement of Europe from an Iberian refugium // Genome Res.- 2005.- vol.15, № 1.-P.19-24.

21. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих // Журнал Общей биол.- 2004.- т. 65, № 4.- С. 278-305.

Резюме

У мт-геномах приматов обнаружили последовательности, гомологичные фрагментам ядерных псевдогенов (MTNU–псевдогены), которые предлагаем рассматривать как потенциальные филогенетические маркеры.

Sequences homologous to fragments of nuclear pseudogenes (MTNU-pseudogenes) have been found by us in mt-genomes of primates, which suggest to consider as potential phylogenetic markers.

РАЙКО М.П., РОДИОНОВ А.В.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН,

Россия, Санкт-Петербург, e-mail: mike.rayko@gmail.com, avrodionov@mail.ru

МУТАЦИИ В ГЕНЕ *trnL* И МЕЖГЕННОМ СПЕЙСЕРЕ *trnL-trnF* В ХОДЕ ДИВЕРГЕНЦИИ ТАКСОНОВ У ЗЛАКОВ ТРИБ *AVENEAE* И *POEAE*

Ген *trnL* кодирует тРНК лейцина. Это однокопийный ген, состоящий из одного интрона и двух экзонов. Экзоны *trnL* короткие и консервативные (длина тРНК у исследуемых видов составляет около 80 н.п.), интрон, же, напротив, эволюционирует быстро, в нём чередуются консервативные и вариабельные участки, и он активно используется в филогенетических исследованиях (Taberlet et al., 2006). Интрон гена *trnL* является интроном I группы (это единственный такой интрон в хлоропластах растений). Эти интроны являются рибозимами, и способны к сплайсингу в отсутствие других ферментов (Naugen et al., 2005). Для таких интронов характерна базовая вторичная структура из девяти спаренных областей (P1-P9). При этом образуются три пространственных домена – один образуется спиралями P1 и P2, другой – P4, P5, P6 и P6a, третий – P3, P7, P8 и P9.

Интрон гена *tRNA-Leu*, вероятно, был унаследован хлоропластами от цианобактерий – предшественников пластид. При этом показано, что у ци-

анобактерий он обладает способностью к самосплайсингу, а у растений лишился автокаталитической активности (Haugen et al., 2005).

Мы секвенировали ген *trnL* у 27 видов трибы *Phalarideae* и сравнили полученные последовательности с последовательностями представителей всех подтриб *Aveneae* и *Poeae*. Длина исследуемого участка гена *trnL* вместе с интроном составила 644 нуклеотида (после выравнивания), длина спейсера *trnL-trnF* – 494 нуклеотида. В рассматриваемом участке у исследованных видов структурные изменения – относительно крупные вставки и делеции, влияющие на вторичную структуру молекулы были обнаружены только в петлях L1-L9, их небыло в спаренных областях P1-P9.

Три таких мутации находятся в петле L6 интрона, при этом они не меняют принципиально её вторичную структуру:

1) Пятинуклеотидная делеция -AAAAC- в петле L6. Мы обнаружили её в интроне гена *trnL* у родов *Alopecurus* и *Phleum*. Сравнение последовательностей из базы данных GenBank показало, что она также характерна для всех видов *Puccinellia* и *Hordeum*, и отсутствует у видов овсов с С-геномами (*Avena macrostachya*, *A. eriantha*, *A. ventricosa* и *A. clauda*) в то время как у представителей этого рода с А-геномами делеция в наличии.

2) 4-нуклеотидная вставка AAAG у видов рода *Dactylis*.

3) 5-нуклеотидная вставка TCGAA, характерная для родов *Calamagrostis*, *Briza*, *Ammophila*, *Polypogon*. Поиск этого участка в GenBank показал, что она также характерна для всех видов *Gymnachne* и *Agrostis*.

Все остальные крупные индели в гене *trnL* исследованных видов расположены в шпильке L8, самой крупной, изменчивой и богатой повторами (рис. 3). У видов *Hierochloe* её длина составляет 297 нуклеотидов. У родов *Agrostis*, *Avenula*, *Ammophila*, *Briza*, *Calamagrostis*, *Polypogon* в этой шпильке присутствует большая делеция, и длина шпильки составляет всего 174 нуклеотида. В том же участке для родов *Avena*, *Arrhenatherum*, *Grappheporum*, *Koeleria* и *Trisetum* характерна ещё более крупная делеция, и длина шпильки составляет всего 97 нуклеотидов. Таким образом, эти делеции характерны для «типичных» *Aveneae*, у *Anthoxanthum*, *Hierochloe* и *Phalaris*, равно как у всех исследованных к настоящему времени *Poeae*, этой делеции нет – наши объекты сохранили анцестральную структуру шпильки L8 (рис. 3).

У видов трибы *Phalarideae* в гене *trnL* присутствуют следующие индели: вставка ACAT у рода *Phalaris*, делеция GAAATTA у *Hierochloe* (кроме *H. australis*), пересекающаяся с ней делеция TTGAAA у *Phalaris aquatica* и *P. minor*, а также у самого основания стебля тРНК дупликация CCCCA у всех видов *Anthoxanthum* и *H. australis* (рис. 1).

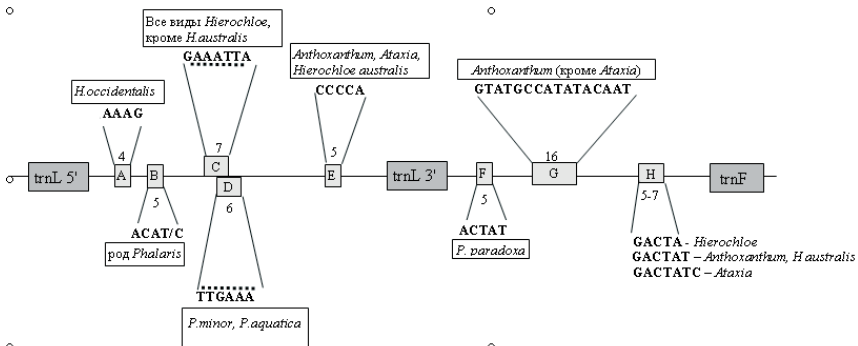


Рис. 1. Структурные изменения в интроне гена *trnL* и спейсере *trnL-trnF*, характерные для видов трибы *Phalarideae*. Пунктиром обозначены делеции. Цифры указывают длину вставок и делеций в районах А-Н. Видны синапоморфные индели.

В спейсере *trnL-trnF* обнаружено гораздо меньше структурных замен, характерных для групп видов. Вероятно, это связано с меньшей важностью его вторичной структуры по сравнению с интроном *trnL*, так как у него нет необходимости поддерживать строгую пространственную организацию, обеспечивающую автокализ.

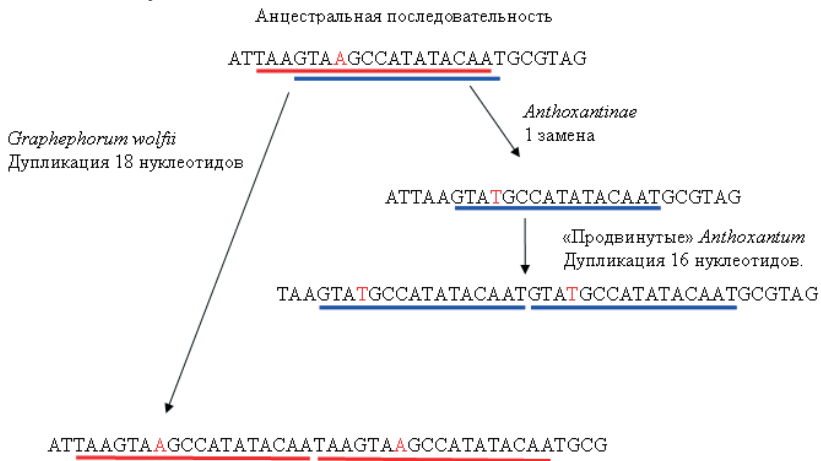


Рис. 2. Дупликации в спейсере *trnL-trnF*.

Ближе к 5'-концу спейсера находится ещё одна вставка, специфичная для *Anthoxanthineae*: GACTA у большинства *Hierochloa* (GACTATC у *H. occidentalis*), GACTAT у *Anthoxanthum* и *H. australis* и GACTATC у *A. amarum*, *A. mexicanum* и *A. siamense*.

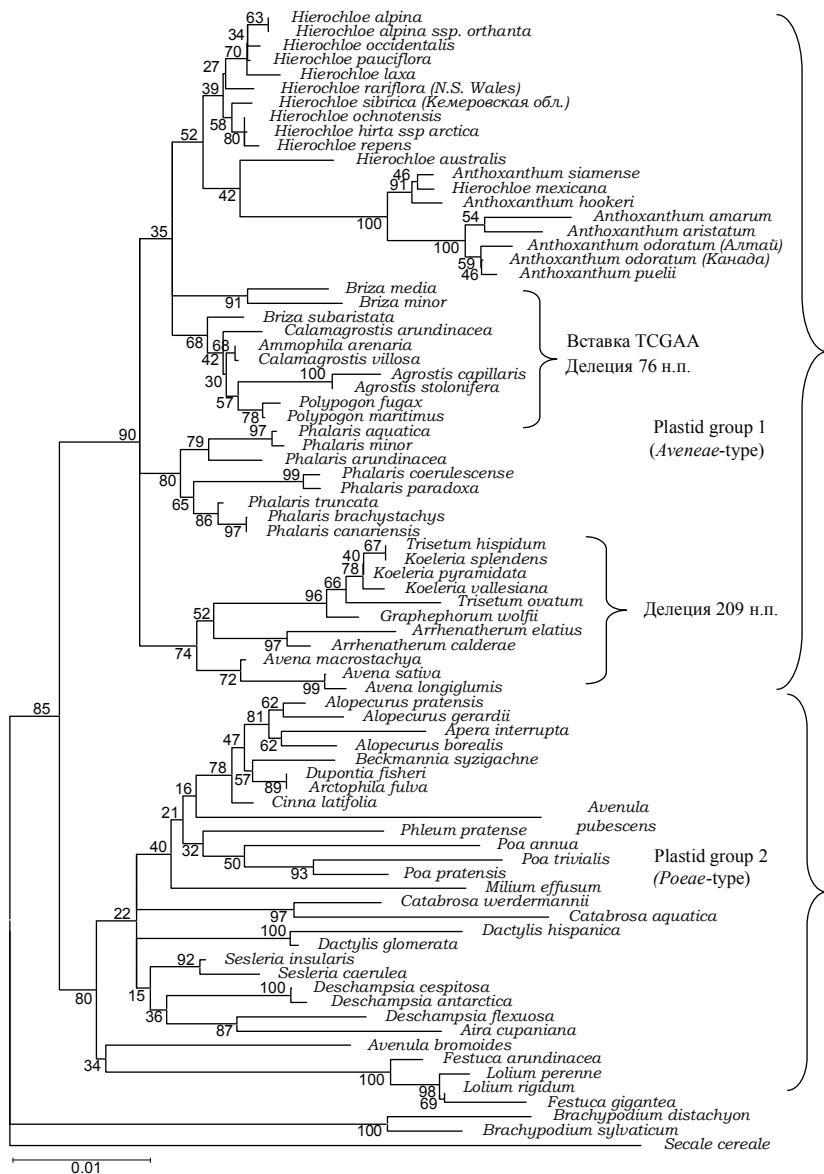


Рис. 3. Филогенетическое древо, построенное на основании сравнительного анализа района *trnL-trnF* методом *Neighbor-Joining*. Указаны значения бутстреп-поддержки (500 репликаций).

Молекулярно-філогенетический анализ показал, что триба *Phalarideae* разделилась на две удалённые монофилетичные группы, соответствующие подтрибам *Anthoxanthinae* и *Phalaridinae*. Оказалось, что крупные делеции в интроне гена *trnL* маркируют чётко выделяемые группы видов – группу *Agrostidinae+Brizinae* с делецией в 76 н.п. в шпильке L8 и вставкой TCGAA в шпильке L6, и группу *Aveninae+Koeleriinae* с делецией в 209 н.п. в шпильке L6 (рис. 3). На деревьях, построенных по последовательностям ITS, эти группы также хорошо выделяются. При этом видно, что эти делеции происходили независимо в разных ветвях (данные не показаны).

На древе все исследуемые виды (кроме внешней группы *Secale-Brachypodium*) делятся на две крупные клады. Такое деление отмечается во многих работах при анализе хлоропластных генов *Aveneae* и *Poeae* (Soreng et al. 2007; Quintanar et al. 2007). Соренг обозначает их как Plastid group 1 (*Aveneae*-type), и Plastid group 2 (*Poeae*-type), они в целом соответствуют *Aveneae* и *Poeae* sensu Clayton et Renvoize (1986), но при этом некоторые виды, традиционно относимые к *Poeae*, попадают в первую группу (например, *Briza*), и наоборот, традиционно относимые к овсовым *Aira*, *Avenula* и *Deshampsia* попадают во вторую группу. *Anthoxanthum*, *Hierochloe* и *Phalaris* относятся к первой группе.

Литература

1. Clayton W.D., Renvoize S.A. Genera Graminum. Grasses of the World // Kew Bull. Additional Series 13. 1986. London: HMSO.
2. Haugen P., Simon D.M., Bhattacharya D. The natural history of group I introns// Trends Genet. 2005. Vol. 21. P. 111–119.
3. Quintanar A., Castroviejo S., Catalán P. Phylogeny of the tribe *Aveneae* (*Pooideae*, *Poaceae*) inferred from plastid trnT-F and nuclear ITS sequences // Am. J. Bot. 2007. Vol. 94. P. 1554-1569
4. Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miguel C., Valentini A., Vermet T., Corthier G., Brochmann C. and Willerslev E. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding // Nucleic Acids Research. 2006. Vol. 35. P. e14.
5. Soreng R. J. *Poa* L. // Barkworth M. E., Capels K. M., Long S. L., Piep M. B. (eds.). Flora of North America. North of Mexico. New York, Oxford, 2007. P. 486-601.

РОЖОК А. І., ЄВДОКИМЕНКО К. С., КОЗЕРЕЦЬКА І. А.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01601, вул. Володимирська 64, м. Київ, Україна
andrew_zool@yahoo.com

АНАЛІЗ ПОШИРЕННЯ БІЛКІВ НАДРОДИНИ ТНАР ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК З ЕВОЛЮЦІЄЮ Р ТРАНСПОЗОНА

Білки надродина ТНАР відомі на сьогодні лише у тварин, де вони входять до складу понад 300 білків як ДНК-зв'язуючі домени [1, 2]. Ідентифі-

ковані недавно як самостійна та визначена надродина, ці білки вперше описані як N-термінальний домен транспозази Р транспозона, одного з найбільш вивчених транспозонів дрозофілід [3]. Унікальність ТНАР білків для тварин, а також їх участь у транспозазі Р елемента, для якого відомі серія горизонтальних переносів між геномами тварин [4], викликали жваву зацікавленість до їх походження. Було висунуто низку гіпотез [1], серед яких а) еволюція ТНАР у геномах ранніх тварин з пізнішим їх рекрутингом до транспозази Р елемента та б) занесення їх у геноми ранніх тварин разом з Р транспозоном шляхом горизонтального переносу генів [1]. Оскільки на сьогодні Р елемент відомий лише у дрозофілід (Diptera, Drosophilidae), виникло також запитання чи пов'язані ТНАР білки у інших тварин з ТНАР доменами транспозази Р елемента дрозофілід.

У даному дослідженні ми вирішили перевірити поширення білків надродини ТНАР серед крупних таксонів тваринного царства та порівняти їх з поширенням інших двох доменів транспозази Р елемента – доменів надродин транпозази_37 та 87 кДа, щоб з'ясувати наскільки прослідковується їх спільна еволюція у геномах інших тварин, окрім дрозофілід.

Матеріали і методи

Ідентифікація та аналіз поширення ТНАР доменів були здійснені за допомогою алгоритму CDD-CDART [5] на основі таких баз даних як GenBank, SwissProt, Pfam та деяких інших. Даний підхід найкраще підходить для аналізу білків на рівні доменів та дає найповніший сет даних з відомого на сьогодні різноманіття білкових послідовностей [6]. Всі виявлені нами послідовності ТНАР, транспозаз_37 та 87_кДа статистично достовірно вирівнювались проти білків відповідних надродин ($E < 10^{-3}$), що дозволяло з впевненістю віднести їх до відповідних груп білків. Для додаткового пошуку використовували алгоритм PSI-BLAST з побудовою початкової PSSM-матриці на основі відповідних послідовностей доменів транспозази Р елемента (параметри: база – nr/protein, матриця – blossom62, пеня відкриття гепу – 11, пеня видовження гепу – 1, композитна поправка – умовна корекція композиційної матриці). Для аналізу брали лише домени, які статистично достовірно вирівнювались при першій повторності пошуку ($E < 5 \times 10^{-2}$) або близькі до статистично достовірних значень, які визначались як відповідні домени алгоритмами CDART або Pfam.

Результати та їх обговорення

Результати поширення трьох досліджуваних доменів транспозази Р елемента та асоційованості ТНАР домена з доменом транпозази_37 представлені у Таблиці 1.

Таблиця 1 демонструє, що найпоширенішими є домени ТНАР та транспозаза_37. Домен же 78_кДа-транспозази зустрічається лише у членистоногих, серед яких (дані не наведено) ми виявили його лише у комах, у переважній більшості у складі транспозази Р елемента дрозофілід. Два інших домени значно поширеніші. Найцікавішим виявився той факт, що до-

мен транспозази_37, на відміну від домена TНАР, зустрічається поза межами царства тварин, а саме у в'їчастих одноклітинних групи Ciliophora та у деяких протеобактерій. Ці дані вказують на те, що домени, які входять до складу транспозази Р елемента дрозофілід, зустрічаються поза межами цього таксона. Проте, цікавим є той факт, що С-термінальний 87-кілодальтонний домен цієї транспозази виявлено лише у дрозофілід у складі транспозази Р елемента. Звичайно, ця картина може змінитись. Враховуючи, що секвенування геномів розвивається високими темпами, і все більше і більше груп організмів репрезентовані бодай одним геномом у світових базах даних. Однак, вже сьогодні можна сказати, що цей домен має досить обмежене поширення, і, можливо, зустрічається лише у дрозофілід у складі транспозази.

Таблиця 1

Поширення гомологів трьох доменів транспозази Р елемента дрозофілід серед крупних таксонів живих організмів

Царство	Тип/Відділ	Домен траспозази Р елемента			Асоціація TНАР та транспозази_37
		TНАР	Транспозаза_37	87_кДа-транспозаза	
Alveolata	Ciliophora		+		
Metazoa	Placozoa	+			
	Cnidaria	+	+		+
	Hemichordata	+			
	Chordata	+	+		+
	Echinodermata	+	+		+
	Arthropoda	+	+	+	+
	Nematoda	+			
	Plathelminthes	+			
Bacteria	Proteobacteria		+		

Саме по собі відносно широке розповсюдження двох інших доменів вказує на можливе історичне поширення Р транспозона. Щоб детальніше перевірити це припущення, ми проаналізували зустрічність цих двох доменів разом у складі одного білкового продукта в геномах різних груп організмів. Результати цього аналізу представлені у Таблиці 1 у графі “Асоціація TНАР та транспозази_37”. Дані таблиці свідчать, що така асоціація доменів TНАР та транспозази_37 була виявлена у багатьох груп тварин, окрім дрозофілід зокрема та членистоногих в цілому. Проте нам не вдалось виявити інтактних копій Р транспозона поза межами дрозофілід. Цікаво, що ці асоційовані домени у всіх випадках зустрічались у характерній послідовності, за якої домен TНАР займав характерне для нього N-термінальне положення. Ці дані вже більш переконливо свідчать про те, що Р транспозон, можливо, був активним у геномах представників багатьох груп тварин, і узгоджуються з гіпотезою давності Р елемента, який, очевидно, був присутній в геномах тварин на ранніх стадіях еволюції царства. Проте, за-

лишається відкритим питання чому такого поширення не має C-термінальний домен. Одним з пояснень цього феномену може бути втрата даного домена тваринами, у яких P елемент перестав бути активним. В руслі такого пояснення можна припустити, що еволюційна втрата доменів транспозази P елемента відбувалась в залежності від потенційної “корисності” певного домена з потенціалом залучення його у інші білки. Саме значне поширення та роль у понад 300 інших білках, окрім транспозази, відрізняє THAP домен від інших доменів транспозази P елемента. У зв’язку з цим Quesneville з колегами [1] запропонували гіпотезу періодичного залучення THAP домена у різні білки протягом еволюції царства тварин. І ця гіпотеза знаходить підтвердження у літературі. Таким чином, на відміну від THAP домена, котрий наділений “універсальною” функцією зв’язування ДНК, інші домени поступово втрачаються з геномів різних груп тварин. Проте, ця модель залишається все ще гіпотетичною і потребує подальших досліджень.

THAP доменів, які достовірно подібні білкам надродини, поза межами царства тварин ми не виявили. Тому питання походження цих білків, як і P елемента в цілому, залишається відкритим. Проте, цікавим є факт наявності домена транспозази_37 у вільчатих одноклітинних та, що важливіше, у протеобактерій. Відомо, що багато протеобактерій є ендосимбіонтами дрозодфілід та інших груп тварин, зокрема внутрішньоклітинна ендосимбіотична бактерія *Wolbachia*, для якої відомий горизонтальний обмін генами з дрозодфілідами [7] та іншими групами тварин. Це означає, що знаходження доменів транспозази P елемента чи послідовностей його ДНК поза межами тваринного царства може дати важливі дані до вирішення питання походження білків надродини THAP у геномах тварин та ролі P транспозона у цьому процесі. В свою чергу подібні дослідження допомагають краще зрозуміти яку роль відіграли мобільні елементи геному у розвитку органічного світу.

Висновки

Отримані нами дані свідчать на користь важливої ролі P елемента у еволюції білків надродини THAP.

Виявлені поза межами тваринного царства домени транспозази_37 узгоджуються з гіпотезою можливості горизонтального перенесення послідовностей, які мають відношення до P елемента, між тваринами та іншими царствами живих організмів.

Література

1. *Quesneville H., Nouaud D., Anxolabehere D.* Recurrent recruitment of the THAP DNA-binding domain and molecular domestication of the P-transposable element // *Mol. Biol. Evol.* – 2005. – Vol. 22. – P. 741-746.
2. *Sabogal A., Lyubimov A.Y., Corn J.E., Berger J.M., Rio D.C.* THAP proteins target specific DNA sites through bipartite recognition of adjacent major and minor grooves // *Nature Structural and Molecular Biology* – 2010. – Vol. 17. – P. 117-123.
3. *Roussigne M., Kossida S., Lavigne A.C., Clouaire T., Ecochard V., Glories A., Amalric F., Girard G.P.* The THAP domain: a novel protein motif with similarity to the DNA-binding domain of P element transposase // *Trends Biochem. Sci.* – 2003. – Vol. 28. – P. 66-69.

4. Silva J.C., Kidwell M.G. Horizontal transfer and selection in the evolution of P elements // *Mol. Biol. Evol.* – 2000. – Vol. 17. – P. 1542-1557.

5. Geer L.Y., Domrachev M., Lipman D.J., Bryant S.H. CDART: protein homology by domain architecture // *Genome Res.* – 2002. – Vol. 12. – P. 1619-1623.

6. Marchler-Bauer A., Anderson J.B., Cherukuri P.F., DeWeese-Scott C., Geer L.Y., Gwazd M., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Marchler G.H., Mullokandov M., Shoemaker B.A., Simonyan V., Song J.S., Thissen P.A., Yamashita R.A., Yin J.J., Zhang D., Bryant S.H. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – P. D192-196.

7. Hotopp J.C.D., Clark M.E., Oliveira D., Foster J.M., Fischer P., Torres M.C.M., Giebel J.D., Kumar N., Ishmael N., Wang S., Ingram J., Nene R.V., Shepard J., Tomkins J., Richards S., Spiro D.J., Ghedin E., Slatko B.E., Tettelin H., Werren J.H. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes // *Science* – 2007. – Vol. 317. – P. 1753-1756.

Резюме

Виявлено значне поширення доменів транспозази P транспозона дрозофілід серед крупних таксонів царства тварин та асоціації двох доменів транспозази P елемента у тварин, у яких інтактний P елемент відсутній. Виявлено наявність доменів транспозази_37 поза межами царства тварин, зокрема у деяких протеобактерій. Представлені дані свідчать на користь важливої ролі P транспозона дрозофілід у еволюції білків надродини THAP.

Обнаружено значительное распространение доменов транспозазы P транспозона дрозофилид среди крупных таксонов царства животных и ассоциации двух доменов транспозазы P элемента у животных, у которых интактный P элемент не известен. Обнаружено наличие домена транспозазы_37 за пределами царства животных, в частности в некоторых протеобактерий. Представленные данные свидетельствуют в пользу важной роли P транспозона дрозофилид в эволюции белков надсемейства THAP.

We revealed a vast distribution of drosophilid P element transposase domains among major animal taxa and associations of two domains of the transposase in animals from which intact P element is unknown. We revealed the transposase_37 domain beyond animal taxa, in particular in some proteobacteria. The presented data support an important role of drosophilid P element in the evolution of the THAP superfamily of proteins.

САМОЙЛЕНКО І.О., ЯЦИШИНА А.П., ПІДПАЛА О.В., ВАГІНА І.М., ЛУКАШ Л.Л.

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ вул.Акад. Заболотного,150,
e-mail: i.o.samoylenko@ukr.net*

АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ВІДОМОГО ТА РЕФЕРОВАНОГО ПРОМОТОРІВ ГЕНА MGMT У ЕМБРІОНАЛЬНИХ ГЕРМІНАТИВНИХ КЛІТИНАХ МИШИ

O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансфераза (MGMT) – репаративний фермент, який видаляє алкільні групи з O⁶-позиції гуаніну в ДНК, захищаючи клітини від їхнього токсичного мутагенного та канцерогенного впливів.

Ген *MGMT* експресується в усіх ссавців, але рівень його експресії та активність ферменту варіює не лише міжіндивідуально, але й внутрішньоіндивідуально, залежно від типу клітин або тканин, фази клітинного циклу, стадії розвитку організму, а також виду [1].

Завдяки своїм репаративним функціям *MGMT* є причиною стійкості злоякісних клітин до специфічних алкілувальних сполук хіміотерапевтичних препаратів, тому наразі досліджуються різні підходи для модуляції експресії та активності *MGMT* у пухлинних і нормальних тканинах для покращення терапії раку [2]. Серед них важливим є пошук нетоксичних індукторів і репресорів експресії гена *MGMT*, що зумовлює необхідність детального вивчення регуляції його експресії. Ген *Mgmt* миші є зручною моделлю для вивчення особливостей тканиноспецифічної регуляції його експресії, зокрема для пошуку потенційних функціональних сайтів у промоторі даного гена.

На сьогодні мало даних про організацію промоторної ділянки гена *Mgmt* миші, у межах якої виявлено функціональні сайти лише для декількох транскрипційних факторів (ТФ), зокрема, Zif268, Sp1, Ap1, E2F і URS дріжджів [3]. Нами раніше виявлено цілу низку нових потенційних цис-регуляторних послідовностей у межах промоторів даного гена із бази даних TRED [4]. Цікаво, що у відомому промоторі, з якого зчитується транскрипт NM_008598.2, який є матрицею для білкового продукту, виявили індукбельні та тканиноспецифічні ТФ. Зокрема, CpG-острівок та два різні фрагменти мобільних генетичних елементів MLT1B, у його межах, насичені потенційними сайтами зв'язування із ТФ [4]. Дані ТФ залучені до регуляції як клітин нервової системи та дерми, пухлини яких часто важко піддаються хіміотерапії внаслідок високої активності *MGMT*, так і гематопоетичних клітин, які мають низькі рівні даної алкілтрансферази та чутливі до зазначених ліків.

Регуляція експресії генів є складною і здійснюється на різних рівнях. Точкові мутації в промоторних ділянках є рідкісним явищем, наприклад для гризунів показано, що точкова мутація у сайті зв'язування для ТФ PAX6, який знаходиться у межах В1 елемента промоторів, призводить до зміни експресії відповідних генів [5]. Для гена *MGMT* людини виявлено декілька варіантів одонуклеотидних замін у 5'-UTR та енхансерній послідовності, вплив яких на експресію гена невідомий [6-8], тоді як для мишиного гена такі дані відсутні. Тому метою нашої роботи був аналіз нуклеотидних послідовностей промоторних ділянок гена *Mgmt* миші у клітинних лініях із різним рівнем його експресією.

Матеріали та методи

У роботі використовували одержані у відділі генетики людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України нові клітинні лінії ембріональних гермінативних клітин миші G1 (24 і 104 пасажі), G4 (25 пасаж), G6 (25 пасаж) і G7 (20 пасаж) [9], а також клітинну лінію миші 3Т3 ембріо-

нального походження із Санкт-Петербурзької колекції клітинних ліній [10]. Як контроль брали клітини 12,5-денних ембріонів миші лінії BALB/c. Нуклеотидні послідовності промоторних ділянок гена *Mgmt Mus musculus* взялі із баз даних GenBank та TRED.

Аналізували такі промоторні ділянки гена *Mgmt M. musculus* із бази даних TRED: відомий промотор (77428), (), який має гомологію нуклеотидної послідовності із промотором S82865 [3] у GenBank, транскрипт NM_008598.2 і білковий продукт, та реферований промотор (77430), функціональне значення та існування транскриптів якого залишаються невідомими. Досліджувані промотори позначили як mO6p1 і mO6p2, відповідно. Первинну послідовність промотора mO6p2 довжиною 1000 п.н., отриману з бази даних TRED, розділили на 3 фрагменти розміром приблизно 600 п.н., що мають ділянки перекривання (рис.1).

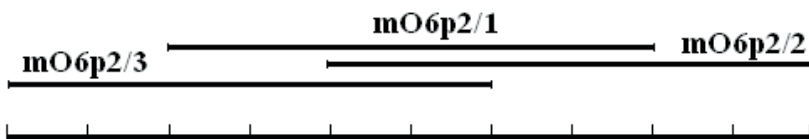


Рис. 1. Ділянки перекривання в промоторі 77430 (mO6p2) гена *Mgmt* миші

Геномну ДНК виділяли за допомогою набору “Genomic DNA Purification kit” (“Fermentas”, Литва) та спектрофотометрично визначали її концентрацію. Дизайн олігонуклеотидів для ампліфікації промоторних ділянок здійснювали за допомогою програми Primer3, ver 0.4.0 [11]. У таблиці наведено праймери, які використовували для ПЛР, та розміри ампліфікованих продуктів.

Таблиця

Перелік праймерів для аналізу промоторів гена *Mgmt* миші

Позначення промотора	Пара праймерів (5'→3')	Довжина продукту ампліфікації
mO6p1	GCTTTAGGACGATAACATTC CCTA TCCAGCATCTGGTGTGAGAT	361 bp
mO6p2/1	AGAGGGGCCTAAGAGAGTGC ACCGGATACCAAAGCTTCC	593 bp
mO6p2/2	ATTTGCTCAGCCTCTTCTTAGTC GCCAAGAACCCCTCAATTC	590 bp
mO6p2/3	CCACGCCTTGAAACAAAATC GCTCACAGCCAGACAGCTC	580 bp

ПЛР проводили на приладі “Т-СУ” фірми “CleaCom”, США. Умови ампліфікації: початкова денатурація при 96 °С протягом 2 хв, далі 35 циклів ампліфікації, кожен з яких складається із денатурації при 94 °С протягом 1

хв, відпалу праймерів при 60 °С протягом 40 с та елонгації при 72 °С протягом 1 хв; завершальним етапом була елонгація при 72 °С протягом 5 хв.

Ампліфіковані фрагменти очищали з використанням набору “DNA Extraxtion Kit” (“Fermentas”, Литва) та аналізували їхні нуклеотидні послідовності. Гомологію нуклеотидних послідовностей промоторних ділянок гена *Mgmt* миші досліджених клітин та послідовностей, наведених у базі даних TRED, аналізували за допомогою програми BLASTN, розміщеної на сервері Національного центру для біотехнологічної інформації (NCBI, США) [12].

Результати та обговорення

У результаті проведеного аналізу просеквенованого фрагмента mОбр1 відомої промоторної ділянки 77428 не виявили змін у розподілі потенційних сайтів зв'язування із ТФ у контролі та усіх досліджених клітинних лініях. Очевидно, це пов'язано із важливістю даного промотора для регуляції експресії гена, а також із залученням інших механізмів регуляції його експресії. Ймовірно причиною різної експресії даного гена у досліджених популяціях клітин є метилування CpG-острівка його промотора Це потребує подальшого експериментального дослідження.

У контролі та досліджених клітинних лініях не виявили змін у розподілі потенційних сайтів зв'язування із ТФ в усіх трьох ампліфікованих фрагментах промотора (рис. 2).

Цікаво, що у реферованій послідовності 77430 (mОбр2) виявили ТАТА-бокс, ряд сайтів зв'язування із ТФ, переважна більшість яких бере участь у регуляції клітинного циклу, ембріогенезу і онкогенезу, та CpG-острівок, насичений декількома цис- регуляторними послідовностями [4]. Наявність таких послідовностей піднімає питання прояву функціональної активності даного промотора до ініціації транскрипції гена та існування його транскриптів.

Таким чином, точкові мутації у промоторі гена *Mgmt* не впливають на рівень його експресії у досліджених клітинних популяціях. Щоб з'ясувати причину такої різниці експресії необхідно вивчити статус метилування CpG-острівка його промотора.

Query	37	CAATCTTTCCTTCTAAGCTCTTTGGCATTTCAGTTTCACATTTCCATTTGAAATCAACTTTACAGTCTC	96
Sbjct	9	CAATCTTTCCTTCTAAGCTCTTTGGCATTTCAGTTTCACATTTCCATTTGAAATCAACTTTACAGTCTC	68
Query	97	TCGATGGCGTCCTTCATTTCACCTTCGCTGACTTGGGTGCTCTGTGCCCCCTGGGC	156
Sbjct	69	TCGATGGCGTCCTTCATTTCACCTTCGCTGACTTGGGTGCTCTGTGCCCCCTGGGC	128
Query	157	CAGTCTCACCCTTCATTTTCGTGTATGACATTCTCTATACGCTCCCCACGCCCTTGAACAAA	216
Sbjct	129	CAGTCTCACCCTTCATTTTCGTGTATGACATTCTCTATACGCTCCCCACGCCCTTGAACAAA	188
Query	217	ATCTGTCATGAAGATGCAACTAGACCTGGCACAGGCTCTACAGCGCCGCGGCCGCCGC	276
Sbjct	189	ATCTGTCATGAAGATGCAACTAGACCTGGCACAGGCTCTACAGCGCCGCGGCCGCCGC	248
Query	277	CCCTCCTGTACGCTCTTAGCCTCGTACTTCACTTTTTAATATGACTTGAATTTAATATATGG	336
Sbjct	249	CCCTCCTGTACGCTCTTAGCCTCGTACTTCACTTTTTAATATGACTTGAATTTAATATATGG	308
Query	337	AACGGCTGTGCTGGCACTCATCTTATTTAGCAAGCTTGTCTAGCCTTAGGTATTTAA	396
Sbjct	309	AACGGCTGTGCTGGCACTCATCTTATTTAGCAAGCTTGTCTAGCCTTAGGTATTTAA	368
Query	397	AGAGATTTATGATTTGCTCAGCCCTCTCTTAGTCCGCTTTAGTTAAGGACAGCAGGEGGA	456
Sbjct	369	AGAGATTTATGATTTGCTCAGCCCTCTCTTAGTCCGCTTTAGTTAAGGACAGCAGGEGGA	428
Query	457	ARTGGAGGCATTGTAAATTTAGGGGGCAAAGAGAAAGGGGGCCTGGTTGAGCCAGCCAG	516
Sbjct	429	ARTGGAGGCATTGTAAATTTAGGGGGCAAAGAGAAAGGGGGCCTGGTTGAGCCAGCCAG	488
Query	517	GTTACGGTGAAGTGGCGGTAATTGAAAGTACCTTAAGATTAARTCCCAATGAGAGGG	576
Sbjct	489	GTTACGGTGAAGTGGCGGTAATTGAAAGTACCTTAAGATTAARTCCCAATGAGAGGG	548
Query	577	AAGCT 581	
Sbjct	549	AAGCT 553	

Рис. 2. Приклад вирівнювання нуклеотидних послідовностей ампліфіковано-го фрагмента mObp2/I з клітин лінії G4, 25 п. (Sbjct) та промоторної ділянки 77430 (Query) із бази даних TRED

Висновок

Аналізуючи результати просеквенованих фрагментів відомого та реферованого промоторів гена *Mgmt* при дослідженні ліній ембріональних гермінативних клітин *M. musculus*, не виявили змін у розподілі потенційних регуляторних послідовностей.

Література

1. Kaina B., Christmann M., Naumann S. et al. MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents// DNA Repair. – 2007. – vol. 6, № 8. – P. 1079–1099.
2. Verbeek B., Southgate T.D., Gilham D.E., Margison G.P. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy // Br. Med. Bull. – 2008. – vol. 85. – P. 17-33.
3. Iwakuma T., Shiraishi A., Fukuhara M., Kawate H., Sekiguchi M. Organization and expression of the mouse gene for DNA repair methyltransferase // DNA Cell. Biol. – 1996. – vol. 15, № 10. – P. 863-872.
4. Яцишина А.П., Підпала О.В., Лукаш Л.Л. *In silico* аналіз потенційних цисрегуляторних елементів у межах промоторних ділянок гена O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази *Mus musculus*. – Київ, Луганськ. – 2010, випуск 19. – 463-472 с.

5. Zhou Y, Zheng JB, Gu X, Li W, Saunders GF. A novel Pax-6 binding site in rodent B1 repetitive elements: coevolution between developmental regulation and repeated elements? // *Gene*. – 2000. – vol. 245 № (2). – P.319-28.

6. Egyházi S, Platz A, Smoczynski K, Ringborg U. Novel O6-methylguanine DNA methyltransferase SNPs: a frequency comparison of patients with familial melanoma and healthy individuals // *Hum. Mutat*. – 2002. – vol.20. – P.408–409.

7. Krzesniak M, Butkiewicz D, Samojedny A, Chorazy M, Rusin M. Polymorphisms in TDG and MGMT genes – epidemiological and functional study in lung cancer patients from Poland. *Ann // Hum. Genet*. – 2004. – vol.68. – P.300–312.

8. Chae MH, Jang JS, Kang HG, Park JH, Park JM, Lee WK, Kam S, Lee EB, Son JW, Park JY. O6-Alkylguanine-DNA alkyltransferase gene polymorphisms and the risk of primary lung cancer // *Mol. Carcinog*. – 2006. – vol.45. – P.239–249.

9. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Підпала О.В., Вагіна І.М., Кочубей Т.П. Одержання нових ліній стовбурових клітин миші і вивчення впливу мікрооточення на їхню каріотипічну мінливість *in vitro* // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2006. – т. 38, № 2. – 144-152с.

10. Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1979. –vol.76, № 2. – P. 615–619.

11. Rozen S., Skaletsky H.J., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S., Misener S. (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* // Humana Press, Totowa, NJ. – 2000. – P. 365-386.

12. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Резюме

При анализе результатов просеквенированных фрагментов известного и реферированного промоторов гена *Mgmt* при исследовании линий эмбриональных герминативных клеток *M. musculus* не обнаружили изменений в распределении потенциальных регуляторных последовательностей.

It has been found no changes in the distribution of potential regulatory sequences within the sequenced fragments of known and refseq promoters of the mouse *Mgmt* gene in studied lines of embryonic germ cells of *M. musculus*.

СЛІЩУК Г.І., КОЖУХОВА Н.Е.

Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААНУ

Україна, 65036, Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: crotallusviperA@ukr.net

БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ *POASEAE*

Загальновідомим фактом є те, що деякі органели еукарій мають свій, частково незалежний від ядра геном. У еукарій відомі мутації геномів мітохондрій, що спричиняють драматичні змінення фенотипу всього організму в цілому. Так, у дріжджів відомі так звані *Pet* мутанти, для яких характерно утворення карликових колоній на агарізованих поживних середовищах з-за неспроможності отримувати енергію за рахунок окислювального фосфорилування [4], також відомі мутації мітохондріального геному людини, що призводять до численних патологій людини [5]. Цитоплазматична чоловіча

стерильність (ЦЧС) у рослин є результатом дії певних мутацій мітохондріону, що викликають патології розвитку андроцею рослин при нормальному розвитку гінецею. Але під впливом продуктів експресії деяких специфічних для кожного типу ЦЧС ядерних генів фертильність рослини частково або повністю відновлюється, що і застосовується в селекції для отримання високопродуктивних гібридів. Явище ЦЧС вперше знайдено в 1933 році у кукурудзи (*Zea mays* L.) – класичного модельного об'єкту генетики [10], але згодом ЦЧС виявлено і у інших видів рослин, що належать до різних таксономічних груп [3, 6, 7].

Гени мітохондріону, асоційовані з виникненням ЦЧС, у кукурудзи досить детально вивчено, охарактеризовано і ановано, створено маркерну систему для швидкої диференціації трьох найбільш поширених типів ЦЧС у кукурудзи (Т-, С- та S- типів) та нормальної цитоплазми дикого типу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [8], але гени-відновники фертильності *Rf* (*restorer of fertility*) не є достатньо вивченими. Саме тому перспективним є використання не лише класичних методів молекулярної генетики, але й методів біоінформатики для вивчення генів, асоційованих з відновленням фертильності у кукурудзи.

Специфічна мутація мітохондріону кукурудзи *T-urf* призводить до виникнення ЦЧС Т-типу (так званий техаський тип) [2]. Продуктом експресії мутантного гену є токсичний білок *Urf*₁₃, який і викликає виникнення специфічного ЦЧС-Т фенотипу. Відомо два гена-відновника Т-типу ЦЧС у кукурудзи – *Rf1* та *Rf2*, що взаємодіють комплементарно один з одним. Продуктом експресії гену *Rf2* є мітохондріальна альдегіддегідрогеназа *mtALDH*, яка нівелює токсичну дію мутантного білку.

Ген *Rf2* розташований в прицентромерному регіоні хромосоми 9 кукурудзи. Алель *rf2a-B73* (GenBank ID AF215823) довжиною 17474 п.н. містить 11 екзонів, *copia*-подібний ретротранспозонний елемент довжиною 7165 п.н. послідовності, подібні МІТЕ у кукурудзи, та послідовність, подібну до аналогічних регіонів генів *Ama*, *CHI*, *incw3*, РНУТІІ та *hml* у кукурудзи.

Мета даної роботи – філогенетичний аналіз генів мітохондріальних альдегіддегідрогеназ – гомологів гену *Rf2* кукурудзи та вивчення внутрішньовидового поліморфізму гену *Rf2*.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували 25 нуклеотидних послідовностей як алелів *Rf2* гену у кукурудзи та генів-гомологів цього гену та 29 послідовностей гену *Rf2* кукурудзи (повних і часткових послідовностей та послідовностей мРНК). Вирівнювання проводили локальне за алгоритмом Сміта-Уотермана [11] за допомогою он-лайн програми «blastn» [1] та глобальне – за алгоритмом Нідлмана-Вунша [9] за допомогою підпрограми «AlignX» програми «VectorNTI». За допомогою блоку аналізу програми «VectorNTI» проводили трансляцію нуклеотидних послідовностей. Трансльовані амінокислотні послідовності також вирівнювали за допомогою під-

програми «AlignX». Дизайн праймерів проводили за допомогою програми «VectorNTI».

Результати та обговорення

Вирівняно 24 нуклеотидні послідовності мітохондріальних альдегіддегідрогеназ представників сімейства *Poaceae* та одну послідовність мітохондріальної альдегіддегідрогенази представника класу дводольних *Lotus japonicus*. За результатами вирівнювання побудовано філогенетичну дендрограму (рис. 1). Ген *Rf2* кукурудзи утворив кластер з геном мітохондріальної альдегіддегідрогенази сорго (I), інші злакові утворили другий кластер, причому представники рису згруповано в окремих субкластер (II). Ген мітохондріальної альдегіддегідрогенази кукурудзи виявився більш поліморфним ніж такий рису.

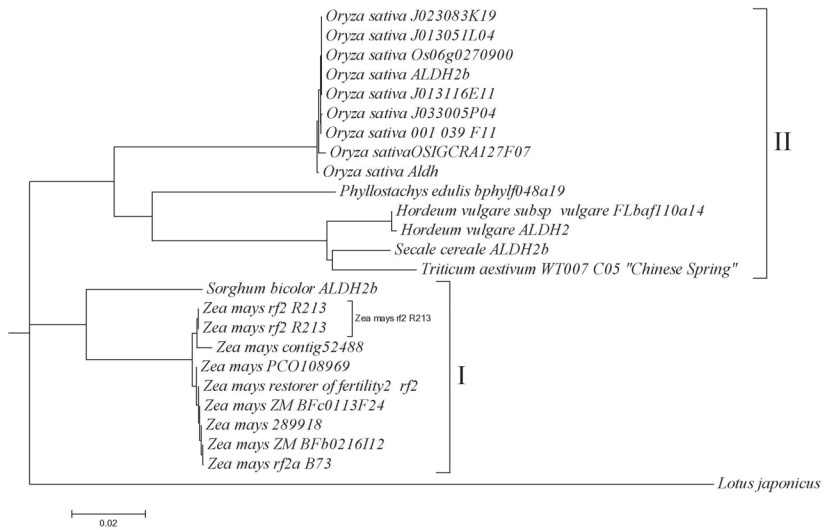


Рис. 1. Філогенетичні взаємовідносини між представниками родини *Poaceae* за результатами вирівнювання генів-гомологів *Rf2*

Проведено вирівнювання 19 нуклеотидних послідовностей *Rf2* гену. Для зони екзонів 3-4 рівень гомології досягав 63,1 %, відмічений високий рівень поліморфізму – численні одонуклеотидні заміни (single nucleotide polymorphism, SNP), делеції та інсерції. За результатами вирівнювання за нуклеотидними послідовностями регіонів екзонів 3-4 неможливо диференціювати алелі *Rf2* та *rf2* (рис. 2).

За результатами вирівнювання амінокислотних послідовностей трансльованих нуклеотидних послідовностей регіонів екзонів 3-4 диференціація алелів *Rf2* та *rf2* також неможлива (рис. 3).

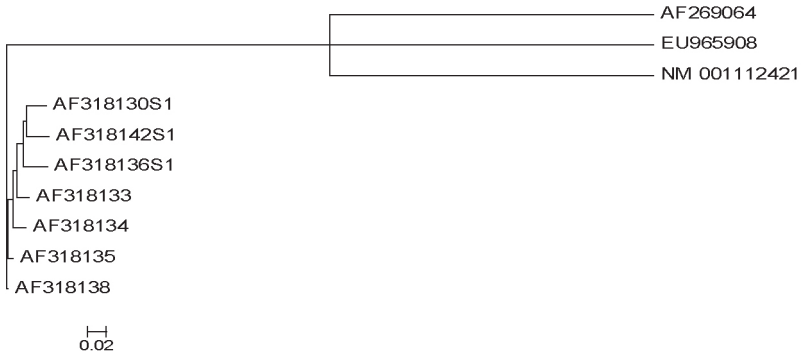


Рис. 2. Дендрограма, побудована за результатами вирівнювання нуклеотидних послідовностей регіону екзонів 3-4 гену *Rf2* кукурудзи

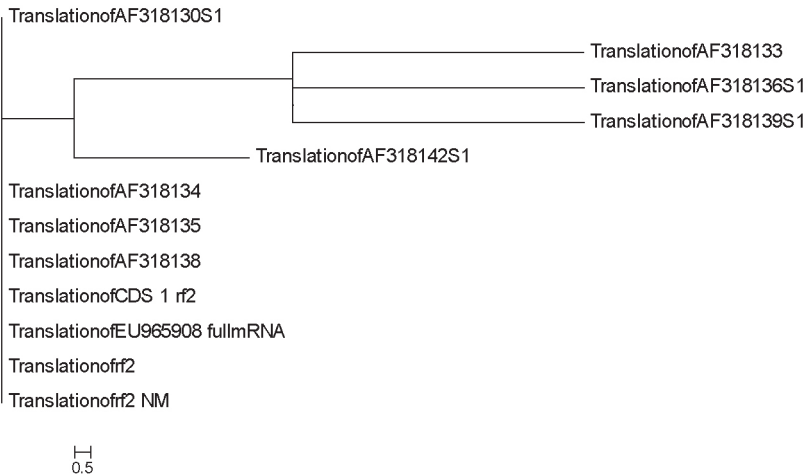


Рис. 3. Дендрограма, побудована за результатами вирівнювання транслятів вирівнювання нуклеотидних послідовностей регіону екзонів 3-4 гену *Rf2* кукурудзи

Для регіону екзонів 6-8 відмічений 100 % рівень гомології нуклеотидних послідовностей, що свідчить про високу консервативність даного регіону, така ж картина спостерігалась для трансльованих послідовностей.

Для регіону екзонів 8-10 рівень гомології склав 93,6 %, відмічено наявність SNP (рис. 4).

За результатами вирівнювання нуклеотидних послідовностей розроблено дизайн праймерів. Добрано пару праймерів до регіону екзонів 8-10 гену *Rf2* (прямий VSGI4SP: 5'-gtcgtgactgcatccaagta-3', зворотній VSGI4ASP:

5'-cttgcattttgatgggtgga-3'), за допомогою яких диференційовано лінії кукурудзи за стерильністю *in silico*.



Рис. 4. Дендрограма, побудована по результатам вирівнювання нуклеотидних послідовностей регіону екзонів 8-10 гену *Rf2* кукурудзи

Висновки. Філогенетична дендрограма, побудована за результатами вирівнювання нуклеотидних послідовностей гену *Rf2* та його гомологів, відображає еволюційні зв'язки представників родини *Poaceae* та співпадає з такими, побудованими на основі аналізу генів рибосомальної РНК. Різні регіони гену *Rf2* виявили неоднаковий рівень поліморфізму, що може свідчити про неоднакову значність даних доменів протеїну для його функціонування – деякі ділянки виявили високий консерватизм, а деякі навпаки мали певний рівень поліморфізму. Припускаємо, що існує більше ніж два алеля гену *Rf2* і що весь природний поліморфізм гену *Rf2* не обмежується лише відновленням фертильності. В результаті аналізу добрано праймери, що дозволили диференціювати лінії кукурудзи з техаським типом ЦЧС на фертильні і стерильні лінії при *in silico* ПЛР-аналізі; в ПЛР *in vitro* розроблені праймери допоможуть також в ідентифікації чоловічостерильних генотипів кукурудзи.

Література

1. ncbi.nlm.nih.gov .
2. Allen J.O., Fauron C.M., Minx P., Roark L., Oddiraju S. et al. Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize // *Genetics*. – 2007. – Vol. 77. – P. 1173–1192.
3. Chen J., Hu J., Vick B.A., Jan C.C. Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers // *Theor. and Appl. Genet.* – 2006. – Vol. 13. – P. 122-127.
4. Ferguson L.R., von Borstel R.C. Induction of the cytoplasmic 'petite' mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mutation Research*. – 1992. – Vol. 265. – P. 103-48.
5. Finsterer J. Hematological manifestations of primary mitochondrial disorders // *Acta Haematol.* – 2007. – Vol. 118. – P. 88–98.
6. Huang J. Hu J., Xu X., Li S., Yang D., Ren F., Liu X., Zhu Y. Fine mapping of the nuclear fertility restorer gene for HL cytoplasmic male sterility in rice // *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. – 2003. – Vol. 44. – P. 285-289.
7. Lee J., Yoon J. B., Park H. B. Linkage analysis between the partial restoration (*pr*) and the restorer-of-fertility (*Rf*) loci in pepper cytoplasmic male sterility // *Theor. and Appl. Genet.* – 2008. – Vol. 117. – P. 383-389.

8. Liu Z., Peter S.O., Long M., Weingartner U., Stamp P., Kaeser O. A PCR Assay for Rapid Discrimination of Sterile Cytoplasm Types in Maize // Crop Science, – 2002. - Vol. 42. - P. 566-569.

9. Needleman S. B., Wunsch, C. D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins // Journal of Molecular Biology . - 1970. - Vol. 48. - P. 443–453.

10. Rhoades M. M. The cytoplasmic inheritance of male sterility in Zea // Journal of Genetics. – 1933. - Vol. 27. - P. 71 – 93.

11. Smith T. F. Waterman M. S. Identification of Common Molecular Subsequences // Journal of Molecular Biology. - 1981. – Vol. 147. - P. 195–197.

Резюме

Проведено вирівнювання нуклеотидних послідовностей гену *Rf2* та його гомологів, за результатами якого побудована філогенетична дендрограма, що відображає еволюційні зв'язки представників *Poaceae*. Зроблено припущення щодо наявності більш двох алелів гену *Rf2*. Розроблено праймери для диференціації ліній кукурудзи з Т-ЦМС на фертильні і стерильні в *in silico* ПЛІР-аналізі.

Rf2 gene and its homologs sequences local alignment has been conducted. Phylogenetic dendrogram, based on results of alignment, has been built; it displays evolutionary relations between *Poaceae* members. Existence of more than two *Rf2* alleles has been assumed. Primers, which allowed *in silico* PCR differentiation of sterile and fertile T-CMS maize lines has been designed.

Проведено вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *Rf2* та його гомологів, по результатам якого побудована філогенетична дендрограма, що відображає еволюційні зв'язки представників *Poaceae*. Передполагали наявність більше двох алелів *Rf2* гена. Розроблено праймери для диференціації ліній кукурудзи з Т-ЦМС на фертильні і стерильні в *in silico* ПЦР-аналізі.

**ШИЛІНА Ю.В.¹, ГУЩА М.І.¹, МОЛОЖАВА О.С.², ДЯЧЕНКО А.І.¹,
МОРОЗ Ю.І.²**

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 003680, Київ-143, вул. Заболотного, 148, e-mail: j.shilina@gmail.com

²Київський національний університет ім. Тараса Шевченка,
Україна, 003022, Київ, пр. Глушкова 2

РОЛЬ ФАКУЛЬТАТИВНОГО КОМПОНЕНТУ ГЕНОМУ В АДАПТИВНИХ МОДИФІКАЦІЯХ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ БАКТЕРІЙ

Зростання антропогенного впливу на екосистеми протягом останніх десятиліть привело до тотальних змін у природному середовищі. Особливої актуальності набула проблема накопичення в екосистемах патогенних мікроорганізмів, здатних уражати широке коло організмів-господарів (людини, тварин і рослин) і тривалий час виживати в зовнішньому середовищі поза організмом господаря. До бактеріальних патогенів з властивостями

полібіотрофів відносять, зокрема, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, комплексу *Burkholderia (P.) cepacia*, *Erwinia carotovora* та інші). Збудники сапронозів *Yersinia*, *Listeria*, *Salmonella* широко розповсюджені в навколишньому середовищі і здатні проявляти свої патогенні властивості при взаємодії з рослинами [1]. Показано, що рослини і тварини можуть реагувати на одні і ті ж фактори патогенності мікроорганізмів [2]. Одним з таких факторів патогенності є ліпополісахариди, які входять до складу клітинної стінки бактерій, виділяються ними у зовнішнє середовище і можуть зазнавати різних модифікацій в залежності від умов середовища, що сприяє адаптації бактерій. Ефективна реалізація адаптивних механізмів має забезпечуватися їх закріпленням у геномі та експресією за відповідних умов. Мета даної роботи – розглянути структурно-функціональні особливості геномів бактерій, що дозволяють їм адаптуватися до дії широкого спектру умов існування, зокрема, шляхом модифікації одного з їх факторів патогенності – ліпополісахариду.

Структурно-функціональні особливості геномів бактерій, що дозволяють їм адаптуватися до різних умов. Враховуючи різні темпи мутаційних змін, а також особливості організації, складу, характеру протікання основних матричних процесів (реплікації, транскрипції, трансляції) і розподілу між дочірніми клітинами, було запропоновано виділяти в геномі облігатний та факультативний компоненти [3]. Облігатний компонент (ОК) – це сукупність генів, локалізованих в хромосомах та ДНК-вмісних оргanelлах (мітохондріях, пластидах), що забезпечують основні процеси життєдіяльності клітин. Факультативний компонент (ФК) утворений послідовностями ДНК, кількість і топографія яких може вільно варіювати в різних клітинах та у різних особин. До ФК належать фракції повторюваних послідовностей ДНК, ампліфіковані сегменти, мобільні генетичні елементи, псевдогени, ендегенні віруси, плазміди.

З мутаціями у загальноприйнятому значенні пов'язують лише ті зміни у геномі, що безпосередньо стосуються ОК. Структурні зміни ФК (варіації за Голубовським) звичайно викликаються такими змінами абіотичних і біотичних факторів середовища, при котрих канонічні мутації виникають рідко. ФК першими сприймають немутагенні зміни середовища, а потім їх зміни (варіації) ведуть до виникнення мутацій ОК. Саме взаємодію ОК і ФК розглядають як основне джерело спадкових змін, що в класичній генетиці і синтетичній теорії еволюції носить назву спонтанного мутаційного процесу. Спадкові зміни, викликані ФК, можуть стосуватися суттєвих характеристик клітин і організму – від виникнення генних мутацій до дестабілізації геному. Так звані адаптивні мутації, що підвищують пристосованість бактерій до дії різних факторів, в основному зачіпають факультативний геном, що визначає безпосередньо екологічні характеристики даного виду.

Здатність до активації ФК розглядають як різновид адаптивної відповіді на дію стресорів. Саме з ФК можна пов'язати припущення про існу-

вання в клітинах про- і еукаріот індуцибельних систем, здатних приводити до істотної реконструкції геному при дії різних екзогенних і ендогенних факторів та функціонування механізмів їх регуляції. Зокрема вважають, що регуляторні сайти мобільних генетичних елементів здатні реагувати на різноманітні зовнішні і внутрішні стресові впливи, що веде до масових екцизій і транспозиції мобільних генетичних елементів [4]. Масові транспозиції можуть відбуватися, зокрема, в діапазоні доз іонізуючого випромінювання і УФ, що викликають активацію RecA-залежної системи репарації (SOS-відповідь) [5]. В результаті можливе перемикання генетичних програм за участю транспозонів, що може підвищувати виживання популяції [4].

Уявлення про особливості різних компонентів геному є корисними при аналізі механізмів адаптації бактерій до виживання за різних умов. Адаптивна відповідь мікроорганізмів має системний характер і пов'язана з перебудовами метаболізму, клітинної оболонки, зміною стійкістю до різних факторів середовища і еспресії факторів патогенності. До адаптивних реакцій бактерій відносяться модифікації таких поверхневих структур, як ліпополісахариди. В цих процесах важлива роль належить саме факультативним компонентам геному.

Роль факультативних компонентів геному у перебудовах ліпополісахариду бактерій. Ліпополісахарид (ЛПС) є необхідним компонентом клітинної оболонки грамнегативних бактерій. Структура ЛПС в загальних рисах подібна у бактерій різного екологічного походження (патогенних для людини і тварин, фітопатогенних, симбіонтів, сапрофітів), хоча у них виявлені певні структурні та функціональні особливості. Бактеріальні ЛПС складаються з гідрофобної частини – ліпиду А (ендотоксину), олігосахаридного ядра (кора) та дистального полісахариду (О-антигену). ЛПС вважають одним з головних факторів вірулентності грамнегативних бактерій.

Біосинтез ЛПС є багатостадійним процесом, який каталізується рядом ферментів і особливості його модифікацій детермінуються генами ферментів синтезу окремих компонентів ЛПС та регуляцією їх еспресії. Патогенні бактерії можуть використовувати структурно-функціональні модифікації ЛПС як для реалізації патогенного потенціалу в організмі господаря, так і при переході до стадії резервації для виживання в стійких організмах тварин, в рослинних організмах і у зовнішньому середовищі

Модифікації ЛПС можуть здійснюватися на рівні їх первинної структури (хімічний склад головного вуглеводного ланцюга макромолекули ЛПС, наявності, локалізації, кількісного і якісного складу бічних хімічних груп, заряду окремих полярних груп) та вторинної структури (конформації макромолекул ЛПС).

На участь ФК геному модифікаціях ЛПС вказує наявність коротких повторюваних послідовностей в локусах, котрі містять гени ферментів синтезу ЛПС. Встановлено, що в структурних перебудовах ЛПС *Haemophilus*

influenzae бере участь ген IgtC і його активація пов'язана зі змінами в кількості тетра nukлеотидних повторів [6]. Показано, що до дестабілізації тетра nukлеотидних повторів (5'AGTC) приводила інактивація гену ДНК-полімерази pol I. Це свідчить про участь механізму репарації помилкового спарювання основ ("mismatch repair") в забезпеченні гіпермутабельності тетра nukлеотидних повторів, обумовлюючи адаптивне переключення без підвищення рівнів загальної мутабельності геному.

До прикладів участі факультативних компонентів геному в модифікаціях ЛПС різних видів ентеробактерій та *P. aeruginosa* можна віднести детермінацію лізогенізуючим фагом змін експресії ЛПС-синтезуючих ферментів (O-антигенполімераз, трансацилаз, глікозилаз) [7].

Молекулярна основа фазових змін структури ЛПС у *Legionella pneumophila* забезпечується нестабільним генетичним елементом (30 kb), в котрого виявлені кодуючі послідовності для 30 генів. В деяких рамках читування виявлена гомологія з фаговими генами, що свідчить про фагове походження цього елемента [8]. У вірулентних штамів *L. pneumophila* цей елемент локалізований на хромосомі, а у мутантних фенотипів зі змінами епітопів ЛПС і втратою вірулентності, відбувається його ексцизія з хромосоми та реплікація як висококопійної плазміди. Ексцизія елемента з хромосоми відбувається RecA-незалежним шляхом, що не виключає участі гомологів RecE, RecT і RusA, які кодується цим елементом [8].

Фенотипічне переключення при переході патогенної S-форми (116S) *Pseudomonas tolaasii* до непатогенної R-форми відбувається завдяки зворотній дуплікації 661 bp-елементу з локусом rpeN [9]. Порушення локусу *gcsA* у штамів 116S та 116R приводило до втрати резистентності до УФ і здатності до переходу S-R у штаму 116SrecA, не впливаючи на здатність до переходу R-S у 116RrecA. Таким чином, перехід від 116 S до 116 R у *P. tolaasii* є *gcsA*-залежним, а перехід від 116R до 116S є *gcsA*-незалежним процесом [9].

У перебудовах ЛПС встановлена участь таких елементів ФК як плазміди. Модифікації різних компонентів ЛПС – полісахаридної частини (*Shigella sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*), ліпиду A (*S. typhimurium*) детермінуються плазмідними генами. У ентеропатогенних *E. coli* та *S. flexneri* велика плазміда вірулентності pINV здатна до зворотної інтеграції-ексцизії з різною точністю за участю *gcsA*-залежних механізмів [10]. Гени інвазивності плазміди *inv* у шигел відіграють певну роль в експресії біологічної активності ЛПС, зворотно активуючи ЛПС, що проявляє імуносупресивну активність [11]. У *S. sonnei* на плазміді вірулентності pSS120 знаходиться кластер генів, що контролює утворення O-специфічних ланцюгів, а хромосомний кластер в значній мірі делетований, тоді як у *S. flexneri* в синтезі полісахариду плазміди виконують насамперед регуляторну функцію [11]. Припускають, що O-антигени, кодо-

вані генами плазміді, надають селективних переваг в адаптації бактерій до умов зовнішнього середовища.

Синтез різних компонентів ЛПС у *S. typhimurium* детермінується тільки хромосомними генами. Вплив генів плазміді вірулентності в експресії біологічної дії (імуносупресивного ефекту) високомолекулярних фракцій ЛПС можливо реалізується через зміни конформаційних детермінант ЛПС [12]. Активація термолабільного імуносупресивного компоненту ЛПС *S. typhimurium* 415 пов'язана з активністю генів плазміді вірулентності, в той час як термостабільного компонента – з хромосомними генами [12].

Нами показана зміна фітотоксичної активності ЛПС різних бактерій в результаті їх хімічної обробки, яка імітує природні процеси зміни активності [13]. У патогенних для тварин штамів *P. aeruginosa* 1961 та *S. typhimurium* більшу токсичність для рослин мали препарати ЛПС, виділені воднофенольним методом (аналоги ЛПС авірулентних для тварин штамів). У фітопатогенного *Burkholderia cepacia* 4201 та у *S. sonnei* більша токсичність була виявлена у редокс-активованого препарату (аналога ЛПС вірулентних штамів). Можливо, процес активації ЛПС в результаті хімічної редокс-обробки (0,1 М 2-меркаптоетанолом) подібний до активації бактеріального ЛПС в організмі господаря і має зворотний характер.

Встановлено, що на синтез ЛПС можуть впливати різні плазміді. Плазміді коліциногенності та їх похідні Collb, srd 25, Collbrdd7, Collbrdd2 та R64-11 у *S. typhimurium* обумовлювали зміни складу та структури ЛПС (зменшення кількості повторюваних одиниць в О-специфічних бічних ланцюгах, значне збільшення вмісту рамнози, маннози, глюкози і втрати абеквози) [14]. У *E. coli* ідентифіковано ген cldpHS-2 плазмідного походження, що контролює довжину О-антигенних ланцюгів подібно до rfa-генів хромосоми [15]. У *Azospirillum brasilense* Sp245 втрата плазмід p120 і p130 приводила до суттєвих змін в структурі ЛПС, а втрата плазміді p115 у мутантної S- форми *A. brasilense* Sp7 – до змін в одному з О-специфічних ПС, що корелює зі зміною форми поверхні колоній з S– на R–форму [16]. У бактерій *S. dysenteriae* Dt66 типу I виявлена плазміді (70 kb), яка обумовлює стійкість бактерій до хлорамфеніколу, півмецикліналу, зв'язування барвіка Конго червоної, адгезію до клітин господаря, здатність викликати кератокон'ютивіт та синтез ланцюгів ЛПС [17].

Таким чином, елементи факультативного геному – повторювані послідовності, фаги та плазміді, можуть детермінувати перебудови структури та зміну активності ЛПС бактерій, що залежить від умов існування бактеріальних популяцій.

Висновки. Показано важливу роль факультативних елементів геному патогенних бактерій у структурно-функціональних модифікаціях ЛПС, що може забезпечувати як реалізацію патогенного потенціалу бактерій в організмі господаря, так і перехід до стадії резервації для виживання в стій-

ких організмах тварин, в рослинних організмах і у зовнішньому середовищі.

Література

1. *Тимченко Н.Ф., Булгаков В.П., Булах Е.В.* Взаимодействие *Yersinia*, *Listeria* и *Salmonella* с растительными клетками // Журн. микробиол. – 2000. – № 1. – С. 6-10.
2. *Rahme L.G., Stevens E.J., Wolfort S.F. et al.* Common virulence factor for bacterial pathogenicity in plants and animals // Science. – 1995. – Vol. 268. – P. 1899-1902.
3. *Голубовский М.Д.* Век генетики: эволюция идей и понятий. — СПб.: Борей Арт, 2000. —262 с.
4. *Салганик Р.И.* Молекулярные механизмы стресс-индуцированной наследственной изменчивости // Генетика. – 1987. – 23, № 6. – С. 1003-1010.
5. *Гераськин С.А.* Концепция биологического действия малых доз ионизирующей радиации // Радиационная биология. Радиозэкология. – 1995. – 35, № 5. – С. 571 – 580.
6. *Hood D.W., Deadman M. E., Jennings M. P., Bisercic M.* DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae* (microbiology/whole genome sequencing /pathogenicity) // PNAS – 1996. – 93, № 20. – P. 1121-1125.
7. *Крылов В.Н.* Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий // Генетика. – 2003. – 39, № 5. – С. 595-620.
8. *Luneberg E., Mayer B., Daryab N. et al.* Chromosomal insertion and excision of a 30 kb unstable genetic element is responsible for phase variation of lipopolysaccharide and other virulence determinants in *Legionella pneumophila* // Mol. Microbiol. – 2001. – 39, № 5. – P. 1259-1271.
9. *Sinha H., Pain A., Johnstone K.* Analysis of the role of *recA* in phenotypic switching of *Pseudomonas tolaasii* // J. Bacteriol. – 2000. – 182, № 22. – P. 6532-6535.
10. *Zagaglia C, Casalino M, Colonna B. et al.* Virulence plasmids of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* integrate into a specific site on the host chromosome: integration greatly reduces expression of plasmid-carried virulence genes // Infect. Immun. – 1991.- 59, № 3. – P. 792-799.
11. *Борисова Е.В., Бондаренко В.М., Моложавая О.С., Борисов В.А.* Иммуносупрессивная активность *Shigella sonnei*, различающихся по наличию плазмиды pSS120 // Журн. микробиол. – 1997.- № 6. – С. 65-68.
12. *Борисова Е.В., Бондаренко В.М., Моложавая О.С., Борисов В.А.* Зависимость иммуносупрессивного действия липополисахарида от степени патогенности сальмонелл // Журн. микробиол. – 2001. – № 1. – С. 40-43.
13. *Моложава О.С., Шилина Ю.В.* Фітотоксичність модифікованих ліполісахаридів бактерій // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2007. – Вип. 2 (11). – С. 76-82.
14. *Hoffman J., Lindberg B., Glowacka M. et al.* Structural studies of the lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* 902 (*CollB drd2*) // Eur. J. Biochem. – 1980. – 105. – P. 103-107.
15. *Stevenson G., Kessler A., Reeves P.R.* A plasmid-borne O-antigen chain length determinant and its relationship to other chain length determinants // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – 125, № 1. – P. 23-30.
16. *Каменева С.В., Муroneц Е.М.* Генетический контроль процессов взаимодействия бактерий с растениями в ассоциациях // Генетика. – 1999. – 35, № 11. – С. 1480-1494.

17. Datta S., Pal A., Basu S., Banerjee P.C. Involvement of a 70-kb plasmid of the epidemic *Shigella dysenteriae* type 1 (Dt66) strain in drug-resistance, lipopolysaccharide synthesis, and virulence // *Microb. Drug Resist.* – 1997. – 3, № 4. – P. 351-357.

Резюме

Показана адаптивная роль факультативных элементов генома бактерий. В качестве примера рассмотрены модификации липополисахарида.

The adaptive role of facultative elements of bacteria genome are considered. As examples the modification of lipopolysaccharides are examined.

TSYGANKOVA V. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine,
Kiev, Murmanskaya str., 1*

ROLE OF SMALL REGULATORY RNAs IN IMMUNO-PROTECTIVE PROCESSES OF PLANT CELLS

Over the past 15 years, much attention has been paid to isolate from eukaryotic cells the small regulatory RNAs and to determine their biological role in RNA interference (RNAi) that is now a term referring to post-transcriptional gene silencing (PTGS) phenomena in plants and animals, and to quelling in fungi [1 – 6]. For small regulatory RNAs' discovery the scientists Andrew Fire and Craig Mello were awarded in 2006 to the Nobel Prize in Physiology and Medicine. Gene silencing mediated by either degradation or translation arrest of target RNA has roles in adaptive protection against viruses, in genome defense against mobile DNA elements and in developmental regulation of gene expression. These silencing systems involve processing of two type small regulatory RNAs: microRNA (miRNA) and short interfering RNA (siRNA) [1 – 6]. The miRNA is generated from miRNA precursor by two rounds of endoribonuclease cleavage by RNase III-like enzymes: pre-miRNA of ~70 nucleotides (nt) is initially processed by RNase III endoribonuclease named Drosha and is “hairpin” primary transcript from one strand of distinct genomic loci. Then pre-miRNA is exported to the cytoplasm, where mature single-stranded ~21-22-nt miRNA is generated after processing of pre-miRNA by RNase III endoribonuclease named Dicer and incorporated into micro-ribonucleoproteins (miRNPs) [3, 4]. Another type of siRNA of ~22-24-nt is generated from longer double-stranded RNA (dsRNA) molecules through their cleavage by RNase III endoribonuclease named Dicer into short single-stranded (ss) siRNA [1, 2, 5, 6]. Then one part of (ss) siRNA is used for silencing of target mRNA, but other part (ss) siRNA act as primers on complementary mRNA leading to the production of new dsRNA with help of RNA-dependent RNA polymerase (RdRP). It is proposed that siRNA originates from longer transcripts derived from repetitive sequences, transposons and transgenes. The si/miRNA along with the anti-sense complementary structure to mRNA functions in a dual role [1 – 14]. The roles are: 1) together

with site-specific multi-subunit RNase, referred to as RNA-induced silencing complex (RISC), si/miRNA determines an age period of each mRNA molecule by destroying aberrant and defective mRNA structures that can appear faultily in the cells by specifically mRNA degradation (cleavage) or their translation arrest (silencing) and 2) si/miRNA provides protection against pathogens and parasites. In both cases, these biological effects are achieved through specifically binding si/miRNA to complementary sequences of target their own cell mRNA, pathogenic virus mRNA or parasite mRNA. In animal and plant cells si/miRNA act by different ways: si/miRNA of animals bind to the 3'-untranslated regions (3'-UTR) or the open reading frame (ORF) of target mRNA, while si/miRNA of plants bind to the coding regions of target mRNA [15].

With respect to protection against pathogens and parasites, the number of si/miRNA molecules produced in plant cells against these antagonists in response to a mass infection is not sufficient to provide effective protection. There are two approaches to increase the number of si/miRNA in response to pathogen or parasite attacks [1, 5, 7 – 9]. These are either to put a number of additional si/miRNA genes in cells through genetic transformation or to activate the expression of si/miRNA synthesis cellular genes themselves by certain specific inductors.

Recently our field and laboratory experiments have showed that plant growth regulators (PGRs) significantly increased plant immunity to viral pathogens, nematodes and insect herbivores. In this work we conducted further investigations on the determination of the increasing resistance of sugar beet against the sugar beet nematode, *Heterodera schachtii* Schmidt by growth regulator Radostim-super created in the Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry of NAS of Ukraine together with the State enterprise “Interdepartmental Scientific and Technological Centre Agrobiotech” of NAS and MES of Ukraine.

Materials and methods

As model experiments, we took beet plants and beet cyst-generative root-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. Beet seeds with high germinability were sprouted in Petri dishes on nematode-free aqueous medium (control) and with suspension of nematode cysts which fruited nematode larvae in the incubation process at 23 °C (approximately at 5th-7th days). Radostim-super – plant growth regulator of high activity was added in parallel tests.

Prior to these experiments, we had developed the method of separation of high-purity si/miRNA preparations for testing affinity of si/miRNA to mRNA and function (silence) activity in cell-free protein synthesis system.

There are many si/miRNA isolation methods [11 – 14]. Our elaborated method of si/miRNA separation consists of the following processes: 1) isolation of total RNA from plant cells [16 – 18]; 2) separation of poly-(A)⁺RNA (i.e. mRNA) and poly(A)⁻RNA on the oligo(dT)-cellulose columns with further using poly-(A)⁺RNA to test functional activity si/miRNA in cell-free system of protein synthesis; 3) precipitation of high-molecular poly(A)⁻ RNA from eluate was made by 10 % polyethylene glycol solution (mol. weigh 8000), and si/miRNA

from solution by 96 % ethanol under -22⁰C during one day; 4) precipitation poly(A)⁺RNA after elution from column was made by ethanol; 5) molecular hybridization in solution of low-molecular si/miRNA with poly-(A)⁺RNA; 6) denature of hybrid molecules poly-(A)⁺RNA with si/miRNA and separation poly-(A)⁺RNA from si/miRNA on the oligo(dT)-cellulose columns; 7) precipitation si/miRNA by 96 % ethanol and testing its silencing activity in cell-free system of protein synthesis.

For researches on si/miRNA hybridization out of mRNA, before receiving si/miRNA, it was intensely marked *in vivo* with ³³P using Na₂HP³³O₄ [17]. For researches on testing its inhibitory activity in cell-free protein synthesis systems, we used unmarked si/miRNA [18].

The dispersion statistical analysis of data was carried out according to Student.

Results and discussion

Conducting these experiments we based on the assumption that organism affection with different types of pathogens or parasites induced synthesis of si/miRNA pools specific to their mRNA structure, and it allowed us to assume, too, that plant growth regulator Radostim-super stimulated synthesis of si/miRNA which improved plant immunity through the specified mechanism of si/miRNA action. Using molecular-hybridization method we studied the level of si/miRNA homology relatively to mRNA in the following variants of experiments: in control plants; in the experiments with plants treated with Radostim-super plant growth regulator; in plants at incubation with nematodes; and in plants infected with nematodes in the background under action of Radostim-super plant growth regulator (Table):

Table

Intensification of anti-nematode properties of si/miRNA of 5-day beet sprouts under influence of Radostim-super plant growth regulator and nematode larvae

No.	Experiment variants	Level of homology on hybridization of mRNA with P ³³ si/miRNA (count per min/20µg of mRNA)	Indicator of inhibition of protein synthesis in cell-free system count per min/20mg of protein*	
			mRNA from plants + P ³³ si/miRNA from plants	mRNA from larvae + P ³³ si/miRNA from plants
1.	Hybrids of mRNA with P ³³ si/miRNA of control plants	8724 ± 146 (100%)	100 %	10 %

End of table

No.	Experiment variants	Level of homology on hybridization of mRNA with P ³³ si/miRNA (count per min/20µg of mRNA)	Indicator of inhibition of protein synthesis in cell-free system (count per min/20mg of protein*)	
			mRNA from plants + P ³³ si/miRNA from plants	mRNA from larvae + P ³³ si/miRNA from plants
2.	Hybrids of mRNA from control plants with P ³³ si/miRNA from plants treated with Radostim-super	6850 ± 224 (83%)**	82 %	15 %
3.	Hybrids of mRNA from control plants with P ³³ si/miRNA from plants incubated with nematode larvae	6358 ± 182 (73%)**	65 %	36 %
4.	Hybrids of mRNA from control plants with P ³³ si/miRNA from plants incubated with Radostim-super and nematode larvae	5583 ± 164 (64%)**	46 %	58 %

Note: free-cell system of protein synthesis from wheat sprouts was used; S³⁵ methionine amino acid was taken as a marked predecessor.

* the same experiment variants as in the investigations on hybridization were used in the cell-free protein synthesis system.

** – availability of differences from control, p<0,05, n=3

According to the obtained results nematode infection reduces synthesis of the plant own cellular si/miRNA, which increases significantly at stimulation with Radostim-super plant growth regulator, but this accelerated growth is suppressed by larvae and at the same time, synthesis of protective anti-nematode si/miRNA is increased with the complementary structure to nematode mRNA (i. e. the reprogram of plant cell genome is occurs).

Conclusions

Thus the results of this work show that treatment of sugar beet plants by the Radostim-super plant growth regulator stimulates synthesis of small regulatory si/miRNAs that enhance plant resistance against the nematode *Heterodera schachtii*.

References

1. Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // Genes @ Development. – 2001. – V. 15. – P. 188 – 200.

2. *Hamilton A., Voinnet O., Chappell L. et al.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing // *The EMBO Journal*. – 2002. – V. 21, № 17. – P. 4671 – 4679.

3. *Lee Y., Ahn C., Han J., et al.* The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing // *Nature*. – 2003. – Vol. 425. – P. 415 – 419.

4. *Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S., et al.* miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs // *Genes Dev*. – 2002. – Vol. 16. – P. 720 – 728.

5. *Leung R. K. M., Whittaker P. A.* RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics // *Pharmacology and Therapeutics*. – 2005. – № 107. – P. 222 – 239.

6. *Aravin A., Tuschl T.* Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing // *FEBS Letters*. – 2005. – V. 579. – P. 5830 – 5840.

7. *Bakhetia M., Charlton W. L., Urwin P. E. et al.* RNA interference and plant parasitic nematodes // *Trends in Plant Science*. – 2005. – V.10, № 8. – P. 362 – 367

8. *Gheysen G., Vanholme B.* RNAi from plants to nematodes // *Trends in Biotechnology*. – 2006. – V. 25, № 3. – P. 89 – 92

9. *Knox D.P., Geldhof P., Visser A., Britton C.* RNA interference in parasitic nematodes of animals: a reality check? // *Trends in Parasitology*. – 2007. – V. 23, № 3. – P. 105 – 107.

10. *Jian X., Zhang L., Li G. et al.* Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. // *Genomics*. – 2010. – V. 95. – P. 47 – 55.

11. *Chen R., Hu Z., Zhang H.* Identification of MicroRNAs in Wild Soybean (*Glycine soja*) // *J. of Integrative Plant Biology*. – 2009. – V. 51, № 12. – P. 1071–1079.

12. *Park W., Li J., Song R., Messing J. and Chen X.* CARPEL FACTORY, a Dicer Homolog, and HEN1, a Novel Protein, Act in microRNA Metabolism in *Arabidopsis thaliana* induced silencing complex (RISC), which targets homologous RNAs for degradation // *Current Biology*. – 2002. – V. 12. – P. 1484–1495.

13. *Llave C., Kasschau K. D., Rector M. A. and Carrington J. C.* Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants // *Plant Cell*. – 2002. – V. 14. – P. 1605–1619.

14. *Lu C., Meyers B. C., Green P. G.* Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing // *Methods*. – 2007. – V. 43. – P. 110 – 117.

15. *Yang T., Xue L., An L.* Functional diversity of miRNA in plants // *Plant Science*. – 2007. – V. 172. – P. 423 – 432.

16. *Tsygankova V. A., Blume Ya.B. et al.* An unusual minor protein appearing in embryonic axis cells of haricot bean seeds following germination process stimulated by 6-methylthiouracil // *Biopolymers and cell*. – 1998. – V. 14, №5. – P. 438 – 448.

17. *Tsygankova V. A.* Concerning the peculiarities of gene expression changes in plant leaf cells during twenty-four-hour period // *Biotechnology*. – 2010. – V. 3, № 4. – P. 86 – 95.

18. *Tsygankova V.A., Musatenko L.I., Ponomarenko S.P., Galkina L.A., Andrushevich Ja. V., Galkin A.P.* Change of functionally active cytoplasmical mRNA populations in plant cells under growth regulators action and biological perspectives of cell-free systems of protein synthesis // *Biotechnology*. – 2010. – V. 3, № 2. – P. 19 – 32.

Abstract

Using molecular-biological methods it is found the first that sugar beet seed spraying by plant growth regulator Radostim-super enhances plant resistance against nematode infection; this biological effect is gained through enhancement of synthesis of small regulatory si/miRNA complementary to an mRNA structure of nematode. As a

result, translation of mRNA nematode is blocked which leads to destruction of parasite larvae. The new method of small regulatory si/miRNAs' isolation is elaborated and their functional (silence) activity in cell-free system of protein synthesis is testified.

Молекулярно-біологічними методами вперше встановлено, що обробка насіння сахарної свеклы регулятором росту рослин Радостимом-супер значительно підвищує стійкість рослин к нематодам путём стимуляції синтезу малих регуляторних siRNA/miRNA, комплементарних по структурі mRNA нематод. В результаті цього происходит блокування трансляції mRNA нематод, що призводить к разрушенію личинок нематод. Розробтан новий метод виділення препаратів малих регуляторних si/miRNA високої чистоти, проведена перевірка їх функціональної (сайленсової) активності в бесклеточній системі белкового синтезу.

Молекулярно-біологічними методами вперше встановлено, що обробка регулятором росту рослин Радостимом-супер насіння цукрового буряку значно підвищує стійкість рослин до нематод шляхом стимуляції синтезу малих регуляторних siRNA/miRNA, комплементарних за структурою до mRNA нематод. В результаті цього відбувається блокування трансляції mRNA нематод, що призводить до руйнування личинок нематод. Розроблено новий метод виділення препаратів малих регуляторних si/miRNA високої чистоти та проведено перевірку їх функціональної (сайленсової) активності в безклітинній системі білкового синтезу.

**WNETRZAK J.^{1,2}, BETTS S. ¹, EVANS A. ¹, HOWARTH C. ¹, HASTEROK R. ²
LANGDON T. ^{1*}**

¹ *Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Edward Llwyd Building, Aberystwyth University, Penglais, Aberystwyth, Ceredigion SY23 3DA, Wales, United Kingdom. e-mail: ttl@aber.ac.uk * Presenting author.*

² *Department of Plant Anatomy and Cytology, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Silesia, Jagiellonska 28, 40–032 Katowice, Poland,*

GENOME EVOLUTION IN AVENA– MOBILE ELEMENTS AS PHYLOGENETIC, CYTOLOGICAL AND AGRONOMIC TOOLS

Oats are often seen as the poor relative of the temperate cereals, domesticated late after millenia as a weed, grown on marginal land and used as human food only as a last resort [1]. This view may be changing as health claims for groats are upheld [2] and as low input cultivation becomes a mainstream goal [3]. Research on the evolution, adaptation and domestication of *Avena* is therefore of general interest and much potential value. New sequencing technologies allow rapid progress in genomics even for resource-poor crops such as oat but bottlenecks in population development and germplasm characterisation remain. Wild *Avena* hexaploid species occur across much of the same Eurasian range as the crop, providing greater natural reservoirs of adapted material than is available for wheat or barley, while secondary and tertiary gene pool species are also more widespread than their Triticeae counterparts. *Avena canariensis*, for example, is unusual in being a cereal wild relative which is also an island endemic. Conventional phylogenies have not easily untangled the relationships in the

genus, suggesting that species barriers may not be clear-cut and complicating decisions about germplasm development. Recently we found that the temperate grass model, *Brachypodium distachyon*, was also likely to have a more complex origin than expected [4], providing us with an opportunity to test the utility of profiling mobile element content as a rapid phylogenetic screen. Initial results were encouraging. Here we present molecular and cytogenetic approaches to exploiting mobile elements as markers for genetic lineages, and compare our results with other methods for screening crop diversity.

SB, AE, CH and TL are supported by the BBSRC (grant BBS/E/W/00003130B). RH acknowledges financial support from Polish Ministry of Science and Higher Education (grant N N303 570738).

References

1. www.gramene.org/species/avena/oat_intro.html
2. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1885.htm>
3. http://ec.europa.eu/research/research-for-europe/agriculture-quality-low-input-food_en.html
4. Wolny E., Lesniewska K., Hasterok R., Langdon T. Compact genomes and complex evolution in the genus *Brachypodium* //Chromosoma – 2010 – vol. 120, № 2. P. 199-212.

БІОТЕХНОЛОГІЇ У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ ТА МЕДИЦИНІ

АБРАІМОВА О.Є.¹, ДЕРКАЧ К.В.¹, СМЕТАНІН В.Т.², САТАРОВА Т.М.^{1,2}

¹Інститут зернового господарства НААН України,

Україна, 49600, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14, e-mail:

satarova2008@yandex.ru

²ДВНЗ “Український державний хіміко-технологічний університет”,

Україна, 49005, м. Дніпропетровськ, пр. Гагаріна, 8

ВПЛИВ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩА НА КАЛУСОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO* У КУКУРУДЗИ

Кукурудза є важливою харчовою, кормовою та технічною культурою. В програмах селекційного поліпшення кукурудзи велике значення набувають роботи з генетичної та клітинної інженерії. Проте кількість генотипів, що достатньо чутливі до введення в культуру *in vitro*, все ще лишається обмеженою, тому дослідження з оптимізації та підбору умов для успішної індукції калусогенезу, субкультивування та регенерації рослин в культурі тканин кукурудзи лишаються актуальними. Суттєвим чинником впливу на індукцію калусогенезу та підтримання тканин є амінокислотний склад живильного середовища. Вільні амінокислоти використовуються у метаболічних процесах клітин як джерело органічного азоту та аміногруп, виконують протекторну функцію проти стресу, викликаного введенням рослинного матеріалу в культуру *in vitro* [1]. Особливості впливу екзогенних вільних амінокислот на ріст та розвиток рослин в культурі *in vitro* повинні обов'язково враховуватися в роботах з генетичної інженерії та клітинної селекції на стійкість до гербіцидів, оскільки дія певних гербіцидів пов'язана саме з блокуванням або модифікацією метаболічних шляхів біосинтезу та розпаду деяких амінокислот.

Отримані нами попередні дані свідчили про неоднозначність реакції експлантів кукурудзи на амінокислотну складову живильних середовищ. Ефективна оптимізація живильних середовищ для кожного виду рослин повинна ґрунтуватися на особливостях його метаболізму. В більшості робіт з культивування калусної тканини кукурудзи як джерело органічного азоту використовується гідролізат казеїну, який є сумішшю амінокислот невизначеного складу. Г.Р.Піраловим, який багато років займався оптимізацією процесів калусогенезу та регенерації у кукурудзи, було запропоновано використання замість гідролізату казеїну синтетичної суміші амінокислот, складеної відповідно до якісного та кількісного співвідношення амінокислот в зеїні, який є запасним білком зер-

на кукурудзи за [2]. Метою даного дослідження було визначення ефективності використання оригінальної суміші амінокислот для оптимізації процесів калусогенезу та регенерації у кукурудзи.

Матеріал та методи

Матеріалом для дослідження були інбредні лінії кукурудзи селекції Інституту зернового господарства НААН України та лінії закордонної селекції, що відносяться до різних зародкових плазм та мають різний ступінь чутливості до культивування *in vitro*. Для індукції калусогенезу використовували незрілі зародки довжиною 1 мм. Базовий склад індуктивного середовища вміщував мінеральні компоненти та вітаміни середовища N₆ з додаванням 10 мг/л AgNO₃, 100 мг/л мезоінозиту, 20 г/л сахарози та 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксіацетової кислоти (2,4-Д). У контрольному варіанті (К) до цих компонентів середовища додавали 690 мг/л проліну та 100 мг/л гідролізату казеїну (сумарний вміст амінокислот склав 790 мг/л при вмісті L-проліну 690 мг/л). У першому експериментальному варіанті (AK₁) додавали синтетичну суміш амінокислот, яка складалась з: L-глутамінової кислоти, L-лейцину, L-ізолейцину, L-аланіну, L-проліну, L-фенілаланіну, L-тирозину, L-метіоніну, L-валіну, L-аспарагінової кислоти, L-аргініну, L-серину, L-цистину, L-гістидину, L-оксипроліну і L-триптофану у співвідношеннях, які відповідають їх співвідношенню у зеїні. Сумарний вміст амінокислот в середовищі AK₁ склав 820 мг/л при вмісті L-проліну 71,1 мг/л. У другому експериментальному середовищі (AK₂) використано ту ж суміш амінокислот, але вміст L-проліну збільшено до вмісту у контрольному варіанті (690 мг/л) (сумарний вміст амінокислот склав 1438,9 мг/л при вмісті L-проліну 690 мг/л). Для переходу до регенерації рослин отриману калусну тканину переносили на регенераційні середовища того ж базового складу, що і індуктивні, але зі зниженим до 0,1 мг/л вмістом 2,4-Д. За вмістом амінокислот та гідролізату казеїну контрольне регенераційне середовище Кр відповідало середовищу К, а експериментальне регенераційне середовище AK_{2р} відповідало середовищу AK₂.

Результати та обговорення

У наших попередніх дослідженнях не було виявлено суттєвого впливу підвищеної вмісту L-проліну у індуктивному живильному середовищі з 690 мг/л до 2300 мг/л на формування морфогенних калусів кукурудзи у вивчених інбредних ліній. Тому для наступного експерименту масова частка L-проліну була знижена до відповідної його частки в складі зеїну (71,1 мг/л). Тринадцять з шістнадцяти вивчених ліній не реагували на введення у середовище індукції нової суміші амінокислот, причому серед них були лінії з високим морфогенним потенціалом (CO225, ВИР40, 32-11, W38), лінії з середньою (ИК226, PLS61, Chi31) й низькою (ДК633, ДК267, W64a) здатністю до морфогенного калусогенезу та взагалі нечутливі (ДК427, ДК312, ДК366). У ліній CO125, ДК443, ДК675 морфогенний калусогенез на середовищі AK₁ суттєво інгібувався. Можна припустити, що зниження вмісту

L-проліну у варіанті АК₁ до 71,1 мг/л виявилось критичним для введених в культуру *in vitro* незрілих зародків кукурудзи.

В таблиці 1 представлено результати індукції калусогенезу на середовищі без гідролізату казеїну із синтетичною сумішшю амінокислот, де вміст L-проліну дорівнював контрольному (690 мг/л).

Таблиця 1

Вплив суміші амінокислот та L-проліну (690 мг/л) на частоту індукції морфогенних калусів у ліній кукурудзи

Лінія	Середовище індукції	Кількість культивованих зародків, шт.	Частота утворення морфогенних калусів, %	Частота утворення калусів типу I, %	Частота утворення калусів типу II, %
СК30	К	193	42,0±7,1	42,0±7,1	0,0
	АК ₂	119	64,7±8,8	64,7±8,8	0,0
ДК2/66	К	196	12,2±4,7	12,2±4,7	0,0
	АК ₂	116	14,7±6,6	12,1±6,1	2,6±3,0
ДК92/61	К	148	16,2±6,1	16,2±6,1	0,0
	АК ₂	120	20,0±7,3	20,0±7,3	0,0
W64a	К	169	42,6±7,6	42,6±7,6	0,0
	АК ₂	119	51,3±9,2	47,9±9,2	3,4±3,3
ДК675	К	130	23,8±7,5	0,0	23,8±7,5
	АК ₂	130	40,0±8,6	0,0	40,0±8,6
W38	К	107	59,8±9,5	59,8±9,5	0,0
	АК ₂	108	76,9±8,2	76,9±8,2	0,0
Всього	К	943	31,4±3,0	28,1±2,9	3,3±1,2
	АК ₂	712	44,1±3,7	35,8±3,6	8,3±2,1

На фоні достатньо високої концентрації L-проліну суміш амінокислот сприяла підвищенню загальної частоти морфогенного калусоутворення та частоти формування крихких калусів типу II у вивчених ліній. Поєднання високого вмісту L-проліну та суміші амінокислот позитивно вплинуло на формування крихких калусів у ліній, які не утворювали калуси типу II на контрольному середовищі (ДК2/66, W64a). Помітно поліпшилася текстура та загальний стан калусів, що субкультивувалися. Калуси набували більш крихкої структури, на їх поверхні частіше виникали щиткоподібні тіла. Це створювало сприятливі умови для більш тривалого вирощування калусної тканини в культурі *in vitro*, що наразі є важливим фактором для отримання рослин-регенерантів з мінімальним використанням умов штучного клімату. При субкультивуванні з 30-ї по 60-у добу приріст питомої сирової маси отриманих калусів на середовищі АК₂ у ліній ДК92/61 та W64a достовірно збільшувався, а у решти вивчених ліній мав тенденцію до збільшення.

Після 4-місячного субкультивування отримані калуси трансплантували на регенераційні середовища Кр та АК₂p, результати досліджували через 30 діб (табл.2).

Таблиця 2

Вплив суміші амінокислот на регенерацію рослин у ліній кукурудзи

Лінія	Середовище індукції та субкультивування	Середовище регенерації	Вивчено калусів, шт.	Отримано пагонів на 1 г сиріої маси калусу, шт.	Отримано рослин на 1 г сиріої маси калусу, шт.
СК30	К	Кр	30	10,3±1,7	3,5±1,2
	К	АК ₂ p	30	9,4±2,2	3,0±1,2
	АК ₂	Кр	30	11,4±1,7	2,3±0,9
	АК ₂	АК ₂ p	30	22,4±6,2	7,9±4,7
W64a	К	Кр	10	8,7±3,2	3,6±1,7
	К	АК ₂ p	10	8,1±3,5	3,9±2,1
	АК ₂	Кр	10	16,7±6,6	4,3±2,5
	АК ₂	АК ₂ p	10	27,8±6,9	13,7±5,1
Chi31	К	Кр	15	16,4±5,1	6,5±3,3
	К	АК ₂ p	15	5,7±2,2	0,6±1,0
	АК ₂	Кр	10	36,4±7,5	17,3±6,0
	АК ₂	АК ₂ p	10	27,5±9,8	9,8±4,2
ДК675	К	Кр	23	16,2±3,3	1,2±0,7
	К	АК ₂ p	20	20,1±5,3	1,5±1,1
	АК ₂	Кр	10	16,6±4,0	0,5±0,5
	АК ₂	АК ₂ p	10	18,2±3,4	5,2±1,8
W38	К	Кр	15	2,5±1,9	0,3±0,5
	К	АК ₂ p	15	6,9±2,4	1,1±0,7
	АК ₂	Кр	18	3,9±2,0	0,5±0,6
	АК ₂	АК ₂ p	18	5,6±2,0	0,7±1,0
PLS61	К	Кр	25	29,3±9,9	18,2±4,7
	К	АК ₂ p	23	28,4±12,1	17,6±5,7
	АК ₂	Кр	23	24,8±11,8	14,4±3,4
	АК ₂	АК ₂ p	23	44,5±13,5	27,0±4,7
CM105	К	Кр	12	4,0±2,0	0,4±0,5
	К	АК ₂ p	12	5,8±1,7	0,8±1,1
	АК ₂	Кр	12	9,5±2,8	0,8±0,7
	АК ₂	АК ₂ p	12	11,0±4,0	2,7±2,2
ДК92/61	К	Кр	30	8,6±3,1	1,8±1,2
	К	АК ₂ p	-	-	-
	АК ₂	Кр	-	-	-
	АК ₂	АК ₂ p	33	14,5±4,3	2,9±1,7

Процес регенерації з калусів, які утворилися на індуктивному середовищі, збагаченому амінокислотами, або залишався на рівні контролю, або суттєво поліпшувався (Chi31). Для калусів, отриманих на середовищі без амінокислот, регенерація на фоні амінокислот або лишалася на рівні контролю, або суттєво зменшувалась (Chi31). Для калусів, індуктованих на середовищі з амінокислотами, суміш амінокислот в середовищі регенерації для більшості досліджених генотипів її суттєво поліпшувала. За нашими спостереженнями формування рослинки на середовищі, що містило суміш амінокислот, проходило з меншою кількістю аномалій.

Висновки

Заміна гідролізату казеїну на запропоновану оригінальну суміш амінокислот в поєднанні з L-проліном (690 мг/л) сприяє підвищенню здатності ліній кукурудзи до формування та підтримання морфогенних калусів в культурі незрілих зародків та позитивно впливає на формування крихких калусів типу II. Протестована суміш амінокислот також поліпшує регенераційний потенціал калусних культур та збільшує кількість отриманих рослинко-регенерантів. Одержані результати дозволяють рекомендувати використання суміші амінокислот для індукції, субкультивування морфогенної тканини та регенерації рослин кукурудзи *in vitro*. По матеріалам даного дослідження отримано патент на корисну модель [3].

Література

1. *Armstrong C.L., Green C.E.* Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and involvement of L-proline// *Planta*. – 1985. – Vol. 164. – P.207-215.
2. *Кретович В.Л.* Биохимия растений. – М.: Высш.школа. – 1986. – 503 с.
3. *Пат. на корисну модель України № 56325.* Спосіб індукції калусогенезу в культурі незрілих зародків кукурудзи. Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 10.01.2011. Опубл.10.01.2011. Бюл. № 1, 2011 р.

Резюме

Изучено влияние оригинальной смеси аминокислот на процессы каллусогенеза и регенерации в культуре незрелых зародышей кукурузы. Показано преимущество использования синтетической смеси аминокислот в составе питательных сред в сравнении с гидролизатом казеина для культивирования морфогенной каллусной ткани кукурузы *in vitro* и ее последующей регенерации.

Вивчено вплив оригінальної суміші амінокислот на процеси калусогенезу і регенерації в культурі незрілих зародків кукурудзи. Показано переваги використання синтетичної суміші амінокислот у складі живильних середовищ у порівнянні з гідролізатом казеїну для культивування морфогенної калусної тканини кукурудзи *in vitro* і її наступної регенерації.

The effect of original mixture of amino acids on the processes of callusogenesis and regeneration in immature embryo culture of maize is studied. The advantages of the use of synthetic mixture of amino acids in nutrient media in comparison with caseine hydrolysate for culture of morphogenic callus tissue of maize *in vitro* and its further regeneration are shown.

**АХТЕМОВА Г.А., ШТАРК О.Ю., ПЕРШИНА Е.В., БОРИСОВ А.Ю.,
ТИХОНОВИЧ И.А.**

*ГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
Россия, 196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, д.3, e-mail: ahgulya@yandex.ru*

ПОИСК ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ РЕГИОНАЛЬНОГО ПРОИЗВОДСТВА МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

В последние годы XX века процесс интенсификации сельскохозяйственного производства сводился к интенсивному использованию минеральных удобрений (азотных, фосфорных и др.) и ксенобиотиков (химических средств защиты от патогенов и вредителей). В результате это привело к истощению естественного плодородия почвы, снижению ее биологической активности, ухудшению качества воды, воздуха и снижению потребительского уровня сельскохозяйственной продукции [1; 2; 3].

В настоящее время в мировой сельскохозяйственной практике заметна тенденция снижения доз применяемых минеральных удобрений и средств защиты растений и замена их натуральными компонентами, т.е. переход к адаптивному сельскохозяйственному производству [1; 3; 4]. Интенсивно изучается возможность использования в сельском хозяйстве потенциала взаимовыгодных растительно-микробных взаимодействий [1; 3-8].

Наиболее важными для сельского хозяйства являются эндосимбиотические растительно-микробные системы: бобово-ризобиальный симбиоз (БРС) и арбускулярная микориза (АМ), а также эпифитные и/или эндофитные ассоциации с бактериями, стимулирующими рост растений (PGPB, от англ. «Plant Growth Promoting Bacteria») [1; 4]. Благодаря этим симбиозам улучшается минеральное питание (преимущественно, азотное и фосфорное) и водоснабжение растений, повышается их устойчивость к патогенам и стрессам; некоторые микроорганизмы выделяют биологически активные вещества, непосредственно стимулирующие рост растений [4; 9]. Промонстрировано, что, взаимодействуя в ризосфере друг с другом и с растением, грибы АМ, клубеньковые бактерии и PGPB могут оказывать синергетический эффект на растения [9-11]. Существует мнение, что АМ, БРС и другие растительно-микробные симбиозы составляют единый «эволюционный растительно-микробный континуум» [1; 7].

Таким образом, наиболее вероятно, что все природные системы – это в основном многокомпонентные системы [4]. Поэтому возможность практического использования взаимовыгодных многокомпонентных растительно-микробных систем может привести к решению проблем адаптивного сельского хозяйства. Вопрос создания комплексных микробных удобрений (КМУ) поставлен достаточно давно, но и на сегодняшний день решение этого вопроса остается далеким от завершения [6; 12].

В ГНУ ВНИИСХМ совместно с инновационной компанией ООО «Бисолби-Интер» разработано КМУ «БисолбиМикс», содержащее высокоэффективные штаммы клубеньковых бактерий, PGPB и изоляты грибов АМ из коллекций ГНУ ВНИИСХМ и ООО «Бисолби-Интер» [12-14]. В качестве субстрата-носителя микроорганизмов в КМУ используется нестерильный фильтрационно-мочный осадок (ФМО) – отход производства сахара из сахарной свеклы, представляющий собой смесь фильтрационного осадка, или дефеката, и почвы. Дефекат и ФМО складировались в виде отвалов на прилегающих к заводу территориях, что выводит из оборота сельскохозяйственные угодья [14, 15]. В субстрате-носителе также могут присутствовать аборигенные микроорганизмы указанных групп [4; 14].

Полевые испытания, проведенные в различных регионах, в целом, продемонстрировали достаточно высокую эффективность КМУ «Бисолби-Микс» на бобовых, зерновых и овощных культурах [4; 12; 15]. Однако успех применения микробиологических препаратов сильно зависит от условий окружающей среды.

Результаты экспериментов с многокомпонентными микробными системами, включающими грибы АМ, ризобии и PGPB, демонстрируют важную роль физиологической и генетической адаптации микроорганизмов к локальным условиям окружающей среды [9; 16]. Таким образом, создание региональных производств КМУ на основе местных микробных изолятов позволит повысить эффективность применения этого удобрения, а также экологичность растениеводства и производства сахара.

Данная работа была направлена на изучение аборигенной микрофлоры, выделенной из различных образцов отвалов ФМО.

Материалы и методы

Производили исследование бактериального сообщества ФМО завода по переработке сахарной свеклы пос. Сотницыно, Сасовский район Рязанской области. В ФМО завода пос. Залегощь Орловской области определяли наличие аборигенных клубеньковых бактерий и грибов АМ, способных формировать эффективные клубеньки и АМ. Для анализа клубенькообразования использовали горох посевной (*Pisum sativum* L.), а для анализа АМ – гибрид сорго и суданской травы (*Sorghum* sp.). Исследовали образцы ФМО 1-го и 2-х летнего возраста и отвалы 20 и 30 лет.

Микробиологические исследования проводили традиционными методами [17; 18].

Доминирующие морфотипы микроорганизмов идентифицировали с использованием молекулярно-генетических методов. Для определения таксономической принадлежности исследуемых штаммов проводили амплификацию гена 16S рНК методом ПЦР с праймерами fD1/rD1 [19]. В качестве матрицы использовали ДНК, выделенную из чистых бактериальных культур. Амплифицированные фрагменты клонировали в плазмидный вектор рTZ57R с использованием электрокомпетентных клеток *E. coli*,

штамм DH10 β [20]. Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществлялось с использованием автоматического капиллярного секвенатора CEQ8000 и реагентов фирмы Beckman Coulter (США). Таксономическое положение исследуемых штаммов определяли на основании сравнения полученных последовательностей с базой данных GeneBank, с использованием программы BLAST [21].

Фитостимулирующие свойства, фитотоксическую активность, способность бактерий, синтезировать витамины оценивали традиционными методами [22-24].

Анализ развития арбускулярной микоризы производили с использованием светового микроскопа по методикам [25, 26].

Результаты и обсуждение

На корнях растений гороха, выращенных в ФМО пос. Залегощь 1-2-х лет складирования, обнаруживали клубеньки (8-10 клубеньков на растение), но микоризации корней не наблюдалось. У растений, выращенных на 20-30-летних отвалах, клубенькообразование возрастало до 20 клубеньков на растение, степень микоризации достигала 50-80% в целом на корневую систему. Ранее было показано, что в ФМО пос. Сотничино также присутствуют аборигенные клубеньковые бактерии и грибы АМ [4, 14].

В ФМО Сотницинского сахарного завода 1-2-х лет складирования общее количество гетеротрофных бактерий достигало в среднем 4×10^7 КОЕ в 1г субстрата, а в 20-ти и 30-ти летних отвалах – снижалось на порядок и в среднем составило 3×10^6 КОЕ/1г.

Из образцов полей фильтрации и отвалов разного возраста было выделено 67 морфотипов культивируемых бактерий, которые после микроскопирования и физиолого-биохимического тестирования распределились по 24 морфотипам, 5 из которых определились как доминирующие.

В первые годы в отвалах доминируют 2 вида грамположительных бактерий в большей степени *Microbacterium sp.* и в меньшей *Bacillus megaterium*. Грамотрицательные бактерии присутствуют, но они занимают минорную нишу. С увеличением возраста в отвалах происходит заметная смена состава доминирующих видов. На первые позиции выходят грамположительные бактерии *Arthrobacter pascens* и *B. megaterium*. *Arthrobacter sulfonivorans* занимает вторые по значимости позиции бактериального сообщества. В возрастных отвалах появляется целый ряд грамотрицательных бактерий, из которых представители родов *Pseudomonas* и *Alcaligenes* занимают субдоминирующие позиции в структуре сообщества, заменяя грамположительные бактерии.

Тест на фитостимулирующие свойства бактерий показал, что обработка семян кресс-салата (*Lepidium sativum L.*) штаммами доминирующих бактерий приводила к повышению скорости роста, массы проростка и длины корней по сравнению с контролем, необработанным суспензией бактерий. Наибольший эффект оказывал штамм *B. megaterium* (02Б).

Тест с водорослями *Chlorella vulgaris* показал, что исследуемые штаммы не обладают фитотоксическими свойствами.

В качественном тесте на способность бактерий синтезировать витамины положительные результаты были получены для штаммов *B. megaterium* (02Б) и *A. sulfonivorans*.

Заключение

Таким образом, из приведенных исследований следует, что в ФМО присутствуют аборигенные микроорганизмы: клубеньковые бактерии, грибы АМ и РГРВ, стимулирующие рост и развитие растений.

Штамм *B. megaterium* (02Б) может быть рекомендован для создания многокомпонентных микробных препаратов для адаптивного сельскохозяйственного производства.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (Государственные контракты № 16.512.11.2155, 02.740.11.0276, П1304), грантов: президента РФ (НШ-3440.2010.4), РФФИ (09-04-13895, 09-04-91054, 09-04-91293, 10-04-00961, 10-04-01146), NWO-047.117.2005.006 (Нидерланды).

Литература

1. Тихонович И.А., Проворов Н.А. 2009. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. СПб.: Изд-во С.-Пб. ун-та, 210с.
2. Tilman D., Fargione J., Wolff B. et al. 2001. // Science 292: 281–284.
3. Vance C.P. 2001. // Plant Physiology 127: 390-397.
4. Shtark O.Y. et al., 2010 // Soil microbiology and sustainable crop production, G.R. Dixon, E.L. Tilston. (eds) Dordrecht: Springer. P. 119–196.
5. Борисов А.Ю., Наумкина Т.С., Штарк О.Ю. и др. 2004 // Докл. РАСХН. № 2. С. 12–14.
6. Кожемяков А.П., Чеботарь В.К. 2005 // Биопрепараты в сельском хозяйстве (Методология и практика применения микроорганизмов в растениеводстве и кормопроизводстве) / Под ред. И.А. Тихоновича и Ю.В. Круглова. М.: с. 18-54.
7. Тихонович И.А., Борисов А.Ю., Цыганов В.Е. и др. 2005 // Успехи современной биологии 125(3):227-238.
8. Штарк О.Ю., Данилова Т.Н., Наумкина Т.С. и др. 2006 // Экол. генет. 4(2):22–28.
9. Barea J.M. et al. 2005 // J. Exp. Botany. 56(14):1761–1788.
10. Requena N., Jimenez J., Toro M., Barea J.M. 1997. // New Phytol. Vol. 136. P. 667–677.
11. Artursson V. et al. 2006 // Environ. Microbiol. 8:1–10.
12. Завалин А.А., Кожемяков А.П. (ред.) 2010. Новые технологии производства и применения биопрепаратов комплексного действия. СПб: Химиздат. 64 с.
13. Чеботарь В.К., Казаков А.Е., Ерофеев С.В. и др. «Способ получения комплексного микробиологического удобрения». Патент № 2318784, зарегистрирован 10.03.2008.
14. Ахтемова Г.А., Штарк О.Ю., Першина Е.В. и др. 2010 // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр – К.: Логос, 2003-2010. Т. 9.: С. 210-214.

15. Ахтемова Г. А., Перишина Е. В., Пинаев А. Г. и др. // Сахар. 2010. № 10. С. 30-36.
16. Requena N., Perez-Solis E., Azcón-Aguilar C. et al. 2001 // Appl. Environ. Microbiol. Vol. 67. P. 495–498.
17. Добровольская Т. Ю., Скворцова И.Н., Лысак Л.В. 1989. Методы выделения и идентификации почвенных бактерий. М.: Изд-во МГУ, 71 с.
18. Тенгер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. 2004. Практикум по микробиологии. М.: Дрофа. 256 с.
19. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. [et al.] // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173, N 2. P. 697–703.
20. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Laboratory manual // NY.: Cold spring harbor laboratory press.
21. Altschul S. F., Gish W., Miller W. et al. 1990 // J. mol. biol. N 215. P. 403–410.
22. Громов Б.В., Тумова Н.Н. 1999. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института ЛГУ-Л., с. 3 – 27.
23. Берестецкий О.А. 1978. // Фитотоксические свойства микроорганизмов. Л. с. 7-30.
24. Возняковская Ю.М. 1969. Микрофлора растений и урожай. Л.: Изд-во «Колос».
25. Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) // Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S (eds) Physiological and genetical aspects of mycorrhizae, INRA, Paris, pp 217–221.
26. Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y (1998) // Appl Environ Microbiol 64:5004–5007.

Резюме

Из отвалов фильтрационно-моечного осадка сахарных заводов выделены аборигенные микроорганизмы, обладающие рост-стимулирующими свойствами, которые могут быть использованы для создания региональных многокомпонентных микробных удобрений.

Some indigenous microorganisms having plant-growth-stimulating properties, which can be used to create regional multi-microbial fertilizers, has been isolated from dumps of filtration and washing sediment of sugar mills.

БІЛІНСЬКА О. В.

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва Національної академії аграрних наук України, 61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ІННОВАЦІЙНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ *IN VITRO*

Технології на основі культури *in vitro* рослинних клітин, тканин та органів, застосовуються для створення вихідного селекційного матеріалу, розмноження та оздоровлення цінних генотипів вже понад 40 років, постійно збагачуючись новими методичними підходами, у яких акумулюються досягнення сучасної біологічної науки [1, 2, 3, 4].

Як правило, першим етапом розробки будь-якої біотехнологічної схеми є дослідження чинників, що впливають на якісні та кількісні характеристики морфогенезу, а за наявності у літературних джерелах відпрацьованих протоколів – їх випробування на модельних генотипах. Далі проводиться оптимізація ключових елементів технології, оцінка можливості її використання на генетично різноманітному рослинному матеріалі. Завершується цикл робіт визначенням економічної ефективності нової технології у порівнянні базовою, а також з традиційними методами селекції.

Узагальнення результатів досліджень, проведених нами впродовж 2003–2010 рр., дозволило розробити технологію отримання гаплоїдів ячменю у культурі пиляків *in vitro*, інноваційними елементами якої є обробка колосся у 0,3 М розчині манітолу [5, 6] та культивування пиляків на середовищах, що містять замість агар-агару природні кукурудзяні крохмалі типу *ae i su₂* [7] та хімічно модифіковані крохмалі [8].

З огляду на викладене вище логічним кроком є оцінка ефективності розробки для створення ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю на основі гібридного матеріалу і визначення перспектив її застосування у селекційному процесі.

Матеріали та методи

Як матеріал для досліджень було використано п'ять гібридних популяцій F₃ ярого ячменю з селекційної програми лабораторії селекції і генетики ячменю IP ім. В. Я. Юр'єва, надані М. Р. Козаченком, а також модельний генотип – лінію андрогенезу походження ДГ00-126, яка має високу здатність до андрогенезу *in vitro*.

Вирощування рослин-донорів пиляків, добір колосся, попередню обробку і отримання асептичної культури здійснювали за власними методичними розробками [9, 10]. Базове індукційне середовище, яке слугувало контролем, і середовище для отримання рослин-регенерантів [9] містили 0,76 % агар-агару “Difco” (США). До удосконаленого середовища як гелетворювач було додано крохмаль (6,5 %), виділений з зерна лінії АС-11, яка є носієм мутантного гена структури ендосперму *su₂*. Препарат крохмалу було надано С. М. Тимчуком і О. Ю. Дерезізовою. Ефективність експериментального андрогенезу *in vitro* оцінювали за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загального числа культивованих пиляків.

Результати і обговорення

Дослідження показали (табл.), що використання середовища з крохмалем *su₂*, сприяло істотному зростанню кількості морфогенних пиляків у трьох гібридних комбінаціях при тенденції до збільшення цього показника в усіх гібридів. У середньому за рахунок заміни агар-агару на крохмаль кількість морфогенних пиляків зростає з (19,59 ± 0,93) % до (27,00 ± 0,92) %.

У всіх залучених до експерименту гібридних популяціях на середовищі з крохмалем було отримано істотно вищий вихід зелених рослин-

Таблиця

Результати отримання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* на живильних середовищах з агар-агаром і кукурудзяним крохмалем з високим вмістом амілози (мутація *su₂*) (2010 р.)

Лінія, гібридна комбінація	Живильне середовище	Висаджено пиляків, шт.	О д е р ж а н о			
			морфогенних пиляків		зелених рослин регенерантів	
			шт.	%	шт.	%
ДГ 00-126	NMSмод.2 ^[1]	409	148	36,18 ± 2,38	29	7,09 ± 1,26
	(контроль) NMSsu ₂ ^[2]	340	153	45,00 ± 2,46**	102	30,00 ± 2,48***
F ₃ Пафос × Галактик	NMSмод.2	386	65	16,83 ± 1,90	21	5,44 ± 1,15
	(контроль) NMSsu ₂	501	127	25,35 ± 1,94**	54	10,78 ± 1,39*
F ₃ Безостий із Стрункого × Вакула	NMSмод.2	459	100	21,79 ± 1,93	28	6,10 ± 1,12
	(контроль) NMSsu ₂	550	169	30,73 ± 1,97***	113	20,54 ± 1,72***
F ₃ Гранал × Фенікс	NMSмод.2	305	56	18,36 ± 2,22	18	5,90 ± 1,35
	(контроль) NMSsu ₂	285	70	24,56 ± 2,55	39	17,19 ± 2,23**
F ₃ Бадьорий × Annabel	NMSмод.2	346	58	16,76 ± 2,01	17	4,91 ± 1,16
	(контроль) NMSsu ₂	346	69	19,94 ± 2,15	31	8,96 ± 1,54*
F ₃ Едем × Джерело	NMSмод.2	327	78	23,85 ± 2,36	24	7,34 ± 1,44
	(контроль) NMSsu ₂	314	104	33,12 ± 2,66**	59	18,78 ± 2,20***
Всього ^[3]	NMSмод.2	1823	357	–	108	–
	(контроль) NMSsu ₂	2336	692	–	296	–
Середнє ^[4]	NMSмод.2	–	–	19,59 ± 0,93	–	5,92 ± 0,55
	(контроль) NMSsu ₂	–	–	27,00 ± 0,92***	–	14,82 ± 0,74***

П р и м і т к и. 1. Середовище містило агар-агар “Difco” (США). 2. Середовище містило крохмаль *su₂*. 3. Загальну кількість пиляків, морфогенних пиляків і рослин визначено для гібридів. 4. Середнє значення визначено для гібридів. *Різниця істотна при P≤0,05. **різниця істотна при P≤0,01. ***різниця істотна при P≤0,001.

регенерантів. Найвищу кількість рослин – (20,5 ± 1,72) % – було регенеровано у гібридній популяції F₃

Безостий із Стрункого × Вакула, що підтверджує донорські властивості сорту Вакула щодо здатності до андрогенезу *in vitro* [11]. На середовищі, яке містило в якості гелеутворювача крохмаль, з (5,92 ± 0,55) % до (14,82 ± 0,74) %, тобто у 2,5 рази, підвищилася середня частота регенерації зелених рослин.

З метою оцінки впливу на вихід гаплоїдів умов вирощування донорських рослин у 2010 р. визначено здатність до утворення андрогенних структур у лінії ДГ00-126, для якої були у наявності дані за минулі роки.

Аналіз результатів досліджень, проведених у 2006–2009 рр., показав, що кількість морфогенних пиляків варіювала у цього генотипу у контролі (середовище з агар-агаром) від 42,48 % (2006 р.) до 46,03 % (2007 р.), а вихід зелених рослин – від 24,57 % (2008 р.) до 63,68 % (2007 р.). Як видно з таблиці, обидва показники гаплопродукції помітно знизилися, що відповідає вкрай несприятливим умовам вирощування донорських рослин у 2010 р.

Експерименти з дослідження впливу заміни агар-агару на кукурудзяні крохмалі було проведено у 2008 і 2009 рр. У сприятливому для росту ярого ячменю 2008 р. кількість морфогенних пиляків у ДГ00-126 на середовищі, яке містило крохмаль su_2 , сягала 64,00 %, а частота регенерації зелених рослин – 53,40 %, тобто у 2010 р. майже удвічі порівняно з кращим результатом зменшився вихід нормально пігментованих рослин-регенерантів.

Отже, аналіз мінливості гаплопродукційних показників лінії ДГ00-126 за роками свідчить про далеко не повну реалізацію цим модельним генотипом морфогенетичного потенціалу у 2010 р. Це дає підставу для припущення відносно можливості значного збільшення індукції гаплоїдів на основі генетично різноманітного гібридного матеріалу при застосуванні середовища з кукурудзяним крохмалем su_2 за більш сприятливих для ярого ячменю умов вирощування донорських рослин.

Загалом у контролі за культивування 1823 пиляків, вилучених з 47 суцвіть, було отримано 108 нормально пігментованих рослин-регенерантів. У дослідному варіанті на середовище було висаджено 2336 пиляків з 55 суцвіть і отримано 296 зелених рослин. Виходячи з того, що один працівник середньої кваліфікації спроможний впродовж одного робочого дня висадити на середовище пиляки з 20–25 суцвіть, можна розрахувати трудові, матеріальні і енергетичні витрати на виконання робіт з отримання асептичної культури пиляків *in vitro* і проведення подальших маніпуляцій, пов'язаних з пересадкою андрогенних структур (калюсу, ембріоїдів) і регенерацією рослин тощо, а також визначити можливі обсяги кінцевого продукту і вартість однієї лінії подвоєних гаплоїдів.

Зокрема, аналіз первинної документації показав, що на виконання початкового етапу робіт – вилучення пиляків і їх інокуляцію на живильне середовище – було витрачено 5 робочих днів і використано лише 22 % зрізаних суцвіть. За умови культивування усіх вилучених 4159 пиляків на середовищі з крохмалем (без контролю) загальна кількість регенерантів могла б скласти 566 шт. Збільшення тривалості періоду висадки пиляків до 10 робочих днів, дозволило б отримати одним працівником не менше 1000 рослин-регенерантів навіть при невисокій середній ефективності запропонованої

технології і неконтрольованих, до того ж далеких від оптимальних, умовах вирощування рослин-донорів пиляків.

Слід зазначити, що важливим резервом покращення технологічних параметрів розробки, окрім вирощування рослин-донорів пиляків в умовах штучного клімату, є поєднання попередньої обробки колосся у 0,3 М розчині манітолу з подальшим культивуванням пиляків на середовищі з крохмалем.

У раніше проведеному експерименті було встановлено, що попередня обробка колосся у 0,3 М розчині манітолу при температурі + 4 °С впродовж 10 діб може бути використана як ефективний методичний прийом для забезпечення тривалого зберігання суцвіть і стимулювання андрогенезу *in vitro* у культурі пиляків ярого ячменю. Зокрема, цей спосіб попередньої обробки сприяв істотному – з (8,0±0,4) % до (15,2±0,7) % – зростанню частоти регенерації зелених рослин за культивування пиляків трьох модельних генотипів з контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro* і двох гібридних популяцій F₂ на агаровому середовищі [6].

Результати оцінки ефекту поєднаної дії попередньої обробки колосся у 0,3 М розчині манітолу і середовища, яке містило кукурудзяний крохмаль su₂, вказують на можливість і доцільність поєднання цих методичних прийомів у одному технологічному процесі. Так, у варіанті досліджу манітол+крохмаль su₂, кількість морфогенних пиляків у лінії ДГ00-126 становила 59,9 %, а у варіанті манітол+агар-агар – 45,5 %. Для частоти регенерації зелених рослин у відповідних дослідних варіантах отримано значення 39,3 % і 27,0 %.

Зважаючи на те, що агар-агар високого ступеню очищення, наприклад, використаний нами “Difco” більш ніж у 100 разів дорожчий за крохмаль, очевидними є і економічні переваги використання крохмалевмісних середовищ.

Висновки

Проведено випробування розробленої технології отримання гаплоїдів ярого ячменю на гібридному селекційному матеріалі. Визначено реальні і потенційні можливості розробки у технологічному і економічному аспектах. Результати досліджень з оцінки впливу на ефективність гаплоїдної індукції у культурі пиляків *in vitro* ярого ячменю заміни агар-агару на природний кукурудзяний крохмаль su₂ дозволяють рекомендувати тестування цього гелеутворювача як компонента живильних середовищ для культивування інших рослинних і, можливо, мікробіологічних об'єктів.

Література

1. Kasha K.J., Kao K.N High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Nature. – 1970. – v. 225. – P. 874-875.
2. Ho K.M., Jones G.E. Mingo Barley // Canad. J. Plant Sci. 1980. – v. 60. – P. 279-280.

3. Thomas W. T. B., Forster B. P., Gertsson B. Doubled haploids in breeding // Doubled haploid production in crop plants.– Dordrecht: Kluwer academic publishers, 2003. – P. 337-349.

4. Abdollahi M., Moien A., Monsavi A. Salmanian A. High frequency production of rapeseed transgenic plants via combination of microprojectile bombardment and secondary embryogenesis of microspore derived embryos. – 2011. – v. 38, N 2. – P. 711-719.

5. Белинская Е.В. Влияние предобработки колосьев на эффективность индукции гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2005. – т. 37, № 5. – С. 436-442.

6. Білінська О.В. Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах низької позитивної температури // Фактори експериментальної еволюції організмів. – т. 3. – К.: Логос, 2006. – С. 437-441.

7. Білінська О. В. Застосування кукурудзяних крохмалів з підвищеним вмістом амілози (мутації *ae* і *su*₂) у складі штучного живильного середовища для одержання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2010. – Вип. 11 (№ 905). – С. 60-65.

8. Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007. – т. 39, № 2. – С. 136-143.

9. Білінська О.В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методом культури пиляків *in vitro*: Автореферат дис. ... канд. біол. наук. – Харків: 1997. – 19 с.

10. Білінська О.В., Весна С.В., Манзюк В.Т. Застосування культури пиляків *in vitro* для створення вихідного матеріалу в селекції голозерного ячменю // Селекція і насінництво. – 2002. – Вип. 86. – С. 164-172.

11. Белинская Е.В. Создание признаковой коллекции ячменя по способности к андрогенезу *in vitro* и ее использование в генетических и биотехнологических исследованиях // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2007. – т. 5, № 1,2. – С. 11-20.

Резюме

Проведено оцінку ефективності отримання гаплоїдів ярого ячменю у культурі пиляків *in vitro* на основі гібридного селекційного матеріалу за використання у складі індукційного живильного середовища замість агар-агару кукурудзяного крохмалу з підвищеним вмістом амілози (мутація *su*₂). Цей інноваційний елемент технології сприяв підвищенню середнього виходу рослин-регенерантів у 2,5 рази.

Проведена оцінка ефективності отримання гаплоїдів ярого ячменю в культурі пыльников *in vitro* на основі гібридного селекційного матеріалу при використанні в складі питательной среды вместо агар-агара кукурудзяного крахмала с повышенным содержанием амилозы (мутация *su*₂). Этот инновационный элемент технологии позволил увеличить средний выход растений-регенерантов в 2,5 раза.

Evaluation of the efficiency of spring barley haploid production from hybrid breeding material in anther culture *in vitro* under the influence of agar substitution in inductive medium for corn starch with the high amylose content (mutation *su*₂) has been carried out. This innovative element of the technology promoted the 2,5-fold increase of a mean yield of regenerated plants.

БЕЛОКУРОВА В.Б.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, Киев-143, ул. Акад. Заболотного, 148, E-mail: iicb@iicb.kiev.ua*

СОХРАНЕНИЕ *IN VITRO* РАСТЕНИЙ РАРИТЕТНОГО ВИДА *DIANTHUS GRATIANOPOLITANUS* VILL. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УСЛОВИЙ МЕДЛЕННОГО РОСТА

Создание и поддержание коллекций редких и охраняемых видов растений, в том числе с применением методов биотехнологии, является одним из важных направлений природоохранной работы [1]. *Dianthus gratianopolitanus* Vill. (Caryophyllaceae), один из раритетных видов флоры Украины, занесён в Красную книгу и Европейский красный список. Согласно своему природоохранному статусу этот вид считается исчезнувшим с природных территорий Украины в результате антропогенного воздействия, узости ареала обитания и слабой конкурентоспособности [2]. Тем не менее, *D. gratianopolitanus* выращивается в ряде ботанических садов и природных парков с целью исследования возможностей сохранения вида и восстановления численности природных популяций [3, 4]. В банке растительного материала *in vitro*, созданном в ИКБГИ, *D. gratianopolitanus* культивируется с 1994 года в виде асептических растений и клеточных культур. Ранее мы сообщали о начатой работе по использованию так называемых методов медленного роста (“slow growth”) для поддержания масштабной коллекции растений *in vitro* [5]. Учитывая особый природоохранный статус *D. gratianopolitanus*, этот вид был включён в список представителей семейства Caryophyllaceae, использованных как растительный материал для исследований.

Материалы и методы

Асептические культуры *D. gratianopolitanus* были индуцированы из семян, полученных из коллекции ботанического сада университета Фрайбурга (Германия). Методика работы была описана ранее [5]. Растения выращивали на безгормональной среде Мурасиге-Скуга [6] (среда MS₀, контроль). В экспериментах с мантиолом использовали концентрации 10, 15 и 20 г/л (среды MS₁₀, MS₁₅ и MS₂₀, соответственно). Абсцизовую кислоту (АБК) применяли в концентрациях 0,1; 1; 5 или 10 мг/л (среды MS_{A01}, MS_{A1}, MS_{A5} и MS_{A10}). Дополнительным контролем была среда MS_{KD}, содержащая 5 мл/л диметилсульфоксида (ДМСО), так как в работе использовали раствор АБК в ДМСО. Верхушки побегов длиной 10-12 мм помещали на среды разного состава в пробирки высотой 12 см и выращивали в стандартных условиях культуральной комнаты. Ежемесячно оценивали эффективность укоренения, высоту растений и коэффициент выживания при культивировании без переноса на свежие среды. В каждом варианте опыта использовали 10 растений. Статистическую обработку проводили согласно

стандартному методу оценки достоверности разницы между средними значениями по коэффициенту Стьюдента t_d [7].

Результаты и обсуждение

В коллекции асептических растений *in vitro* ИКБГИ растения-представители семейства *Caryophyllaceae*, в том числе *D. gratianopolitanus*, выращиваются на безгормональной среде Мурасига-Скуга с полным или половинным составом макрокомпонентов и сахарозы. При этом темпы роста растений настолько высоки, что требуют переноса материала на свежие среды не реже, чем каждые 1,5-2 месяца. Это существенно увеличивает трудоёмкость работы по поддержанию масштабной коллекции растений, ведёт к дополнительному расходу реактивов и увеличивает риск контаминации материала.

Как известно, для замедления роста *in vitro* применяют соединения, вызывающие осмотический стресс (например, маннитол [8-11]), а также некоторые регуляторы роста, в частности, абсцизовую кислоту [12-14]. Оба эти варианта ингибирующих обработок были использованы для оценки возможности снижения темпов роста растений *D. gratianopolitanus* в культуре *in vitro*.

В течение пяти месяцев культивирования во всех вариантах опытов жизнеспособность сохраняли 100% верхушек побегов и развившихся из них растений. В контроле на среде MS_0 все побеги укоренились к концу первого месяца. На средах, содержащих маннитол, в первый месяц культивирования корневую систему сформировали 100% побегов в варианте MS_{10} , 90% – на среде MS_{15} и 60% – на среде MS_{20} . Наличие в среде АБК также несколько замедляло темпы укоренения, однако к концу второго месяца культивирования 100% побегов формировали нормально развитую корневую систему на средах всех вариантов, как с маннитолом, так и с АБК. Таким образом, наличие маннитола и АБК не сказалось на эффективности укоренения побегов.

Результаты изучения влияния маннитола и абсцизовой кислоты на высоту растений в течение пяти месяцев культивирования *in vitro* представлены в Табл. 1.

Характер изменения средней высоты растений при использовании различных типов ингибирующих обработок приведен на Рис. 1. Данные в основном соответствуют тем, которые были получены ранее на примере двух других представителей семейства *Caryophyllaceae* – *Dianthus monspessulanus* и *Ixoca quadrifida* [5].

Как видно из представленных данных, в контроле растения *D. gratianopolitanus* достигали максимально возможной в данных условиях высоты в течение двух месяцев культивирования, при этом ДМСО не оказывал негативного влияния на темпы роста. Достоверные различия в высоте растений по сравнению с контролем наблюдались только в варианте опыта с использованием маннитола уже при наименьшей изученной концент-

Таблица. 1.

Средняя высота растений *D.gratianopolitanus* при использовании различных вариантов ингибирующих обработок

Среда	Средняя высота растений (мм)				
	1 месяц	2 месяца	3 месяца	4 месяца	5 месяцев
MS ₀	62,3 ± 7,7	97,6 ± 2,8	-	-	-
MSKD	60,5 ± 4,6	87,0 ± 6,7	-	-	-
MS ₁₀	16,0 ± 1,2	21,5 ± 2,0	20,7 ± 1,4	20,9 ± 3,5	24,8 ± 2,7
MS ₁₅	14,7 ± 1,9	18,5 ± 1,9	19,5 ± 2,2	21,1 ± 3,4	23,9 ± 1,7
MS ₂₀	13,1 ± 1,9	15,7 ± 0,9	15,3 ± 1,8	17,5 ± 1,7	20,0 ± 2,0
MS _{A01}	64,3 ± 8,8	94,1 ± 6,7	-	-	-
MS _{A1}	58,6 ± 9,5	89,8 ± 5,5	-	-	-
MS _{A5}	61,7 ± 6,8	99,5 ± 2,6	-	-	-
MS _{A10}	57,3 ± 7,5	94,9 ± 4,0	-	-	-

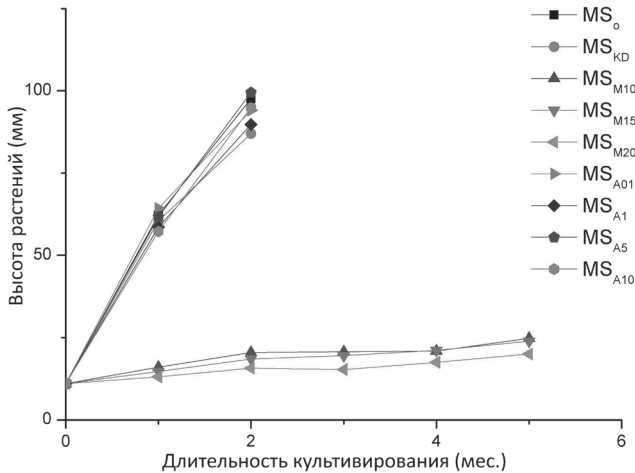


Рис. 1. Динамика увеличения средней высоты растений *D.gratianopolitanus* при длительном культивировании на средах с маннитолом и АБК

рации 10 г/л (Рис. 2). Использование маннитолола в составе питательных сред позволило увеличить интервал субкультивирования растений как минимум до пяти месяцев (вместо 2 месяцев в контрольных вариантах). Вместе с тем следует отметить, что длительное культивирование *D.gratianopolitanus* на средах, содержащих 15 и 20 мг/л маннитолола, приводило к постепенному развитию витрификации растений, которая негативно сказывается на их жизнеспособности.

В отличие от ранее проведенных исследований на примере *D.monspessulanus* и *I.quadrifida*, использование абсцизовой кислоты в составе сред с целью замедления роста растений оказалось неэффективным. На всех вариантах сред с абсцизовой кислотой средняя высота растений *D.gratianopolitanus* не отличалась достоверно от контрольных показателей. Максимальная длительность культивирования растений даже на среде с АБК в концентрации, наибольшей из изученных (10 мг/л), составила 2 месяца, после чего требовалась пересадка верхушек побегов на свежую среду (Рис. 2).

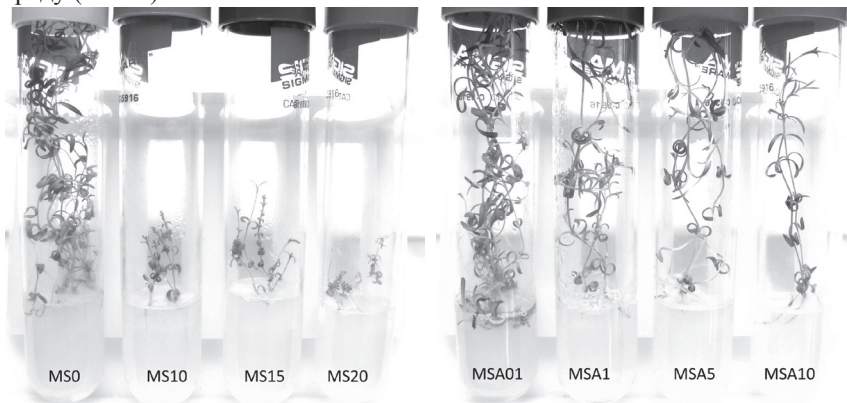


Рис. 2. Растения *D.gratianopolitanus* после двух месяцев культивирования на средах

Таким образом, максимально возможное время выращивания растений *D.gratianopolitanus* без субкультивирований составило в контроле – 2 месяца; на средах, содержащих АБК в разных концентрациях, – 2 месяца; на средах с маннитолом – 5 месяцев. Полученные данные об отсутствии существенного влияния АБК на темпы роста растений *D.gratianopolitanus* в асептической культуре не соответствуют результатам экспериментов на некоторых других видах растений [12, 13]. Возможно, это следствие видоспецифичности ответа конкретного генотипа на условия культивирования. В то же время эффективным ингибитором роста *D.gratianopolitanus*, не снижающим жизнеспособность растительного материала, является маннитол в концентрации 10 г/л, что даёт возможность использовать его в работе по длительному хранению растений в масштабных коллекциях растительного материала.

Выводы

Изучено влияние маннитола и абсцизовой кислоты на темпы роста *in vitro* растений *Dianthus gratianopolitanus* Vill. (Caryophyllaceae). Показано, что использование маннитола для поддержания *in vitro* растений

D.gratianopolitanus без субкультивирований было более эффективным, чем применение АБК.

Работа выполнялась в рамках проекта по поддержанию объекта национального научного достояния Украины «Коллекция зародышевой плазмы растений флоры Украины и мировой флоры».

Литература

1. Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grube M. Slow growth storage and cryopreservation – tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections // International J. of Refrigeration, 2006, v.29, 411-417.

2. «Червона книга України. Рослинний світ» (ред. Дідух Я.П.) // К.: Глобалконсалтинг. – 2009. – с. 388.

3. Деревенко Т.О. Рідкісні види флори Карпат у ботанічному саду Чернівецького національного університету і перспективи їх відновлення *in situ*. // News Biosphere Reserve “Askania Nova”. – 2009. – vol. 11. – 116-120.

4. Колдар Л.А., Небіков М.В., Кучер Н.М. Розмноження *Dianthus gratianopolitanus* Vill. у культурі *in vitro* як метод збереження генофонду рослин. – Матеріали міжнародної научної конференції “Растительный мир в Красной книге Украины: реализация глобальной стратегии сохранения растений”. – Киев, 11-15 октября 2010 г. – с. 268-270.

5. Белокурова В.В. Использование маннитола и абсцизовой кислоты для длительного хранения *in vitro* растений семейства Caryophyllaceae. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова – 2010, 133-138.

6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum – 1962. – v.15. – P. 473-497.

7. Лакін Г.Ф. Биометрия // М.: Высш. школа. – 1990. – 352 с.

8. Divakaran M., Babu K.N., Peter K.V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro* // Scientia Horticulturiae, 2006, v. 110, 175-180.

9. Gonçalves S., Romano A. *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum* // Biologia Plantarum, 2007, v. 51, № 4, 795- 798.

10. Bessembinder J.J.E., Startisky G., Zandvoort E.A. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, v. 33, 121-127.

11. Negash A., Krens F., Schaart J., Visser B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, v. 66, № 2, 107-111.

12. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, v. 61, № 26 161-164.

13. Lemos E.E.P. de Ferreira, Alencar M. de S., Ramalho Neto L.M.C. de, Albuquerque C.E. *In vitro* conservation of sugarcane germplasm // Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 2002, v. 37, N 10, 1359-1364.

14. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose // In Vitro – Cell Dev. Biol. – Plant, 2004, v. 40, 485-490.

Резюме

Проведена оцінка впливу маннітола та абсцизової кислоти на ріст асептично культивованих рослин *Dianthus gratianopolitanus*. Существеного зниження темпів росту вдалося досягти тільки з використанням маннітола (10 г/л), а АБК не оказувала впливу навіть у концентрації 10 мг/л. Таким образом, маннітол може застосовуватися в складі поживних серед для тривалого зберігання рослин цього виду *in vitro*.

Проведено оцінку впливу манітолу та абсцизової кислоти на ріст асептично культивованих рослин *Dianthus gratianopolitanus*. Суттєвого зменшення темпів росту вдалося досягти тільки з використанням манітолу (10 г/л), а АБК не впливала на висоту рослин навіть у концентрації 10 мг/л. Таким чином, манітол може бути застосований у складі середовищ для тривалого зберігання *D.gratianopolitanus in vitro*.

The influence of mannitol and abscisic acid on the growth of aseptically cultured *Dianthus gratianopolitanus* plants was studied. The use of mannitol (10 g/l) in culture media allowed significant decrease of growth rates while abscisic acid even at 10 mg/l did not show such effect.

БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПІРДОНОВА К.В., КУНАХ В.А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. акад. Заболотного, буд. 150, м. Київ, 03680, Україна, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

МІНЛИВІСТЬ ПЛР-МАКЕРІВ НА ОСНОВІ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ХВОРОБ ТА ВІДПОВІДІ НА АБІОТИЧНИЙ СТРЕС В КУЛЬТУРІ ТКАНИН *UNGERNIA VICTORIS*

Унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko, *Amaryllidaceae*) – продуцент ізохінолінових алкалоїдів та біологічно активних полісахаридів – цінний лікарський вид, що потребує збереження. Розроблено ефективні методики отримання та тривалого вирощування культури тканин та рослин-регенерантів *U. victoris* [1]. Розпочато роботу із дослідження їхньої генетичної стабільності за допомогою цитогенетичного та молекулярно-генетичного аналізу (RAPD та ISSR) [2, 3].

В останні роки все більшу популярність у молекулярно-генетичних дослідженнях завойовують маркери на основі транскрибованих ділянок геному [4]. Для розширення вивчення соматональної мінливості ми перейшли від випадкового сканування геному шляхом дослідження анонімних послідовностей ДНК, переважно некодуючих (RAPD-аналіз), до вивчення кодуєчих послідовностей геному. У цій роботі було використано RGAP (Resistance Gene Analog Polymorphisms) – маркери на основі консервативних послідовностей генів стійкості до хвороб [5] та LP-PCR-маркери (Long Primer PCR) на основі послідовностей генів відповіді на абіотичний стрес [6]. Ці гени належать до мультигенних родин, тому розроблені на їхній основі маркери є високополіморфними та дають спектри ампліфікації з

великою кількістю анонімних фрагментів, серед яких переважають кодуєчі послідовності. Функція зазначених генів безпосередньо пов'язана із забезпеченням життєздатності організму в умовах стресу, тому мінливість, яку вони виявляють, має адаптивний характер [5, 6].

Раніше використання RGAP та LP-PCR-маркерів для генетико-популяційних та молекулярно-екологічних досліджень, спрямованих на вивчення генетичних основ адаптації до умов довкілля, дозволило встановити наявність значної кореляції деяких із них із низкою екологічних чинників. Крім того, було виявлено наявність зворотного зв'язку рівня поліморфізму цих маркерів із жорсткістю умов зростання, що свідчить про значний тиск на них природного добору [5–7]. Ми припустили, що ці послідовності мають також зазнавати змін під впливом стресових умов культивування *in vitro*, і застосували їх для вивчення мінливості геному *U. victoris* в культурі тканин, зокрема при тривалому вирощуванні в стандартних умовах та після зміни умов вирощування, а саме підвищення вмісту фітогормонів у складі живильного середовища.

Матеріали і методи

Калюсну культуру *U. victoris* із сегментів лусок цибулини отримували і вирощували на середовищі 5C01, що містило 2 мг/л α -НОК і 1 мг/л кінетину, мінеральну основу за Воллосовичем, доповнену 1 мг/л тіаміну, по 0,5 мг/л піридоксину й нікотинової кислоти, 2 мг/л гліцину, 80 мг/л мезоінозиту, 500 мг/л гідролізату казеїну, 9 г/л агару, 5 мл/л Fe-хелату, мікроелементами за Мурасіге й Скугом. Отримання та вирощування культури тканин детальніше описано у [1]. Через 2,5 роки (24 пасажі) калюсну культуру розділили і продовжили культивувати на двох середовищах 5C01 та 5C01-5 – із уп'ятеро підвищеним вмістом фітогормонів – 10 мг/л α -НОК і 5 мг/л кінетину.

ДНК виділяли шляхом лізису ізольованих ядер ДСН з очисткою фенолхлороформом. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», Росія). Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 0,2 мМ дНТФ, 1,25 U Таq-полімерази, 0,6 мМ праймера, 1 \times амонійний буфер (Fermentas, Литва), для RGAP – 30 нг ДНК, для LP-PCR – 30–150 нг ДНК залежно від праймера. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії для запобігання випаровуванню. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. Ампліфікацію проводили за наступного температурного режиму: 94 $^{\circ}$ C – 2 хв., 40 \times (94 $^{\circ}$ C – 30 с, $t_{\text{гібр}}$ – 30 с, 72 $^{\circ}$ C – 90 с), 72 $^{\circ}$ C – 2 хв. 30 с. Для RGAP-праймерів $t_{\text{гібр}}$ складала 45 $^{\circ}$ C, для LP-PCR-праймерів – 55 $^{\circ}$ C. Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом в 1,5 % агарозному гелі в буфері 0,5 \times TBE і візуалізували забарвленням бромистим етидієм. Результати фракціонування представляли у вигляді бінарної матриці, у якій наявність або відсутність у спектрі ампліфікації однакових за розміром фрагментів

позначали відповідно як стан “1” або “0”. На основі отриманої матриці за допомогою програми FAMD розраховували генетичні відстані Жакарда.

Результати і обговорення

У роботі використали калюсні тканини *U. victoris*, які після 24 пасажів на середовищі 5C01 вирощували на двох живильних середовищах: 5C01 та середовищі 5C01-5 із підвищеним вмістом фітогормонів. Культура тканин на середовищі 5C01 характеризувалася стабільним ростом, натомість на середовищі 5C01-5 ріст культури тканин після 15 пасажів дуже сповільнився і на 21 пасажі її вирощування припинили. Для генетичного аналізу відібрали калюс із середовища 5C01 у 24, 45 та 69 пасажах (2,5; 3,5 та 6,5 роки вирощування) та з 5C01-5 у 4, 11 та 21 пасажах (0,5; 1 та 2 років). Як контроль у дослідженні використовували ДНК вихідної рослини.

Для ПЛП-аналізу використали 6 пар RGAP-праймерів на основі послідовностей генів стійкості до хвороб [5] та 4 LP-PCR-праймери на основі послідовностей генів відповіді на абіотичний стрес [6]. Загалом було враховано 108 ампліконів розміром 150-3000 пн. Відмінності між об'єктами виявили дві пари RGAP-праймерів та два LP-PCR-праймери, загалом – 7 поліморфних фрагментів (6,5 %) (таблиця).

Таблиця

Характеристика RGAP- та LP-PCR-праймерів та їхніх ПЛП-продуктів, отриманих із ДНК калюсних тканин *U.victoris*

	№ п/п	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5' – 3')	Кількість врахованих / поліморфних ампліконів, шт.	Сума
RGAP	1	RLRR for	CGCAACCACTAGAGTAAC	12/0	64/2
		RLRR rev	ACACTGGTCCATGAGGTT		
	2	Pto kin3	TACTTCGGACGTTTACAT	12/0	
		Pto kin4	AGTGTCTTGTAGGGTATC		
	3	NLRR for	TAGGGCCTCTTGATCGT	11/1	
		NLRR rev	TATAAAAAGTGCCGGACT		
	4	Cre3Ploop	GCGGGTCTGGGAAATCTACC	9/0	
		Cre3-k3	CTGCAGTAAGCAAAGCAACG		
	5	NLRR-INV1	TGCTACGTTCTCCGGG	10/1	
		NLRR-INV2	TCAGGCCGTGAAAAATAT		
6	Pto-kin1 IN1	AAGTGGAACAAGGTTAGG	10/0		
	Pto-kin2 IN2	GATGCACCACCAGGGGG			
LP-PCR	7	HSE	GGAAGACGATAGACCCTTCG	6/0	44/5
	8	MRE	ATGCTATTCTGGAAACGGCC	18/1	
	9	SGER	TGGTGCCTCGCCGCTGACG	14/4	
	10	DRE	ATGGTTGCTTCCGAGATGC	6/0	
Сума					108/7

Із виявлених поліморфних фрагментів два були наявними у спектрі ампліфікації материнської рослини, але зникли у всіх досліджених калюсів, решта – навпаки – за відсутності у контролі з'явилися у спектрах одного (чотири фрагменти) (рисунок) або декількох калюсів (один фрагмент). Не виявлено фрагментів, характерних лише для калюсних тканин із певного живильного середовища.

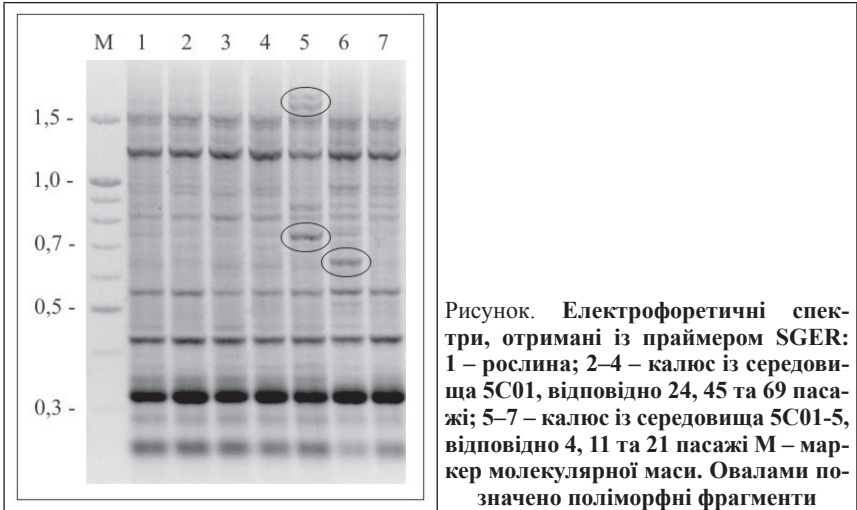


Рисунок. Електрофоретичні спектри, отримані із праймером SGER: 1 – рослина; 2–4 – калюс із середовища 5C01, відповідно 24, 45 та 69 пасажі; 5–7 – калюс із середовища 5C01-5, відповідно 4, 11 та 21 пасажі М – маркер молекулярної маси. Овалами позначено поліморфні фрагменти

Генетичні відстані Жакарда між рослиною та калюсами, розраховані за сумарними даними RGAP- та LP-PCR-аналізу, загалом зростали у динаміці культивування. На вихідному середовищі 5C01 генетична дистанція від вихідної рослини залишалася незмінною у 24 та 45 пасажах (1,94 %), та зростала у 1,5 рази у 69 пасажі (2,88 %). На 5C01-5 мінливість була вищою: уже в 4 пасажі генетична дистанція від рослини досягала рівня 69 пасажу на середовищі 5C01 (2,88 %), за подальшого культивування вона стрімко зростала в 11 пасажі (майже вдвічі) (5,61 %), знову знижуючись у 21 пасажі до рівня 4 пасажу, що однак перевищувало значення генетичної відстані калюсу на вихідному середовищі від рослини на той же час (45 пасаж) у 1,5 рази. В цілому отримані дані підтверджують встановлену раніше закономірність, що переважна більшість геномних змін відбувається протягом перших 2,5 років культивування *in vitro*, в подальшому ж спостерігається стабілізація культури, яка виражається в зниженні темпу їх накопичення. Разом з тим, додатковий стрес, як у нашому випадку, зміна складу живильного середовища, здатний викликати повторний сплеск геномної мінливості.

У цій роботі RGAP- та LP-PCR-маркери були вперше використані для генетичного аналізу культури тканин *in vitro*. Застосовані маркери виявилися ефективним інструментом для вивчення соматональної мінливості *U.*

victoris – половина LP-PCR-праймерів та третина RGAP-праймерів виявили мінливість у культурі тканин. Генетична дистанція Жакарда між материнською рослиною та культурою тканин із середовища 5C01-5 (4 пасаж) за даними RAPD-аналізу (24 праймери) становила 2,29 % (власні неопубліковані дані), тоді як за сумарними даними RGAP- та LP-PCR-аналізу – 2,88 %. Тобто за ефективністю ці праймери не поступаються RAPD-праймерам. За літературними даними, при дослідженні генетичного поліморфізму рослин у природі результативність цього типу маркерів також була високою і перевищувала таку для RAPD-аналізу [5] або дорівнювала їй [6]. Крім того показано, що мінливість RGAP-локусів принаймні частково корелює з екологічними факторами (особливостями клімату та ґрунту) [6]. Щонайменше чверть усіх поліморфних ПЛР-фрагментів генів відповіді на абіотичний стрес були достовірно зчеплені принаймні з одним із екогеографічних параметрів, що перевищувало відповідну частку AFLP- і RAPD-ампліконів [5]. Це свідчить скоріше про адаптивний, ніж нейтральний характер мінливості використаних нами в ролі маркерів послідовностей, що є їхньою додатковою перевагою у випадках, коли необхідно дослідити адаптаційні зміни геному під дією зовнішніх чинників.

Висновки. Таким чином, маркери на основі послідовностей генів, пов'язаних із стійкістю до хвороб та відповіддю на абіотичний стрес, характеризуються мінливістю в культурі тканин *U. victoris* і можуть бути використані для дослідження соматональної мінливості цього виду. Отримані дані свідчать, що більшість геномних змін відбувається протягом перших етапів культивування *in vitro*, в подальшому ж спостерігається зниження темпу їх накопичення. Додатковий стрес здатний викликати повторний сплеск геномної мінливості.

Література

1. Кунах В. А., Можилевська Л. П., Бублик О. М., та ін. Мікрональна розмноження унгернії Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 57–63.
2. Бублик О. М., Андреев І. О., Спіридонова К. В., Кунах В. А. Соматональна мінливість *U. victoris*: необхідність комплексного генетичного аналізу // *Biorolym. Cell.* – 2008. – № 6. – С. 487-493.
3. Бублик О. М., Андреев І. О., Спіридонова К. В., Кунах В. А. Мінливість міжмікросателітних ділянок геному (ISSR) у культурі тканин *Ungernia victoris* // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. Т. 9. / відп. ред. В. А. Кунах – К.: Логос, 2010. – С. 8 -12.
4. Gupta P. K., Rustgi S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants // *Functional & Integrative Genomics.* – 2004. – Vol. 4, № 3. – P. 139–162.
5. Dong P., Wei Y., Chen G. et al. Resistance gene analog polymorphisms (RGAPs) in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) and their ecological associations // *Genet. Resour. Crop Evol.* – 2009. – Vol. 56. – P.121–136.

6. Liviero L., Maestri E., Gulli M. et al. Ecogeographic adaptation and genetic variation in wild barley, Application of molecular markers targeted to environmentally regulated genes // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2002. – Vol. 49, № 2. – P. 133–144.

7. Maestri E., Malcevski A., Massari A., Marmioli N. Genomic analysis of cultivated barley (*Hordeum vulgare*) using sequence-tagged molecular markers. Estimates of divergence based on RFLP and PCR markers derived from stress-responsive genes, and simple-sequence repeats (SSRs) // Mol. Genet. Genomics. – 2002. – Vol. 267. – P. 186–201.

Резюме

ПЛР-маркери на основі послідовностей генів стійкості до хвороб та відповіді на абіотичний стрес характеризуються мінливістю в культурі тканин *U. victoris* і можуть бути використані для дослідження соматоклональної мінливості. Більшість геномних змін при тривалому вирощуванні в стандартних умовах відбувається протягом перших етапів культивування *in vitro*, в подальшому ж спостерігається зниження темпу їх накопичення. Додатковий стрес (підвищення вмісту фітогормонів у середовищі) здатний викликати повторний сплеск геномної мінливості.

ПЦР-маркери на основі послідовностей генів устойчивости к болезням и ответа на абиотический стресс характеризуются изменчивостью в культуре тканей *U. victoris* и могут применяться для исследования соматоклональной изменчивости. Большинство геномных изменений при продолжительном выращивании в стандартных условиях происходит на первых этапах культивирования *in vitro*, в дальнейшем же наблюдается снижение темпа их накопления. Дополнительный стресс (повышение содержания фитогормонов в среде) способен вызвать повторный всплеск геномной изменчивости.

PCR-markers based on the gene sequences responsible for plant disease resistance and abiotic stress response are distinguished by variation in *U. victoris* tissue culture and can be applied for study of somaclonal variability. Most genomic changes found upon long-term maintenance under standard conditions took place at the early stages of culturing *in vitro*, in the sequel there occurred reduction of their accumulation rate. Additional stress (increased phytohormone level in the medium) could provoke the second burst of genomic variability.

БУГАРА И.А., ЧМЕЛЕВА С.И., ОМЕЛЬЧЕНКО А.В., ЮРКОВА И.Н., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., ШИРИНА А.О.

*Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского,
Украина, 95007, Симферополь, проспект Вернадского, 4, e-mail: omesavl@ukr.net*

ПОЛУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ФАТСХЕДЕРЫ ЛИЗЕ (*FATSHEDERA LIZEI*)

В последние годы, в связи с ограниченностью природного лекарственного сырья, разработка биотехнологических способов получения биологически активных веществ из биомассы культивированных клеток *in vitro*, является актуальным и перспективным [1, 2]. Представители семейства аралиевых являются источником ценных тритерпеновых гликозидов, которые

проявляют ярко выраженное адаптогенное, антибактериальное, противогрибковое, противокашлевое действие (женьшень, аралия маньчжурская, заманиха высокая, элеутерококк колючий, лимонник китайский, плющ обыкновенный) [3]. *Fatsyhedera lizei* – межродовой гибрид, полученный при скрещивании двух видов, принадлежащих к различным родам *Fatsia* L. и *Hedera* L. В настоящее время фатсия и плющ являются достаточно исследованными культурами [4, 5]. При этом публикации, касающиеся получения каллусных культур фатсхедеры в научной печати отсутствуют.

Целью наших исследований явилось оптимизация условий получения каллусной культуры фатсхедеры лизе (*Fatsyhedera lizei*).

Материал и методы

Материалом для исследований служили вегетативные органы растений фатсхедеры, культивируемые в условиях закрытого грунта. Растения содержали в вегетационных сосудах объемом 5 л, в субстрате, состоящем из смеси почвы, песка, керамзита и перлита. Полив осуществляли по мере необходимости. В качестве инициальных эксплантов для получения каллусных культур были взяты сегменты молодых листьев и листовых черешков. При выполнении работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [6, 7].

Культивирование эксплантов *in vitro* проводили на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга [8], дополненной 2,4-Д, 6-БАП, кинетином и аскорбиновой кислотой в различных концентрациях.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что индукция каллусогенеза наблюдалась на всех питательных средах, содержащих экзогенные фитогормоны в различных концентрациях. Однако, в культуре *in vitro* сегментов молодых листьев частота каллусообразования была выше на питательных средах МС1, МС2 и МС4. На модифицированных питательных средах МС3 и МС5 зависимость частоты каллусообразования от типа экспланта не наблюдалась (табл. 1).

Вместе с тем, на модифицированной питательной среде МС3, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л 6-БАП, 1,0 мг/л кинетином и 0,5 мг/л ИУК, при культивировании листовых сегментов и сегментов листовых черешков, были получены наилучшие результаты по частоте каллусогенеза (табл. 1).

Индукцию каллусогенеза визуально обнаруживали на 10-15 суток культивирования в зависимости от состава питательной среды. Каллус имел желто-зеленую, местами коричневатую окраску и рыхлую консистенцию (рис. 1, а).

После 40-45 суток культивирования большая поверхность каллуса приобретала зеленоватую окраску. На поверхности каллуса формировалось глобулярные, эмбриоидоподобные структуры, диаметром 2-5 мм, которые располагались, как правило, в верхней части.

Таблица 1

Зависимость частоты каллусообразования от типа экспланта и состава питательной среды

Тип экспланта	Питательная среда	Концентрация фитогормонов в питательной среде, мг/л					Частота каллусообразования, %
		2,4-Д	6-БАП	кин-тин	ИУК	аскорби-новая кислота	
Сегменты молодых листьев	МС1	-	1,0	0,1	0,5	-	87,4±5,8
Сегменты листовых черешков							51,2±3,5
Сегменты молодых листьев	МС2	2,0	0,1	1,0	-	-	80,1±3,3
Сегменты листовых черешков							55,2±2,7
Сегменты молодых листьев	МС3	2,0	0,5	1,0	0,5	-	95,2±2,1
Сегменты листовых черешков							88,3±4,3
Сегменты молодых листьев	МС4	2,0	1,0	0,5	-	1,0	73,4±3,7
Сегменты листовых черешков							42,1±3,2
Сегменты молодых листьев	МС5	3,0	1,0	1,0	-	1,0	34,7±4,4
Сегменты листовых черешков							25,5±1,7
Сегменты молодых листьев	МС6	-	-	-	-	-	0,0
Сегменты листовых черешков							0,0

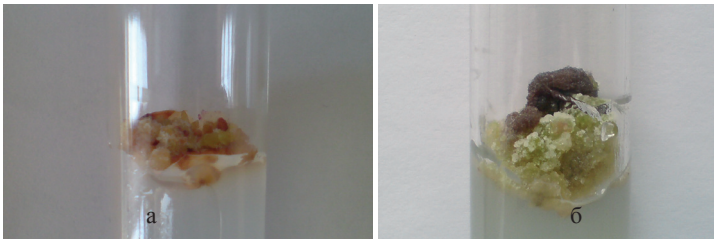


Рис. 1. Каллус *Fatshedera lizei*, полученный в культуре листовых эксплантов: а – первичный, б – пассируемый на МС3.

Влияние гормонального состава питательной среды на прирост биомассы каллуса

Вариант питательной среды	Концентрация фитогормонов в питательной среде, мг/л					Прирост биомассы, %
	2,4-Д	6-БАП	кинетин	аскорбиновая кислота	ИУК	
МС1	-	1,0	0,1	-	0,5	100
МС2	2,0	0,1	1,0	-	-	150
МС3	2,0	0,5	1,0	-	0,5	200

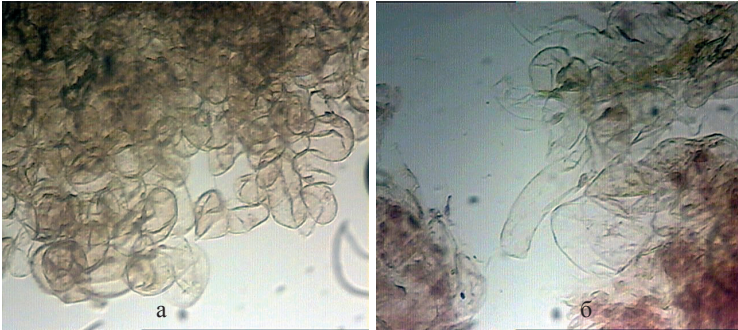


Рис. 2. Клетки каллусной ткани *Fatshedera lizei*: а – меристематические, б – паренхимные.

После 45 суток культивирования каллус пересаживали на свежую питательную среду. Для пассирования каллуса, индуцированного в культуре сегментов молодых листьев и сегментов листовых черешков использовали среды, на которых частота каллусообразования была наибольшей (табл. 1, рис. 1, б).

Наши исследования показали, что наименьший прирост биомассы каллуса (100%) наблюдался на модифицированной питательной среде, дополненной 1,0 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л кинетином и 0,5 мг/л ИУК. С увеличением концентрации кинетина в питательной среде прирост биомассы каллуса возрастал и на питательной среде с 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-БАП, 1,0 мг/л кинетином и 0,5 мг/л ИУК достигал наибольшего значения – 200% (табл. 2).

Цитологическое исследование первичного и пассируемого каллуса *Fatshedera lizei* проводили на временных давленных препаратах, окрашенных метиленовым синим. Гистологическая дифференциация клеток была выражена слабо. Пассируемый каллус отличался значительной вариабельностью клеток по размерам и форме. В нем четко дифференцировались клетки меристематического и паренхимного типов (рис. 2). Меристематические клетки отличались небольшими размерами и располагались локальными скоплениями. Они имели изодиаметрическую форму, крупное ядро и

ядрышко. Ядрышко занимало значительную часть объема ядра и было окружено светлой зоной кариоплазмы. Цитоплазма слабо вакуолизированна.

Округлые клетки имели хорошо выраженное ядро и отличались слабой вакуолизацией цитоплазмы. В удлинённых паренхимных клетках ядро визуально не дифференцировано, располагались они, как правило, локально, в местах скопления клеток меристематического типа.

Выводы

В ходе проведенных исследований были оптимизированы условия получения первичных и пассируемых каллусных культур фатсхедеры (*Fatshedera lizei*). Пассируемый каллус отличался высоким уровнем морфологической гетерогенности.

Литература

1. Кунах В. Р. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В. Р. Кунах. – К. : Логос, 2005. – 730 с.

2. Носов А. М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А. М. Носов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М. : Наука, 1991. – С. 5–20.

3. Гришковець В. І. Тритерпенові глікозиди аралєєвих: виділення, встановлення будови, біологічна активність та хемотаксономічне значення : автореф. дис. ... д-ра хімічних наук: спец. біоорганічна хімія – 02.00.10 / Володимир Іванович Гришковець; Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України. – Одеса, 2004. – 39 с.

4. Кемоклидзе З. Тритерпеновые гликозиды фатсии японской – *Fatsia japonica*, культивируемой в Грузии и новый лекарственный препарат фатцифлогин : автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук спец. : 15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакология / Зураб Кемоклидзе; АН Грузии, Ин-т фармаколог. – Тбилиси, 1999. – 26 с.

5. Смычков В. Ф. Противовоспалительные свойства сапонинов плюща колхидского / В. Ф. Смычков, Н. Ф. Фаращук // Здоровоохр. Белоруссии. – 1975. – Т.2, № 11. – С. 27.

6. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – К. : Наукова думка, 1980. – 488 с.

7. Культура клеток растений : [Сб. ст.] / АН СССР, Ин-т физиологии им. К. А. Тимирязева, Отв. ред. Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1981. – 168 с.

8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Plant Physiol. – 1962. – V.15. – P. 473-497.

Резюме

Проведенные исследования позволили оптимизировать условия получения первичных и пассируемых каллусных культур фатсхедеры (*Fatshedera lizei*). Пассируемый каллус отличался высоким уровнем морфологической гетерогенности.

Проведенні дослідження дозволили оптимізувати умови отримання первинних і перепасованих калусних культур фатсхедери (*Fatshedera lizei*). Перепасований калус відрізнявся високим рівнем морфологічної гетерогенності.

Our studies have allowed to optimize the conditions for receiving primary and passaged callus cultures of fatshedery (*Fatshedera lizei*). Passaged callus hased a high level of morphological heterogeneity.

БУРЛАКА О.М., ПІРКО Я.В., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я.Б.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, вул. Осиповського, 2а, Київ, 04123, Україна. E-mail: cellbio@cellbio.freenet.viaduk.net

ВИКОРИСТАННЯ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН

Наноматеріали знаходять все більш широке застосування у біотехнології та біомедицині. Зокрема, надзвичайно актуальними є дослідження можливості їх використання для адресної доставки лікарських засобів, створення біосенсорів, конструювання тканин, а також для перенесення ДНК у живі клітини [1, 2]. Поширеними на даний час методами генетичної трансформації рослин є агробактеріальна та біобалістична трансформація, електропорація, мікроін'єкція та інші. Але використання будь-якого із цих методів пов'язане з певними обмеженнями, що спонукає до розробки нових методів трансформації, зокрема таких, що базуються на застосуванні наноматеріалів, серед яких важливе місце належить вуглецевим нанотрубкам (ВНТ). Сприятливе підґрунтя для розробки ефективної системи генетичної трансформації за допомогою ВНТ пояснюється низкою особливих властивостей цих структур, а саме:

- нанорозміром, поєднаним з великою площею поверхні, до якої можливо приєднувати цільові молекули;
- сприятливим для проникнення ВНТ у клітину співвідношенням довжини до діаметру [3];
- здатністю проходити крізь мембрану клітин та клітинну стінку у рослин [4];
- здатністю нековалентно взаємодіяти з ДНК, за рахунок π - π -стекінг взаємодій, зв'язувати її та транспортувати у клітину [5, 6].

ВНТ складаються з одного (одностінні ВНТ – ОСВНТ) чи кількох (багатостінні ВНТ – БСВНТ) коаксіальних циліндрів, утворених згорнутими у трубку шарами графену, в яких атоми вуглецю формують гексагональну решітку. Діаметр ВНТ, залежно від кількості шарів, варіює від 0,4 нм до 100 нм, а довжина може коливатися від кількох десятків нм до кількох мкм [7]. Поверхня ВНТ має яскраво виражені гідрофобні властивості, тому для застосування у біотехнології їх функціоналізують з метою отримання водних розчинів ВНТ, підвищення біодоступності та зниження токсичності [8, 9]. Хімічна функціоналізація надає ВНТ здатності диспергуватися у різних середовищах та взаємодіяти з певними сполуками внаслідок модифікації властивостей їх поверхні. Реактивність ВНТ пов'язана з неспівпадінням π -орбіталей суміжних атомів карбону внаслідок деформації, індукованої просторовим викривленням [10]. Використовують два типи функціоналізації ВНТ: ковалентну та нековалентну. Для ковалентної функціоналізації ВНТ найчастіше застосовують обробку кислотами (суміш сірчаної та азотної кислот), під час якої дія потужних окисників спричиняє розрив ароматичних кілець на кепках і дефектах бічних стінок ВНТ та генерує виникнення карбоксильних груп, які можуть приймати участь у подальших хімічних реакціях [11]. Хоча окислені ВНТ здатні диспергува-

тись у воді, вони утворюють агрегати у присутності солей внаслідок ефектів екранування заряду і, отже, не можуть бути безпосередньо використані для біологічних експериментів через високий вміст солей у більшості біологічних розчинів. Нековалентна функціоналізація ВНТ здійснюється за рахунок приєднання до їх поверхні амфифільних молекул сурфактанту чи полімерів [1].

Молекули ДНК також можуть застосовуватися для диспергування ВНТ у воді завдяки π - π -стекинг взаємодіям між азотистими основами ДНК та поверхнею ВНТ [12-14]. Це має надзвичайно велике практичне значення для розробки методик генетичної трансформації з використанням ВНТ, оскільки комплекси, утворені внаслідок взаємодії гідрофобних ВНТ з ДНК, під час якої має місце спіральне обертання ДНК навколо ВНТ, на відміну від чистих ВНТ, набувають здатності диспергуватися у воді. В такому випадку, гідрофільні цукро-фосфатні групи ДНК виявляються повернутими у бік розчину. Отримані свідчення того, що молекули ДНК на поверхні ВНТ можуть розщеплюватися нуклеазами у біологічних середовищах, які містять ці ферменти [15]. Але інші дослідження, пов'язані з вивченням можливості створення ДНК-зондів на основі нанотрубок, засвідчують протилежне: зв'язування цільової одноланцюгової ДНК підвищує її стійкість до розщеплення нуклеазами та ефективність доставки у клітину у порівнянні з ДНК, яка не зв'язана з ВНТ [16]. Є дані про те, що дестабілізація ДНК та її конформаційні зміни, індуковані взаємодією з ВНТ, а також афінність ДНК до ВНТ залежать від типу послідовностей у полінуклеотидному ланцюгу; зокрема було виявлено, що короткі олігонуклеотиди, які мають повторювані послідовності гуаніну і тиміну ((dGdT) $_n$, де $n = 10-45$) можуть спірально-подібно обгортатися навколо ВНТ [17, 18].

Більшість досліджень з приводу взаємодії ВНТ з клітиною проводились на клітинах ссавців та бактерій. Так, згідно з однією із запропонованих експериментально обґрунтованих моделей проникнення та циркуляції ВНТ у клітині (на прикладі ембріональних епітеліальних клітин нирки людини) [19], ВНТ проникають у клітину за рахунок реалізації двох різних механізмів. Поодинокі ВНТ прямо проходять крізь мембрану клітини, при цьому коротші ВНТ з більшою частотою проникають через плазматичну мембрану, ніж довгі ВНТ, тоді як кластери (пучки) ВНТ захоплюються клітиною в процесі ендоцитозу. Кластери ВНТ в ендосомах розпадаються на поодинокі нанотрубки, які проходять у цитоплазму крізь мембрану ендосом. Згодом усі ВНТ в клітині збираються у лізосомах і екскретуються. У дослідженні механізму транслокації ВНТ різних діаметрів крізь мембрану клітини шляхом спонтанного проколювання, індукованого тепловим рухом, було підраховано, що енергія розриву фосфоліпідного бішару набагато вища за енергію теплового руху ВНТ [20], що може свідчити на користь того, що проходження ВНТ у клітину, швидше за все, відбувається за рахунок ендоцитозу.

Під час вивчення взаємодії рослинної клітини з наноматеріалами та з'ясування субклітинної локалізації ВНТ було виявлено, що ВНТ проникають у протопласти за рахунок їх захоплення із зовнішнього середовища в ендосоми з наступним виходом із ендосом у цитоплазму [21]. Крім того, короткі ВНТ (менше 100 нм) тяжіли до накопичення у певних клітинних структурах, таких як ядро, пластиди, вакуолі, що в подальшому може бути використане для адресної доставки певних молекул до цих структур. У ході дослідження механізмів взаємодії ВНТ з рослинною клітиною, що вкрита клітинною стінкою, після інкубування комплексів ВНТ з флуоресцентним барвником ізотіоціанатом флуоресцеїну (ФІТЦ) з клітинами тютюну ВУ-2 спостерігали інтенсивну внутрішньоклітинну флуоресценцію, пов'язану з проникненням цих комплексів всередину клітин [4]. Результати цього дослідження також свідчать про те, що в даному випадку мало місце ендцитоз-опосередковане поглинання ВНТ. При використанні комплексів ВНТ-ФІТЦ-ДНК флуоресцентний сигнал був досить сильним (у 80% клітин), але розподіл комплексів у клітині відрізнявся. Також була встановлена майже повна відсутність цитотоксичності ВНТ для клітин ВУ-2 при використанні у дослідженні концентраціях [4].

Стосовно впливу вуглецевих наноматеріалів на життєдіяльність рослинного організму в цілому існують протилежні повідомлення. Так, було встановлено, що інкубовані з ВНТ рослини рису відставали у розвитку і мали гірші морфо-фізіологічні показники, ніж контроль [22], що, як припускають автори роботи, може бути пов'язано з блокуванням коренів рослин високими концентраціями ВНТ на рівні корневих волосків, на поверхні яких адсорбуються ВНТ. Іншим дослідженням було виявлено, що інкубування насіння томатів з ВНТ підвищувало частоту проростання та значно прискорювало ріст проростків [23], що пов'язується з впливом ВНТ на поглинання води проростаючим насінням. Загалом, отримані експериментальні дані свідчать про те, що характер впливу ВНТ на ріст і розвиток рослин залежить від типу використаних наночастинок, їх концентрації, часу експозиції, виду рослини та методу введення наночастинок у рослину.

Є відомості про успішне проведення генетичної трансформації клітин бактерій та тварин з використанням ВНТ. Описано, зокрема, створення системи доставки плазмід у бактеріальні клітини *Escherichia coli* з використанням функціоналізованих обробкою кислотами ВНТ та мікрохвильових імпульсів [24]. Повідомляється також про успішну трансформацію геном GFP клітин ссавців за допомогою ВНТ, функціоналізованих окисненням і приєднанням аміногруп. До речі було відмічено, що функціоналізовані ВНТ виявляли набагато меншу цитотоксичність ніж ряд комерційних трансформуючих агентів [25].

Таким чином, виходячи із все зростаючого інтересу до застосування ВНТ для генетичної трансформації клітин, нами була поставлена мета розробити ефективну систему трансформації рослинних клітин за допомо-

гою БСВНТ, першим етапом реалізації якої стала розробка методики утворення комплексу ДНК–ВНТ для подальшого застосування у трансформації.

Матеріали і методи

Виділення плазмідної ДНК. Плазмідну ДНК виділяли з культури бактеріальних клітин за стандартним протоколом з незначними модифікаціями [26]. Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично.

Отримання водної системи комплексів ДНК з ВНТ. Для отримання стабільно диспергованих у воді комплексів ДНК з ВНТ до 1 мл водного розчину плазмідної ДНК (концентрація ДНК складала 850 мкг/мл) додавали 0,5 мг БСВНТ (діаметр трубок 12-20 нм). Після цього суміш інтенсивно перемішували на апараті типу Vortex (близько 3 хв.) і в подальшому обробляли ультразвуком впродовж різних проміжків часу при температурі 10°C. Отриманий розчин центрифугували для осадження недиспергованих агломератів нанотрубок протягом 1 год. при 800 g. Супернатант об'ємом 1 мл обережно відокремлювали від осаду і використовували для подальшої роботи.

Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень вдалося отримати стабільний колоїдний розчин комплексу ДНК–БСВНТ. Він мав темне забарвлення і за описами був схожий на розчин, отриманий японськими дослідниками в експериментах з одностінковими вуглецевими нанотрубками (ОСВНТ) [13]. Можна погодитися з думкою, що утворення колоїдного розчину зумовлене присутністю диспергованих у воді комплексів ДНК з ВНТ, які виникли внаслідок взаємодії між поверхнею бічних стінок ВНТ та молекулами ДНК. Даний колоїдний розчин фактично є трансформаційно-активною сумішшю, що містить цільові послідовності ДНК, адсорбовані на поверхні фізичного вектору, яким виступає нанотрубка. Проведені перші досліди на здатність цього комплексу трансформувати культуру клітин тютюну з метою з'ясування експериментальних факторів, котрі впливають на цей процес, а також специфіки субклітинної локалізації БСВНТ.

Висновки. Розробка системи генетичної трансформації рослин за допомогою ВНТ є актуальним напрямком у сучасній біотехнології, що обумовлено цілим рядом особливих властивостей ВНТ та можливими перевагами у порівнянні з уже існуючими. Першим етапом генетичної трансформації рослин з використанням ВНТ в якості фізичних векторів є отримання функціоналізованих за допомогою ДНК нанотрубок. Нами отримані стабільні комплекси БСВНТ з плазмідною ДНК та розпочаті експерименти по вивченню властивостей цих комплексів та їх використанням для генетичної трансформації клітин рослин.

Література

1. *Bekyarova E., Ni Y., Malarkey E. B. et al. Applications of carbon nanotubes in biotechnology // J. Biomed. Nanotechnol. – 2005. –V. 1, N. 1. – P. 3–17.*

2. *Pantarotto D., Singh R., McCarthy D. et al.* Functionalised carbon nanotubes for plasmid gene DNA delivery // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2004. – V. 43. – P. 5242-5246.
3. *Bianco A., Kostarelos K., Partidos C. D., Prato M.* Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes // *Chem. Commun.* – 2005. – V. 7, N 5. – P. 571-577.
4. *Liu Q., Chen B., Wang Q. et al.* Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells // *Nano Lett.* – 2009. – V. 9, N. 3. – P. 1007-1010.
5. *Lu G., Maragakis P., Kaxiras E.* Carbon nanotube interaction with DNA // *Nano Lett.* – 2005. – V. 5, N. 5. – P. 897-900.
6. *Singh R., Pantarotto D., McCarthy D. et al.* Binding and condensation of plasmid DNA onto carbon nanotubes // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – P. 4388-4396.
7. *Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Eklund P.C.* Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes. San Diego, etc: Acad. Press, 1996, 965 p.
8. *Liu Z., Tabakman S., Welsher K., Dai H.* Carbon nanotubes in biology and medicine // *Nano Res.* – 2009. – V. 2. – P. 85-120.
9. *Wu P., Chen X., Hu N. et al.* Biocompatible carbon nanotubes // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2008. – V. 47, N. 27. – P. 5022-5025.
10. *Niyogi S., Hamon M. A., Hu H. et al.* Chemistry of singlewalled carbon nanotubes // *Acc. Chem. Res.* – 2002. – V. 35. – P. 1105-1113.
11. *Rosca I. D., Watari F., Uo M., Akaska T.* Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid // *Carbon.* – 2005. – V. 43. – P. 3124-3131.
12. *Zheng M., Jagota A., Semke E. D. et al.* DNA assisted dispersion and separation of carbon nanotubes // *Nat. Mater.* – 2003. – V. 2. – P. 338-342.
13. *Nakashima N., Okuzono S., Murakami H. et al.* DNA dissolves single-walled carbon nanotubes in water // *Chem. Lett.* – 2003. – V. 32, N. 5. – P. 456-457.
14. *Dwyer C., Guthold M., Falvo M. et al.* DNA-functionalized single-walled carbon nanotubes // *Nanotechnology.* – 2002. – V. 13. – P. 601-604.
15. *Moon H. K., Chang C. I., Lee D. -K., Choi H. C.* Effect of nucleases on the cellular internalization of fluorescent labeled DNA-functionalized single-walled carbon nanotubes // *Nano Res* – 2008. – V. 1. – P. 351-360.
16. *Wu Y., Phillips J. A., Liu H.* Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery // *ACS Nano* – 2008. – V. 2, N. 10. – P. 2023-2028.
17. *Li X., Peng Y., Qu X.* Carbon nanotubes selective destabilization of duplex and triplex DNA // *Nucl. Ac. Res.* – 2006. – V. 34, N. 13. – P. 3670-3676.
18. *Johnson R. R., Johnson A. T. C., Klein M. L.* The nature of DNA-base-carbon-nanotube interactions // *Small* – 2010. – V. 6, N. 1. – P. 31-34.
19. *Mu Q., Broughton D. L., Yan B.* Endosomal leakage and nuclear translocation of MWCN // *Nano Lett.* – 2009. – V. 9, N. 12. – P. 4370-4375.
20. *Pogodin S., Baulin V. A.* Can a carbon nanotube pierce through a phospholipid bilayer? – 2010. - V. 4, N. 9. – P. 5293-5300.
21. *Serag M. F., Kaji N., Gaillard C. et al.* Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells // *ACS Nano.* – 2011. – V. 5, N. 1 – P. 493-499.
22. *Lin S., Reppert J., Hu Q. et al.* Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants // *Small* – 2009. - V. 5, N. 10. - P. 1128-1132.

23. *Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M. et al.* Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth // ACS Nano – 2009. - V. 3, N. 10. – P. 3221–3227.

24. *Rojas-Chapana J., Troszczynska J., Firkowska I. et al.* Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *E. coli* cells // Lab. Chip. – 2005. – V. 5. – P. 536–539.

25. *Gao L. Z., Nie L., Wang T. H. et al.* Carbon nanotube delivery of the GFP gene into mammalian cells // Chem. Bio. Chem. – 2006. – V. 7. – P. 239–242.

26. http://molbiol.ru/protocol/04_02.html

Резюме

Обговорюються передумови, переваги та перспективи застосування вуглецевих нанотрубок для розробки нових систем генетичної трансформації рослин. Описується отримання диспергованих у воді комплексів ДНК з багатостінними вуглецевими нанотрубками.

Обсуждаются предпосылки, преимущества и перспективы использования углеродных нанотрубок для разработки новых систем генетической трансформации растений. Описывается получение диспергированных в воде комплексов ДНК с многостенными углеродными нанотрубками.

The background, advantages and prospects of using carbon nanotubes for the development of novel plants' genetic transformation systems are discussed. Production of aqueous dispersion of multi-walled carbon nanotubes with DNA is described.

ВАГИНА И.Н.¹, АНОПРИЕНКО О.В.¹, ЗАХАРУК Е.А.¹, ХРАНОВСКАЯ Н.Н.², СКАЧКОВА О.В.², СТРОКОВСКАЯ Л.И.¹

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ, ул. Заболотного, 150;*

*2 Национальный институт рака, 03022, Киев, ул. Ломоносова, 33/43
e-mail: ira_vag@ukr.net*

ВЛИЯНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ, ТРАНДУЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БАКУЛОВИРУСОМ С ГЕНОМ *Ifn-β*, НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ МЫШИ *IN VITRO*

В стратегии противоопухолевой терапии в качестве “векторных клеток” используют как мезенхимальные стволовые клетки (МСК), так и зрелые фибробласты, имеющие мезенхимальное происхождение. Такие клетки осуществляют доставку терапевтического агента к опухоли и локально обеспечивают высокий уровень его экспрессии. В настоящее время также возрастает интерес к использованию фетальных фибробластов. Показано, что культивированные фетальные фибробласты влияют на заживление раневых поверхностей в результате их способности вырабатывать элементы межклеточного матрикса, секретировать факторы роста и другие митогены для паракринной регуляции [1]. Мышиные эмбриональные фибробласты использовали для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с последующей их дифференцировкой в натуральные киллеры (НК)

in vitro. Полученные НК демонстрировали противоопухолевый эффект, подавляя рост опухолей *in vivo* [2]. Фетальные фибробласты, являющиеся фетальными стволовыми клетками, обладают более широкими потенциями по сравнению с фибробластами взрослого организма, быстрее размножаются в культуре *in vitro* и также могут являться источником для получения “клеточных векторов”. Представленные нами ранее данные свидетельствуют об эффективности использования рекомбинантных бакуловирусов для переноса экзогенов в клетки млекопитающих [3]. В качестве активного вещества в противоопухолевой терапии активно исследуется β -интерферон (IFN- β). Известно, что IFN- β усиливает апоптоз опухолевых клеток, осуществляет торможение ангиогенеза в опухолевых тканях, снижает частоту метастазирования [4]. Однако, результаты многочисленных испытаний IFN- β в клинической практике показали, что он проявляет незначительную активность против опухолей человека, вероятно, вследствие невозможности достижения высокой концентрации интерферона в сыворотке крови пациентов из-за его токсичности, а также достаточно короткого периода “жизни” в организме [5]. Предварительно нами была проведена оценка эффективности трансдукции различных клеточных линий млекопитающих бакуловирусным вектором, несущим ген мышинового β -интерферона, при этом, отмечено снижение эффективности трансдукции во всех типах мышинных клеток и высказано предположение, что уменьшение эффективности трансдукции обусловлено активностью секретируемого интерферона. Для проверки возможного “антиопухолевого” эффекта “векторных клеток” *in vitro* в представленной работе исследовано влияние совместного культивирования фетальных фибробластов мыши (C57Fb), трансдуцированных бакуловирусным вектором (БВ) с геном мышинового β -интерферона, на пролиферацию злокачественных клеток меланомы мыши (ММ-4).

Материалы и методы

Клеточные культуры и вирусы. В работе использовали мышинные фетальные фибробласты линии C57BL/6j (C57Fb), полученные как описано ранее [3] и сублиния клеток меланомы мыши (B16) ММ4. Все линии клеток культивировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS (Sigma), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C в CO₂-инкубаторе.

Бакуловирусный вектор (БВ) нарабатывали в монослойной культуре клеток насекомых Sf21 как описано ранее [6].

Рекомбинантные бакуловирусы и трансдукция клеток млекопитающих.

Рекомбинантный бакуловирус получали на основе вируса ядерного полиэдроза *Autographa californica* (AcMNPV) в экспрессионной системе Vaco-Vac (Invitrogen). Был сконструирован бакуловирусный вектор Ac-CMV-IFN, содержащий ген мышинового β -*Ifn* под регуляцией промотора CMV. Вирус концентрировали центрифугированием при 100000g. Титр вирусных

препаратов после амплификации и концентрирования составлял $2-4 \times 10^8$ БОЕ (бляшкообразующих единиц)/мл. Трансдукцию проводили в оптимизированных нами предварительно условиях [7]. Рекомбинантный бакуловирус добавляли в концентрации 200 moi (multiplicity of infection = количество БОЕ на клетку).

Окрашивание мышинных фетальных фибробластов (C57Fb) флуоресцентным красителем CFDA SE и их совместное культивирование с клетками меланомы (ММ-4). Для разделения различных со-культивированных клеточных популяций использовали окрашивание мышинных фетальных фибробластов C57Fb витальным красителем CFDA SE (5-,6-карбоксифлуоресцеиндиацетат-сукцинилмидил эфир) с последующим анализом образцов на проточном цитофлуориметре. Предварительно была проведена оптимизация метода окраски клеток. Варьировали раствор для окраски (PBS+сыворотка, DMEM), температуру (37°C , комнатная) и концентрацию красителя (2,5мкм, 5мкм, 10мкм). Фибробласты высевали на лунки 6-луночной плашки в концентрации 2×10^5 клеток на лунку. Через 2 дня клетки снимали трипсинизацией и центрифугировали 5 минут со скоростью 1 тыс. об./мин. Отмывали в PBS и ресуспендировали в растворе для окраски с определенной концентрацией красителя на протяжении 10 минут в разных условиях. На 5 сутки клетки анализировали на проточном цитофлуориметре. Выяснили, что наиболее эффективное мечение клеток, позволяющее на 5 сутки разделить субпопуляции меченых и немеченых клеток, наблюдается при использовании красителя CFDA SE в концентрации 10мкм в растворе PBS + 1% сыворотки (FBS) при комнатной температуре.

Общая схема эксперимента по со-культивированию заключалась в следующем:

Фетальные фибробласты C57Fb, трансдуцированные БВ-вектором Ac-CMV-IFN, через 48 часов после трансдукции снимали с лунки и окрашивали CFDA SE. Затем их смешивали в соотношении 1:10 (C57Fb:ММ4) с клетками меланомы мыши и высаживали на лунку 6-луночной плашки в концентрации (2×10^4 : 2×10^5). В контроле (для выявления взаимовлияния разных субпопуляций клеток *in vitro*) фетальные фибробласты C57Fb также метили красителем CFDA SE и смешивали с клетками меланомы в тех же пропорции и количестве, что и в опытных образцах. Также в качестве контроля использовали клетки меланомы (ММ-4) культивируемые отдельно, их высевали в концентрации 2×10^5 клеток на лунку. Во всех указанных вариантах клетки культивировали в течение 5 суток в стандартных условиях, снимали обработкой раствором трипсина с EDTA, ресуспендировали в PBS. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева на 0 и на 5 сутки. Затем на флуоресцентном цитофлуориметре определяли процентное содержание клеток каждой субпопуляции на 0 и 5 сутки в опытных и контрольных образцах, что позволяло рассчитать количество клеток каждой субпопуляции.

Проточная цитофлуориметрия. Оценку процентного содержания клеток разных популяций в совместной культуре проводили с использованием цитофлуориметра Coulter Epics XL. Подготовку клеток осуществляли как описано ранее [7]. Клетки меченые CFDA SE определяли на канале детекции FL1 (505-545 нм). Для отделения мертвых клеток и клеточного дебриса общую популяцию гейтировали по параметрам FS (Forward Scatter) и SS (Side Scatter). Мертвые клетки определяли по окрашиванию пропидиум йодидом (PI) (FL2 канал – 575 нм). Для каждого образца анализировали 10000 событий.

Результаты и обсуждение

Для оценки возможного ингибирующего влияния β -интерферона, который продуцировался фетальными фибробластами мыши, на пролиферацию опухолевых клеток меланомы (MM4) было проведено совместное культивирование этих клеток *in vitro* в соотношении 1:10 (C57Fb:MM4).

Экспрессия мышинового $\text{Ifn-}\beta$ в клетках C57Fb происходила в результате трансдукции рекомбинантным бакуловирусным вектором Ac-CMV-IFN. Ранее нами было показано, что уровень трансдукции мышинных фибробластов бакуловирусными векторами для оптимальной дозы 200 μmol составляет в среднем 60% [7]. Максимальный уровень экспрессии белка наблюдался через 48 часов. Так как $\text{IFN-}\beta$ относится к секретируемым белкам, был проведен анализ супернатанта трансдуцированных фетальных фибробластов ($\text{Ifn}\beta$ -C57Fb) для определения уровня биологической активности мышинового $\text{Ifn-}\beta$. По предварительным данным он составлял 1×10^6 IU/ml. Влияние β -интерферона, продуцируемого фетальными фибробластами, на опухолевые клетки (MM4) определяли на 5 сутки. Для этого подсчитывали количество клеток в опытных и контрольных образцах, а затем анализировали их на проточном цитофлуориметре (Рис. 1).

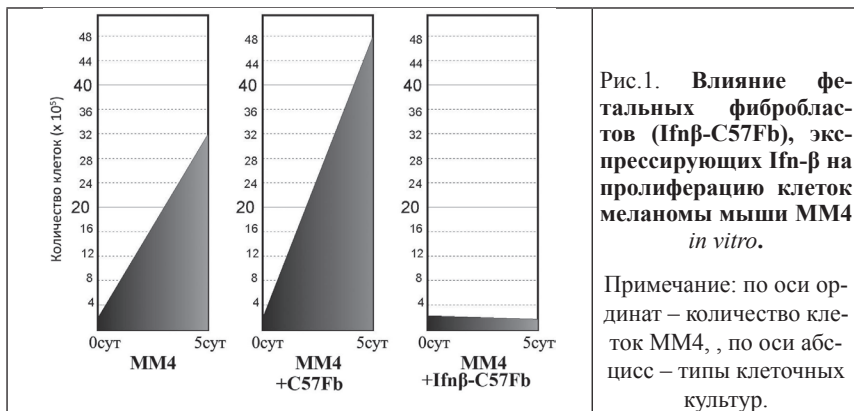


Рис.1. Влияние фетальных фибробластов ($\text{Ifn}\beta$ -C57Fb), экспрессирующих $\text{Ifn-}\beta$ на пролиферацию клеток меланомы мыши MM4 *in vitro*.

Примечание: по оси ординат – количество клеток MM4, по оси абсцисс – типы клеточных культур.

Выявлено, что при со-культивировании клеток меланомы мыши ММ4 с трансдуцированными фетальными фибробластами (Ifn β -C57Fb) наблюдается ингибирование роста опухолевых клеток ММ4 по сравнению с контрольными клетками меланомы ($1,4 \times 10^5$ клеток/мл в эксперименте и 3×10^6 клеток/мл в контроле). А в случае со-культивирования этих клеток (ММ4) с нетрансдуцированными фибробластами C57Fb происходит некоторая стимуляция роста опухолевых клеток ($4,6 \times 10^6$ клеток/мл в эксперименте по сравнению с 3×10^6 клеток/мл в контроле). Таким образом, Ifn- β , который синтезируется клетками фетальных фибробластов (Ifn β -C57Fb) ингибирует пролиферацию опухолевых клеток ММ4 *in vitro*.

Плейотропный эффект интерферонов I типа – IFN- α и IFN- β - включает ингибирование роста опухолевых клеток, стимуляцию иммунной системы, подавление процессов ангиогенеза. Доставка интерферона к опухоли с помощью мезенхимальных стволовых клеток призвана обойти проблему токсичности терапевтических доз IFN- β . В ряде модельных экспериментов был продемонстрирован потенциальный противоопухолевый эффект такого подхода. Однако в некоторых работах была показана способность МСК оказывать стимулирующее воздействие на опухолевые клетки [8]. При изучении взаимодействия стромальных фибробластов с опухолевыми клетками был выделен интерферон-индуцируемый фактор, стимулирующий инвазивные свойства опухолевых клеток [9]. Его вклад в потенциальный противоопухолевый эффект, оказываемый “векторными клетками”, продуцирующими терапевтический IFN- β , еще предстоит выяснить. Целый ряд параметров, таких как эффективное количество клеток, соотношение опухолевых и модельных “векторных клеток”, способ продуцирования терапевтического фактора, эффект взаимовлияния “векторных клеток” и противоопухолевого агента еще не изучены в достаточной мере. Необходимо продолжить работу по созданию эффективной модели для оценки воздействия “векторных клеток” на опухолевые как *in vitro*, так и *in vivo*.

Литература

1. Попандоупо А.Г., Корчак О.М., Трунова О.А., Зубов Д.А., Разенкова И.А. К вопросу об обосновании применения культивированных фетальных фибробластов человека в комплексном лечении хронических мезенхимальных дефектов // Архив клинической и экспериментальной медицины – 2004 – т.13, №1 – С. 55-61.
2. Watarai H., Fujii S., Yamada D., et al. Murine induced pluripotent stem cells can be derived from and differentiate into natural killer T cells // J. Clin. Invest. – 2010 – V.120, №7. – P. 2610-2618.
3. Аноприенко О.В., Вагина И.Н., Захарук Е.А., Строковская Л.И., Соломко А.П. Бакуловирусные векторы Ас-Сmv-Gfp, Ас-М-Gfp и Ас-Ifn-Gfp для эффективного переноса генов в клетки млекопитающих // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів – 2010 – Т. 8., № 1. – С. 3 – 9.
4. Zhang F., Lu W., Dong Zh. Tumor-infiltrating macrophages are involved in suppressing growth and metastasis of human prostate cancer cells by IFN- β gene therapy in nude mice // Clinical Cancer Research – 2002. – V.8. – P.2942-2951.

5. *Studený M., Marini F.C., Dembinski J.L., et al* Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2004 – V.96. – P.1593-603.

6. *King L.A., Possee R.D.* The baculovirus expression system. A laboratory guide // London: Chapman and Hall, 1992. – p220.

7. *Вагина И.Н., Аноприенко О.В., Захарук Е. А., Строковская Л.И., Соломко А.П.* Эффективность доставки генов бакуловирусами в клетки млекопитающих *in vitro* // *Biopolymers and cell* – 2008 – т. 24, №6 – С. 508-512.

8. *Klopp A.H., Gupta A., Spaeth E., Andreeff M., Marini F.* 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? // *Stem Cells* – 2011 – V.29, №1. – P. 11-9.

9. *de Neergaard M., Kim J., Villadsen R., et al.* Epithelial-stromal interaction 1 (EP-ST11) substitutes for peritumoral fibroblasts in the tumor microenvironment. // *Am. J. Pathol.* – 2010 – V. 176 – P.1229-1240.

Резюме

Оптимизирован метод оценки влияния векторных фибробластных клеток, трансдуцированных рекомбинантными бакуловирусами, на опухолевые клетки. Установлено ингибирующее воздействие фетальных фибробластов (C57Fb), продуцирующих β-интерферон, на рост злокачественных клеток меланомы мыши.

Оптимізовано метод оцінки впливу векторних фібробластних клітин, трансдукованих рекомбінантними бакуловірусами, на злоякісні клітини. Встановлена інгібуюча дія фетальних фібробластів (C57Fb), що продукують β-інтерферон, на ріст злоякісних клітин меланоми миші.

The method for estimating the influence of vector fibroblast cells transduced by recombinant baculoviruses on tumor cells has been optimized. Inhibition of malignant mouse melanoma cells proliferation by fetal fibroblasts producing mouse β-interferon has been demonstrated.

ВЕРЖУК В.Г., ПАВЛОВ А.В., НОВИКОВА Л.Ю., ОРЛОВА С.Ю.

Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им.

Н.И.Вавилова, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44, E-mail:

vverzhuk@mail. Ru

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ПОБЕГОВ И ПОЧЕК ЧЕРЕМУХИ (*PADUS MILL.*) С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ И РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ

Известно, что генетическое биоразнообразие растений является национальным достоянием и стратегическим сырьем любой страны, где они произрастают. Однако в последние 20-30 лет, под воздействием климатических, экологических и антропогенных факторов, где губительное действие человека выражено очень существенно, ареалы распространения культурных и диких видов растений сильно сократилось. Предотвратить такое исчезновение можно путем создания заказников, ботанических садов, генетических банков растений и таким способом сохранить исчезающий вид,

сорт, растение, хотя это довольно дорогостоящее мероприятие. В настоящее время существует перспективный и сравнительно дешевый способ сохранения геноплазмы растений – это криоконсервация ее в жидком азоте при -196°C или его парах (Вержук и др., 2010). Кроме криосохранения черенков были проведены исследования по сохранению вегетативных почек черемухи, отделенных от древесных тканей и обработанных перед замораживанием криопротекторами различной концентрации. Здесь преследовалась цель получения живых растений из замороженных почек, обработанных криопротекторами и выращенных в условиях *in vitro*. Положительное влияние криопротекторов состоит в том, что криозащитные вещества не только уменьшают размеры кристаллов льда в растительных тканях, а также их количество, но и снижают токсические и другие вредные эффекты обезвоживания (Попов, 2008). Известно, что одна молекула сахараозы связывает 4 молекулы воды, уменьшая тем самым количество воды, способной кристаллизоваться (Самыгин, 1974). Также следует отметить, что при изучении по каждой культуре необходимо индивидуально подбирать условия замораживания, температурный режим и меры вывода из состояния глубокого покоя (Вержук, Павлов, 2010).

Материалы и методы

В наших исследованиях для криоконсервации вегетативных побегов и почек черемухи служили образцы сортов рода *Padus* Mill. селекции Центрального Ботанического сада г. Новосибирска, выращенные в коллекционном саду Павловской опытной станции ВИР (г.Павловск). Объектом криоконсервации являлись черенки нарезанные в декабре месяце (растения в это время находились в состоянии глубокого покоя) длиной 6-8 см с 2-3 почками. Перед закладкой на хранение черенки подсушивали три-четыре недели при -5°C в холодильнике фирмы «HUURRE» до влажности 28-35% и замораживали их методом программного замораживания сперва до -30°C с начальной скоростью $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, затем до -90°C , увеличив скорость до $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и без обработки криопротекторами погружали в пары жидкого азота (-183°C - -185°C). После 6 месяцев хранения черенки размораживали на водяной бане при 20°C - 22°C , проверяли их жизнеспособность и проводили весеннюю прививку на взрослых деревьях в саду. При исследовании вопроса о влиянии различных криопротекторов на сохраняемость отделенных от древесины почек, мы применяли такие проникающие в клетки почек протекторы, как: 25% и 40%-ый глицерин и 25% и 40%-ю сахарозу. Почки черемухи помещали в криопробирки, заливали и выдерживали в криопротекторах 1 час при 20°C , затем замораживали до $48-50^{\circ}\text{C}$ в замораживателе фирмы «Sanyo Medikal Freeser – модель MDF-U442(T)» и помещали на хранение в пары жидкого азота. После 4-х недельного хранения почки размораживали на водяной бане при $20-22^{\circ}\text{C}$, отмывали в воде от криопротекторов и определяли их жизнеспособность, проращивая на питательной среде (MS) с добавлением ростовых гормонов (БАП, 1 мг/л).

Результаты и обсуждение

Результаты анализа проведенных исследований показали, что приживаемость черенков взятого набора сортов после криосохранения на взрослых деревьях составляла до 50-60%. Кроме этого, часть черенков, сохраняемых в азоте, после размораживания мы высадили весной непосредственно в почву. Данные по жизнеспособности черенков после проращивания их в полевых условиях приведены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты проращивания черенков черемухи, после криоконсервации, в полевых условиях

№ п/п	Сорт	№ каталога	Высажено черенков, шт.	Процент приживания, %	Высота растений, см	Количество корней, шт.	Длина корней, см	Число междоузлий, шт
1	Ольгина радость	42105	12	-	-	-	-	-
2	Августина	42101	15	13,3	1,8	7,5	10,5	2
3	Сахалинская устойчивая	42287	12	33,3	5,4	11,5	15,7	4,5
4	Гранатовая гроздь	42102	11	45,5	6,9	6,4	11,0	6,3
5	Ранняя круглая	42109	13	23,1	3,7	11,7	16,7	2,7

По результатам данных показано, что в зависимости от сорта процент жизнеспособности размороженных черенков в почве составил от 13,3% до 45,5%. Выжившие черенки к осени образовали корневую систему и благополучно перенесли снежную и морозную зиму 2010 года, а за вегетационный летний период сформировали вызревшие побеги.

Анализ почек черемухи, обработанных криопротекторами, показал различные результаты после проращивания их на питательной среде. У сорта Августина, обработанного 25%-м раствором сахарозы процент выживших почек был незначительный – 18-20%, а при обработке 25%-м раствором глицерина жизнеспособность почек увеличилась до 65-70% и дальше они хорошо развивались. Применение криопротекторов, содержащих различные концентрации глицерина и сахарозы показало, что более высокий процент живых вегетирующих почек наблюдался у сортов Ольгина радость и Гранатовая гроздь.

В представленных таблицах 2 и 3 показано, что при обработке различными вариантами таких криопротекторов, жизнеспособность почек этих сортов составляла от 47,4% до 70,6-87,5%. Ольгина радость и Гранатовая гроздь показали примерно одинаковую среднюю выживаемость

(63%) (уровень значимости различий средних $p=0,820$). Для сорта Ольгина радость различия между выживаемостью на сахарозе и глицерине незначимы ($p=0,829$). Для сорта Гранатовая гроздь достоверно лучшими оказались протекторы с сахарозой (уровень значимости различий по t -критерию $p=0,005$), средняя выживаемость на сахарозе составила $81.3 \pm 7.0\%$, на глицерине $48.6 \pm 5.9\%$.

Таблица 2

Влияние криопротекторов на жизнеспособность почек черемухи сорта Ольгина радость после хранения в парах жидкого азота(-183-185°C).

Варианты применяемых криопротекторов	Количество почек, обработанных криопротекторами (всего и жизнеспособных после хранения в парах жидкого азота		Жизнеспособность почек в %
	всего	жизнеспособных	
25% раствор сахарозы	14	9	64.3 ± 13.3
40% раствор сахарозы	14	8	57.1 ± 13.7
25% раствор глицерина	17	12	70.6 ± 11.4
40% раствор глицерина	16	9	56.3 ± 12.8

Таблица 3

Влияние криопротекторов на жизнеспособность почек черемухи сорта Гранатовая гроздь после хранения в парах жидкого азота(-183-185°C).

Варианты применяемых криопротекторов	Количество почек, обработанных криопротекторами (всего и жизнеспособных после хранения в парах жидкого азота		Жизнеспособность почек в %
	всего	жизнеспособных	
25% раствор сахарозы	16	12	75.0 ± 11.2
40% раствор сахарозы	16	14	87.5 ± 8.5
25% раствор глицерина	16	8	50.0 ± 12.9
40% раствор глицерина	19	9	47.4 ± 11.8

Применение непроникающих криопротекторов в клетки почек, например раствор агар-агара, выявило их низкую жизнеспособность, всего 15,0%.

Выводы

В заключении следует отметить, что проведение обработки почек различными по составу криопротекторами, позволяет получать живые почки после размораживания и проращивания на свету. Большое внимание здесь должно уделяться при подборе состава и концентрации криопротекторов, а выращенные из почек растения на культуральной среде MS позволяют говорить о получении чистого растительного материала, свободного от различных болезней и вирусов.

Литература

1. *Вержук В.Г., Тихонова Н.Г., Савельев Н.И., Дорохов Д.С.* Методы криохранения геноплазмы растений плодовых и ягодных культур. Международная научно-

практическая конференция «Развитие научного наследия И.В.Мичурина по генетике и селекции плодовых культур». Мичуринск-Наукоград, 2010, С.80-83.

2. Попов А.С. Крриоконсервация культивируемых клеток. Методы культивирования клеток. Санкт-Петербург, 2008, С. 236-250.

3. Самыгин Г.А. Причины вымерзания растений. М., Наука, 1974, 341 с.

4. Вержук В.Г., Павлов А.В. Влияние криопротекторов на сохранение вегетативных почек черемухи (Padus Mill.). Материалы IX Международной конференции «Интродукция нетрадиционных и редких растений». Мичуринск-Наукоград, 2010, С.287-288.

Резюме

Проведена крриоконсервация вегетативных побегов и почек черемухи обыкновенной, обработанных перед замораживанием криопротекторами. Жизнеспособность побегов черемухи, привитых на ветви деревьев после крриоконсервации, составила 50%-60%, у высаженных в поле жизнеспособность составила от 13,3% до 45,5%; у обработанных криопротекторами почек черемухи – она составила *in vitro* от 47,4% до 87,5%.

The cryopreservation of vegetative shoots and buds of a bird cherry, processed before freezing cryoprotectors is spent. Viability of shoots of the bird cherry grafted on a branches of trees after a cryopreservation, has made 50 %-60 %. At the shoots of a bird cherry landed in the field after a cryopreservation viability has made from 13,3 % to 45,5 %, at processed cryoprotectors bird cherry buds – it has made *in vitro* from 47,4 % to 87,5 %.

ГОНЧАРУК О.М., БАВОЛ А.В., ДУБРОВНА О.В.

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

МОРФОГЕНЕТИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ В КУЛЬТУРІ АПКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПАГОНІВ

На сьогодні біотехнологічні методи широко використовуються для вирішення прикладних задач селекції цінних сільськогосподарських культур і, зокрема, пшениці [1,2]. Одержання морфогенного калосу і наступна регенерація рослин – невід’ємна частина багатьох біотехнологій цієї культури. Проте для пшениці досі актуальною залишається проблема реалізації морфогенетичного потенціалу культивованих клітин та розробка шляхів його підвищення. Основні напрямки вирішення даної задачі базуються на використанні таких підходів, як оптимізація умов культивування та живильних середовищ [3,4], застосування різних типів експлантів [5-7] та скринінг нових генотипів [8,9]. Тому пошук генотипів, які поряд з господарсько-цінними характеристиками також мають високий морфогенний потенціал вельми актуальні.

Згідно сучасних уявлень, на процеси калусогенезу та утворення пагонів в культурі *in vitro* пшениці, крім генотипу, також значно впливає тип

експланта [10-12]. Проте досі не вирішена проблема його надійності, доступності в будь-який момент часу та здатності до утворення калюсу з високим регенераційним потенціалом, який зберігає морфогенну активність достатньо тривалий час. Традиційним типом експланта для злакових, і зокрема пшениці, є незрілі зародки [2,8,9], проте їх використання має ряд обмежень, оскільки вони доступні досить короткий час протягом вегетаційного періоду. Ця обставина змусила дослідників шукати альтернативні типи експлантів в якості яких використовували: зрілі зародки або їх частини [4,7,10], незрілі суцвіття [3,6,12], сегменти колеоптиля, мезокотиля та молодих листків [5,6,13]. Останнім часом значно зріс інтерес до апікальних меристем як перспективних експлантів для злакових культур [14-17]. Очевидною перевагою при цьому є можливість подолання генотипічних особливостей культивованих форм, що характеризуються низьким регенераційним потенціалом, а також можливість отримання значної кількості вихідного матеріалу за короткий час у будь-який період року.

У зв'язку з цим, метою нашої роботи було дослідження особливостей процесів калюсогенезу та регенерації пагонів у культурі апікальних меристем пагонів високопродуктивних сортів озимої пшениці. Ці сорти на оптимальному фоні мінерального живлення забезпечують отримання високих та якісних урожаїв.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень було 14 високопродуктивних сортів озимої м'якої пшениці серед яких високоінтенсивні – Смуглянка, Володарка, Достаток, Золотококоса, Колумбія, Славна, Фаворитка, Чорнява; інтенсивні – Богдана, Вінничанка, Подольянка, Переяславка, Снігурка, Ятрань 60 отримані у відділі експериментального мутагенезу ІФРГ НАН України. В якості експлантів використовували апікальну меристему пагона 3-добових стерильних проростків. Розмір експлантів варіював у межах 1,2 – 2,0 мм.

Для отримання донорних рослин насіння стерилізували 3%-вим розчином NaOCl протягом 15 хв, чотири рази відмивали стерильною дистильованою водою і пророщували на світлі при 24 °C на безгормональному середовищі МС [14] 3 доби. Культуру калюсної тканини отримували на середовищі МС, яке додатково містило L-аспарагін -150 мг/л, AgNO₃ – 10 мг/л та 2мг/л 2,4-Д. Експланти культивували при 26 °C в темряві протягом двох – трьох тижнів. Потім їх переносили на світло і далі вирощували при освітленні 3-4 клк, відносній вологості повітря 70 % і 16-годинному фотоперіоді, ще протягом двох тижнів. Сформовані таким чином калюси для регенерації переносили на середовище МС, яке додатково містило 1мг/л БАП, 0,5 мг/л ІОК та 10 мг/л AgNO₃. Отримані пагони по мірі розвитку переносили на безгормональне середовище МС з половинним вмістом макросолей для укорінення. Укорінені регенеранти пересаджували в стерильний пісок і поміщали у вологу камеру на 7-14 діб. Добре укорінені рослини переносили у ґрунт.

Частоту індукції калюсу та регенерації рослин (у відсотках) визначали як співвідношення числа експлантів, які утворили калюс або рослини-регенеранти, до загального числа експлантів.

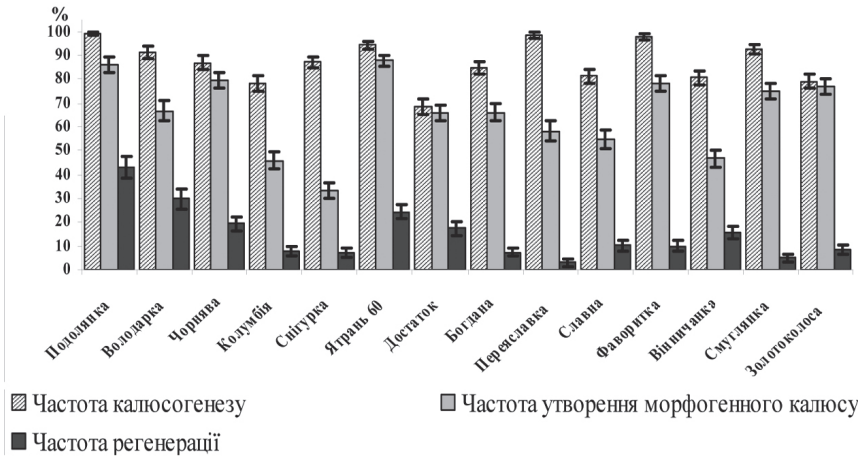
Результати та обговорення

Нами показано, що досліджувані сорти м'якої пшениці в культурі апікальних меристем пагонів характеризуються високою здатністю до індукції калюсу, яка варіює від 68,6±3,4% (Достаток) до 99,1±0,9% (Подолянка) (табл.). Початок калюсоутворення у наших дослідах спостерігали вже на третю – четверту добу. Утворювався прозорий світлий калюс аморфної консистенції. Після 3-4 тижнів культивування було виявлено два типи калюсу, які розрізняли за морфологічними властивостями: морфогенний калюс – щільний, жовтуватий, глобулярний, який виявився здатним на середовищі для регенерації давати початок розвитку морфогенним структурам та неморфогенний калюс – пухкий, водянистий, прозорий. Усі вивчені генотипи утворювали морфогенний калюс, однак з різною частотою. Найбільша частота його утворення виявлена у сортів Ятрань 60 та Подолянка – відповідно 87,8 та 86,1 відсоток відповідно. Найменшою частотою утворення морфогенного калюсу характеризувалися сорти: Снігурка. Вінничанка, Колумбія – від 33 до 46%.

Після перенесення на регенераційне середовище в калюсах спостерігали утворення щільних зелених або світло-жовтих глобулярних ділянок. Такі калюси відносили до ембріогенних. При подальшому культивуванні формування регенерантів відмічено з глобулярних ділянок, в той час як на щільних зелених ділянках відбувався інтенсивний ризогенез.

На 5-10 добу культивування на регенераційному середовищі в калюсах відмічені наступні шляхи морфогенезу: органогенез по типу гемморизогенезу (формування бруньки та кореня), ризогенез (формування кореня) та соматичний ембріогенез – формування соматичних зародків. Важливо підкреслити, що соматический ембріогенез біотехнологічно оптимальніший, оскільки в даному випадку в рослину проростає зародок з усіма сформованими органами. Максимальна частота утворення соматичних зародків відмічена на 20-25 добу культивування, гемморизогенних структур – на 25 добу.

Зазначимо, що регенерація пагонів відмічалася у всіх досліджуваних генотипів. Найбільшою частотою регенерації характеризувалися наступні сорти: Подолянка, Володарка та Ятрань 60. Частота утворення пагонів у цих сортів в культурі апікальних меристем варіювала від 25 до 43 %. Розвиток рослин-регенерантів йшов подібно з розвитком донорних рослин пшениці в природних умовах *in vivo*. Відзначалися типові фенофази сходів, третього листа, кушіння. Рослини-регенеранти у фенофазі кушіння переносили в умови *ex vitro* у горщики зі спеціально підбраною ґрунтовою сумішшю.



Таким чином, висока частота калусоутворення, що спостерігається в наших дослідях в культурі апікальних меристем і значні розходження між генотипами за частотою регенерації рослин підтверджують існування різних генетичних систем регуляції цих процесів. Частота регенерації з калусів, отриманих з апікальної меристеми проростків, певною мірою може задовольнити потреби сучасної біотехнології даної культури. Хоча регенераційний потенціал цього типу експланта нижчий порівняно з незрілими зародками, його доступність в будь-яку пору року і за короткий проміжок часу є перспективним для отримання рослин-регенерантів пшениці.

На основі проведених досліджень можна зробити висновок, що серед проаналізованих генотипів найбільшою частотою регенерації характеризувалися наступні сорти: Подолянка, Ятрань 60 та Володарка. Саме ці сорти найбільш доцільно використовувати для покращення існуючих високопродуктивних сортів за допомогою біотехнологічних методів, зокрема генної інженерії та клітинної селекції.

Література

1. Patnaik D., Khurana P. Wheat Biotechnology: A minireview plant biotechnology // Electronic J. Biotech. –2001. –v.4. –P. 74-102.
2. Волощук С.І., Волощук Г.Д., Гірко В.С. Створення вихідного матеріалу озимої пшениці, стійкого до грибних патогенів методами клітинної селекції // Захист рослин.-1998.- №8.- С. 4-5.
3. Barro F., Martin A., Lazzeri P., Barcel P. Medium optimization for efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from immature inflorescences and immature scutella of elite cultivars of wheat, barley and tritordeum // Euphytica.- 1999.- **108**, №3.- P.- 161-167.
4. Mendoza M., Kaeppler H. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.) // In Vitro Cellular and Development Biology – Plant.-2002.- **38**, N. 1.- P. 39-45.

5. Wang C., Wei Z. Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum*) leaf base // Plant Cell, Tissue and Organ Culture.-2004.- v.77,n 2.- P. 149-156.

6. Benkirane H., Sabounji K., Chlyah A., Chlyah H. Somatic embryogenesis and plant regeneration from fragments of immature inflorescences and coleoptiles of durum wheat // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2000.- v. 61.- P.107–113.

7. Delporte F., Mostadel O., Jacquemin J. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat // Plant Cell, Tissue and Organ Culture.- 2001.- v.67, N2. – P.73-80.

8. Machii H., Mizuno H., Hirabayashi T., Li H, Hagio T. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability from anther and immature embryo cultures // Plant Cell, Tissue and Organ Culture.-1998.-v. 53, N. 1.- P. 67-74.

9. Fennel S., Bohorova N., Ginkel M., Crossa J., Hoisington D. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats // Theor. and Appl. Genet.-1996.- v.92.- P.163-169.

10. Ozgen, M., Turet, M., Ozcan, S., Sancak C. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes // Plant Breed. – 1996.- v.115. – P. 455-458

11. Sharma V. K. R. Hänsch R., Mendel R., Schulze J. Node-derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat // Plant Cell, Tissue and Organ Culture 2007.- v. 88, N1.- P. 21-33.

12. Sharma V., Rao A, Varshney A., Kothari S. Comparison of developmental stages of inflorescence for high frequency plant regeneration in *Triticum aestivum* L. and *Triticum durum* L.Desf. // Plant Cell Report.- 1995.- N5.- P. 227-231.

13. Haliloglu K. Efficient regeneration system from wheat leaf base segments // Biologia Plantarum.-2006.-v. 50, N3.- P. 326-330.

14. Ahmad A., Zhong H., Wang, W., Sticklen M. Shoot apical meristem: *In vitro* regeneration and morphogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *In vitro* cellular and development biology.- 2002.- v.38, № 2.- P

15. Zhang S., Zhang H., Sticklen H. B. Production of multiple shoot from shoot apical meristems of oat (*Avena sativa* L.) // Journal of Plant Physiology. – 1996.- v.148, N 6. –P. 667-671.

16. Sharma V, Hänsch R, Mendel R, Schulze J. A highly efficient plant regeneration system through multiple shoot differentiation from commercial cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) using meristematic shoot segments excised from germinated mature embryos// Plant Cell Rep.- 2004.-v. 23.- P. 9–16.

17. Viertel K, Hess D Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures // Plant Cell Tissue Organ Cult.-1996.-v. 44.- P. 183–188.

18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiол. Plant. – 1962. – v.15. – P.473-479.

Резюме

Досліджено процеси калюсогенезу та регенерації пагонів в культурі апікальних меристем 3-добових проростків високопродуктивних сортів м'якої пшениці озимого типу. У вивчених форм відмічено генотипову залежність процесів утворення пагонів в культурі *in vitro*. Серед проаналізованих генотипів найбільший морфогенетичний потенціал мають сорти : Подолянка, Ятрань 60, Володарка та Чорнява.

Изучены процессы каллюсогенеза и регенерации побегов в культуре апикальных меристем 3-суточных проростков высокопродуктивных сортов мягкой пшеницы озимого типа. У изученных форм отмечено генотипическую зависимость процессов образования побегов в культуре *in vitro*. Среди проанализированных генотипов наибольший морфогенетический потенциал имеют сорта : Подолянка, Ятрань 60, Володарка та Чорнява.

The processes of callus induction and shoots regeneration in culture of apical meristems of 3-day seedlings of high-yielding varieties of winter wheat type were studied. At studied forms were observed genotypic dependence of the formation of shoots in culture *in vitro*. Among the analyzed genotypes, the greatest morphogenetic capacity has sort:s Podolyanka, Yatran 60 and Volodarka

ГУЗЕНКО Е.В., ЛЕМЕШ В.А.

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: E.Guzenko@igc.bas-net.by

РИЗОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* У СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА И ЛЬНА МАСЛИЧНОГО (*LINUM USITATISSIMUM L.*)

Известные на сегодняшний день протоколы ведения культуры *in vitro* позволяют достаточно легко получать каллусную ткань и регенерировать побеги как у льна-долгунца, так и у льна масличного. Однако корнеобразование (ризогенез) и последующая адаптация к почвенным условиям до сих пор остаются трудно выполнимыми этапами из-за низкой адаптационной способности регенерантов данной культуры, что снижает эффективность биотехнологических методов. Трудности на этом этапе напрямую связаны с рядом анатомических и физиологических особенностей растений-регенерантов, которые они приобретают в условиях роста *in vitro*, формируя специфический культуральный фенотип. Данный фенотип определяется особенностями листьев растений-регенерантов, а также особенностями их корневой системы. Происхождение и структура формирующихся на микро-черенках корней играет важную роль в адаптации *ex vitro*.

Нами разработана методика получения корней у растений-регенерантов льна путем создания определенных условий культивирования *in vitro*, стимулирующих ризогенез без образования каллуса [1].

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали 3 сорта льна-долгунца белорусской селекции (Василек, Прамень, Старт) и 3 сорта льна масличного (Lola (Чехия), Shaphir (Польша), Linota (США)). Эксплантами служили гипокотили 7-суточных проростков длиной 3 – 5 мм. Стерилизованные семена проращивали на агаре (8 г/л) при 23⁰ С и 16-ти часовом фотопериоде. Для индукции морфогенеза использовали среду MS 5524 дополненную фитогормонам (1 мг/л ВАР (6-Benzyl-aminopurine), 0,05 мг/л NAA (α -Naphthalene-acetic acid)), pH 5,7-5,8. Гипокотили инкубировали при тем-

пературе 23⁰ С и 16-ти часовом фотопериоде. Регенерированные побеги длиной не менее 2 см укореняли на безгормональной среде MS 0404, содержащей половинный набор макроэлементов и витаминов, а также агар (7 г/л) и сахарозу (10 г/л), рН 5,7-5,8.

Результаты и обсуждение

В широко используемых методах для получения корней у растений-регенерантов льна меняют основной состав среды, уменьшая в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей по рецепту Murashige and Skoog [2, 3] или заменяют ее средой F.White, уменьшают количество сахаров до 0,5—1% и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин [4]. В качестве стимулятора корнеобразования применяют β-индолил-3-масляную кислоту, β-индолил-уксусную кислоту [5] или β-нафтил-уксусную кислоту [5, 6]. Несмотря на варьирование состава сред способ получения корней у регенерированных побегов льна во всех методах одинаков: побеги длиной 2-2,5 см отделяют от каллуса и заглубляют в выбранной среде так, чтобы побег сохранял вертикальное положение. В течение довольно длительного промежутка времени (1 – 2 месяца) формируются корни. Эффективность ризогенеза достаточно низкая – 10-20% [7, 8]. Традиционный способ имеет существенные недостатки. При долгом культивировании растительных тканей на питательных средах происходит постепенное накопление веществ токсического действия (фенольные соединения), что приводит к формированию растений с измененной морфологией [9]. Возможно накопление этилена, вызывающего эпинастию и хлороз [9, 10]. Вместе с тем наблюдаются такие нежелательные эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование витрифицированных (оводненных) побегов и, как следствие, уменьшение способности растений к укоренению.

Мы разработали и использовали для последующего выращивания следующий способ стимулирования корнеобразования у растений-регенерантов льна. Регенерировавшие побеги длиной более 2 см переносили на среду для ризогенеза (MS с половинным набором макро- и микроэлементов, витаминов; агар (7 г/л); сахарозой (10 г/л), рН 5,7-5,8), при этом побеги льна не заглублялись в питательную среду, а культивировались на границе – питательная среда/воздух. Ризогенез у контрольных растений проходил при культивировании на среде аналогичного состава традиционным способом (побеги заглубляли).

При культивировании регенерантов без заглубления формирование корней проходило более эффективно и в короткие сроки, без образования каллуса, отмечалось формирование корней второго порядка и корневых волосков.

На гистограммах представлены данные наблюдений за процессом ризогенеза у растений-регенерантов трех сортов льна-долгунца и трех сортов

льна масличного. Каждый символ обозначает побег, давший корень (рисунки 1, 2).

Основной промежуток времени образования корней для исследованных генотипов льна-долгунца составил 12 дней и наблюдался на 7 – 18 сутки. Самый длительный период ризогенеза отмечен у сорта Прамень: 6 – 24 сутки.

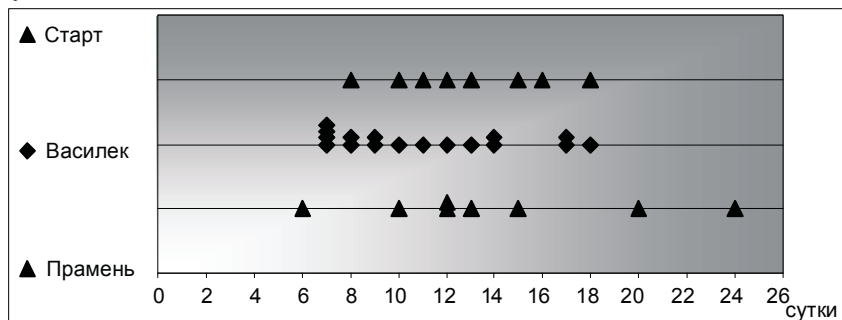


Рис.1. Сроки формирования корней у растений-регенерантов сортов льна-долгунца, высаженных без заглубления.

Эффективность корнеобразования для сорта Василек составила 42,5%, для сорта Прамень – 66,7%, для сорта Старт – 66,7%. Средняя величина эффективности ризогенеза для данных сортов льна-долгунца – 51,6% (таблица 1). При дальнейшем культивировании побегов образование корней не наблюдалось.

Таблица 1

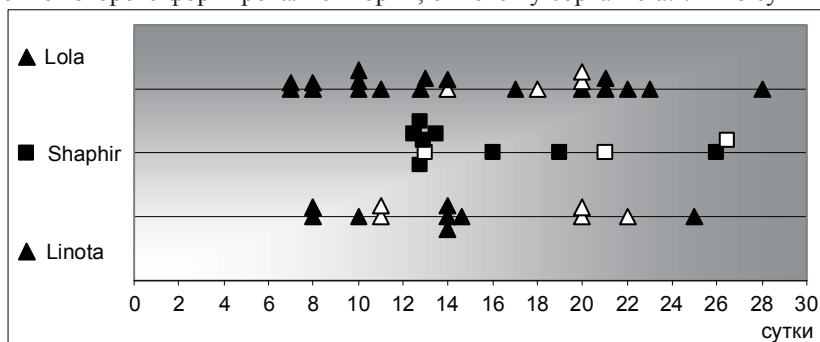
Эффективность ризогенеза у регенерантов льна-долгунца, высаженных без заглубления

Сорт	Высажено побегов, шт	Выжило побегов, шт	Укоренилось побегов, шт	Эффективность ризогенеза, %
Василек	50	40	17	42,5
Прамень	30	12	8	66,7%
Старт	30	12	8	66,7%
Всего	110	64	33	51,6%

Следует подчеркнуть, что в контрольной посадке растений традиционным способом (с заглублением в среду для ризогенеза) корни в указанный период не сформировались ни у одного регенерированного побега из всех исследованных генотипов льна-долгунца.

Начало образования корней у растений-регенерантов изученных генотипов льна масличного совпадало с началом появления корней у растений-регенерантов льна-долгунца. Однако основной период ризогенеза оказался более протяженным и составил 19 дней. Корни образовывались в промежу-

ток времени от 7 до 26 суток (рисунок 2). Самый длительный период, в течение которого формировались корни, отмечен у сорта Lola: 7 – 28 сутки.



▲■ – регенеранты льна масличного, высаженные без заглабления,
 △□ – регенеранты льна масличного, высаженные с заглаблением

Рис.2. Сроки формирования корней у растений-регенерантов сортов льна масличного

Эффективность корнеобразования для сорта Lola составила 61,54%, для сорта Linota – 55,25%, для сорта Shaphir – 47,06%. Средняя величина эффективности ризогенеза для данных сортов льна масличного – 55,25% (таблица 2). При дальнейшем культивировании побегов образование корней не отмечено.

Таблица 2

Эффективность ризогенеза у регенерантов льна масличного

Сорт	Высажено побегов, шт		Выжило побегов, шт		Укоренилось побегов, шт		Эффективность ризогенеза,%	
	заглабление	б/заглабления	заглабление	б/заглабления	заглабление	б/заглабления	заглабление	б/заглабления
Lola	17	26	17	26	6	16	35,3	61,54
Linota	16	14	16	14	5	8	31,25	55,25
Shaphir	13	17	13	17	3	8	23,08	47,06
Всего	46	57	46	57	14	32	30,43	55,25

В контрольной группе растений-регенерантов льна масличного, высаженных традиционным способом (с заглаблением), наблюдалось интенсивное развитие каллуса на срезе, преобладал рост вегетативной части побегов, образование корней происходило на 11 сутки и заканчивалось на 26 сутки. Эффективность ризогенеза для всех исследованных генотипов льна масличного в среднем составила 30,43%, что в 1,8 раза ниже, чем при культивировании побегов без заглабления.

Особенности формирования корней при культивировании растений-регенерантов на границе среда/воздух, по-видимому, связаны с изменением

интенсивности клеточного дыхания на срезе стебля микрочеренка. Известно, что у молодых тканей с высоким содержанием физиологически активных метаболитов (в данном случае срез стебля регенерированного побега) интенсивность клеточного дыхания выше, чем у зрелой ткани. Также известно, что образование вторичных корней происходит из клеток камбия [11]. Разработанный нами способ основан на улучшении аэрации камбиальной зоны стебля, что приводит к увеличению активности клеток этой зоны, и, следовательно, способствует образованию корней. Формирующаяся в таких условиях корневая система характеризуется наличием корневых волосков и корней второго порядка. Следовательно, такие регенеранты имеют большую площадь питания и более высокую поглотительную способность, что положительно сказывается на этапе адаптации к условиям *ex vitro*.

При культивировании традиционным способом (с заглублением побегов в среду культивирования) уменьшается аэрация нижней части стебля растения-регенеранта. У микрочеренков сначала появляется каллус, а затем корни. В таком случае между корнями и побегами осуществляется плохая сосудистая связь, отмечены изменения в проводящей системе и гипертрофия кортикального слоя корней [12]. Образовавшиеся корни обладают сниженной биосинтетической активностью, что замедляет поглощение воды и солей [11].

Поскольку лен, а в особенности лен-долгунец, имеет слаборазвитую корневую систему с недостаточной усваивающей функцией, адаптация растений-регенерантов к условиям *ex vitro* затруднительна. Поэтому на этапе ризогенеза необходимо создать такие условия, при которых будет формироваться функциональная корневая система, способная обеспечить поступление минеральных веществ, необходимых для роста и развития растений-регенерантов.

Индукция ризогенеза по разработанному нами методу позволяет успешно получать функциональные корни как у растений-регенерантов льна масличного, так и у растений-регенерантов льна-долгунца. По-видимому, наблюдаемое интенсивное развитие корневой системы способствует быстрому установлению оптимального эндогенного баланса гормонов, что позволяет растениям перейти с миксотрофного типа питания на автотрофное и, следовательно, легко адаптироваться к условиям выращивания *ex vitro*.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ. Патент на изобретение в Украине № 48060 10.03.2010, в России 2010106540/10(009245).

Литература

1. Гузенко Е.В., Лемеш В.А., Хотылева Л.В. Ризогенез в культуре *in vitro* у сортов льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L.) // Доклады НАН Б. – 2009. – 53, №6 – С.86 – 89.
2. Pretova A., Obert B., Bartosova Z. Flax // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. – 2007. – vol.6. – P.129—140.

3. *Burbulis N., Blinstrubiene A., Kupriene R., Sliesaravicius A., Venskutoniene E.* Optimization of Linseed flax (*Linum usitatissimum* L.) *in vitro* cultures // *Zemdirbyste. Agriculture.* – 2007. – vol.94, №4. – P.120—128.

4. *Wijayanto T., Hughen A.Mc.* Genetic transformation of *Linum* by particle bombardment // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 1999. – P.456—465.

5. *Rutkowska – Krause I., Mankowska G., Poliakov A. V.* Regeneration of androgenic flax (*Linum usitatissimum* L.) plants and their application in breeding programme // *Natural Fibres.* – 2002. – P.92—101.

6. *Wang Yu Fu, Kang Qing Hua, Liu Yan, Li Xi Chen, Liu Shao Jun, Xu Ying.* Study on Flax Genetic Transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* // *J. Natural Fibres.* – 2004. – vol.1 (1). – P.1—10.

7. *Поляков А.В.* Биотехнология в селекции льна. Тверь. – 2000. – 180с.

8. *Поляков А.В., Кельнер Е.В.* Органогенез и регенерация у льна-долгунца в культуре *in vitro* // *Технические культуры.* – 1991. – С.192—199.

9. *Кузьмина Н.А.* Основы биотехнологии // <http://www.biotechnolog.ru/>, 2005.

10. *Бабикова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлев Ю.Н.* Растение как объект биотехнологии. // *КОМАРОВСКИЕ ЧТЕНИЯ.* – 2007. – Владивосток. – Выпуск 55. С.184—211.

11. *Крамер П.Д., Козловский Т.Т.* Физиология древесных растений: Пер. с англ. – М.: Лесная промышленность, – 1983. – 464с.

12. *Moreira M.F., B.Appezato-Gloria, L.B.P.Zaidan.* Anatomical aspects of IBA-treated microcuttings of *Gamphrena macrocephala* St.-Hil // *Braz. Arch. Biol. And Technol.* – 2000. – vol.43, №2. – P.221 – 227.

Резюме

Разработана технология индукции ризогенеза у льна в культуре *in vitro* путем создания определенных условий культивирования, стимулирующих корнеобразование. Регенерировавшие побеги длиной более 2 см переносили на среду для ризогенеза, при этом побеги льна не заглублялись в питательную среду, а культивировались на границе – питательная среда/воздух. Начало образования корней для всех исследованных генотипов наблюдалось на 7 сутки. Средняя величина эффективности ризогенеза для исследованных сортов льна-долгунца составила 51,6%, для льна масличного 55,25%. Индукция ризогенеза по разработанной технологии позволяет успешно получать функциональные корни у растений-регенерантов льна, относящегося к трудноукореняемым видам.

The technology for rhizogenesis induction in the *in vitro* culture was developed in flax cultivars by creating certain culturing conditions stimulating rooting. Regenerated shoots, 2 cm in length, were transferred to a rhizogenesis medium. Flax shoots were not deepened into the nutrient medium and were cultured on the boundary – a nutrient medium/air. A basic period of rooting for all the studied genotypes was observed on 7 day. The mean value of rhizogenesis efficiency made up 51.6% for the studied fiber flax cultivars and 55,25% for the studied linseed. Rhizogenesis induction according to the developed technology allows successful production of functional roots in regenerant plants of flax.

Розроблена технологія індукції ризогенеза льону в культурі *in vitro* шляхом створення певних умов культивування, стимулюючих корнеутворення. Погони, що регенерували, завдовжки більше 2 см переносили на середовище для ризогенеза, при цьому погони льону не заглиблювалися в живильне середовище, а культивувалися на межі – живильне середовище/повітря. Початок утворення коріння для всіх до-

сліджених генотипів спостерігався на 7 добу. Середня величина ефективності різогенеза для досліджених сортів льону-довгунця склала 51,6%, для льону маслянистого 55,25%. Індукція різогенеза за розробленою технологією дозволяє успішно отримувати функціональне коріння у рослин-регенерантів льону, що відноситься до важкоукорінюваних видів.

ДРОБИК Н.М.¹, КОНВАЛЮК І.І.², МЕЛЬНИК В.М.², ТВАРДОВСЬКА М.О.², КУНАХ В.А.²

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
Україна 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2, e-mail: drobyk.n@gmail.com

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ ДЕЯКИХ ВИДІВ *GENTIANA L.* НА ПЕРШИХ ЕТАПАХ ВИРОЩУВАННЯ *IN VITRO*: RAPD-АНАЛІЗ

Використання культури тканин є одним зі способів збереження генофонду рідкісних і зникаючих лікарських рослин, до яких належать види роду Тирлич (*Gentiana L.*). Однак відомо, що при культивуванні рослинних клітин в умовах *in vitro* відбуваються зміни геному, причому у багатьох випадках значно швидше, ніж у природі [1-3].

Поліморфізм культивованих клітин обумовлений видовими, генотиповими особливостями, рівнем плідності вихідних експлантів, впливом складу живильного середовища та умов культивування, відсутністю характерних для цілої рослини корелятивних зв'язків. Значний вплив на рівень соматоклональної мінливості має і тривалість перебування клітин у культурі [1-4]. З літератури відомо, що більшість перебудов геному відбуваються у процесі дедиференціації та на ранніх етапах культивування під час формування клітинних популяцій [1, 2, 5, 6]. За іншими даними, рівень змін у молодих калусах є невисоким і зростає із збільшенням тривалості вирощування [4].

Метою даної роботи був аналіз рівня соматоклональної мінливості в культурі тканин п'ятьох видів роду *Gentiana* флори України на ранніх етапах культивування.

Матеріали і методи

Рівень соматоклональної мінливості у культурі *in vitro* визначали за результатами RAPD-ПЛР 8 рослин-донорів та отриманих від них калусів 5 видів тирличів з 7 популяцій (табл). Вихідним матеріалом для дослідження слугували вирощені з насіння в стерильних умовах рослини трьох високогірних (*G. acaulis*, *G. lutea*, *G. punctata*) та двох рівнинних (*G. cruciata* і *G. pneumonanthe*) видів *Gentiana*, а також отримані від них піврічні культури тканин (табл.).

Усі досліджені калюсні культури вирощували в однакових умовах на аналогічних за складом живильних середовищах. Детально отримання та вирощування цих культур тканин описано в роботах [7, 8]. Виділення ДНК, гель-електрофорез продуктів ампліфікації, умови проведення полімеразної ланцюгової реакції з праймерами довільної послідовності (RAPD-ПЛР) та нуклеотидні послідовності використаних праймерів наведено у роботі [9]. У дослідженні протестовано 27 праймерів, з яких більшість давали чіткі відтворювані спектри ПЛР-продуктів і були відібрані для подальшої роботи: для *G. cruciata* – 21 праймер, *G. punctata* – 19, *G. acaulis* та *G. pneumonanthe* – по 17, *G. lutea* – 11.

Враховували чітко розрізновані, відтворювані амплікони. Результати обробки електорофореграм RAPD-продуктів були представлені у вигляді бінарної матриці, у якій наявність чи відсутність однакових за розміром ампліконів позначено відповідно «1» або «0». На основі отриманої матриці за допомогою програми FAMD 1.21 beta було розраховано генетичні відстані Жакарда (D_j) [10] між дослідженими зразками.

Результати та обговорення

За результатами RAPD-ПЛР отримано спектри ампліфікованої ДНК рослини-донора і одержаної від неї культури тканин різних видів тирличів. На електрофореграмах для кожної групи зразків «рослина-донор – культура тканин» виявлено різну кількість ампліконів: для *G. acaulis* – 175 розміром 280-2900 п.н.; *G. lutea* – 74 розміром 480-2000 п.н.; *G. punctata* – 240 розміром 250-3000 п.н.; *G. cruciata* – 264 (креницька популяція) і 266 (медоборська популяція) розміром 280-2970 п.н.; *G. pneumonanthe* – 149 (корюківська популяція) і 163 (вигодська популяція) розміром 270 – 2700 п.н. Середня кількість фрагментів на праймер становила: *G. acaulis* – 10,3, *G. lutea* – 6,7, *G. punctata* – 12,6, *G. cruciata* 12,6 (креницька популяція) і 12,7 (медоборська популяція), *G. pneumonanthe* – 8,8 (корюківська популяція) і 9,6 (вигодська популяція).

На основі аналізу спектрів ампліфікованих фрагментів ДНК тирличів обраховано генетичні відстані між рослиною-донором і отриманою від неї культурою тканин (табл.). Як видно із таблиці, рівень соматоклональної мінливості досліджених об'єктів був різним і залежав від вихідної та популяційної приналежності, а також від вихідного генотипу рослини-донора. Генетичні дистанції були більшими у випадку трьох високогірних видів – *G. lutea*, *G. acaulis* та *G. punctata* і меншими у двох рівнинних – *G. cruciata* та *G. pneumonanthe*. За рівнем соматоклональної мінливості суттєво відрізнялися дві групи зразків *G. cruciata* з креницької та медоборської популяцій, тоді як для об'єктів *G. pneumonanthe* (корюківська і вигодська популяції) ці відмінності були не такими значними. Поряд із цим, для двох генотипів *G. pneumonanthe* з однієї популяції значення генетичних відстаней були подібними.

Таблиця

Генетичні відстані за Жакардом (D_j) між рослинами-донорами деяких видів роду *Gentiana* та отриманими від них калусними тканинами, а також між рослинами в природі (RAPD-аналіз)

Вид	Популяція, висота над рівнем моря, м	Генетична відстань	
		від рослини-донора до шестимісячного калусу	внутрішньовидова*
<i>G. acaulis</i>	гора Туркул, хребет Чорногора, 1750 м н.р.м.	0,209	0,273-0,550
<i>G. lutea</i>	полонина Лемська, хр. Чорногора, 1600 м н.р.м.	0,239	0,143-0,537 **
<i>G. punctata</i>	г. Трояська, хр. Свидовець, 1695 м н.р.м.	0,204	0,087-0,291
<i>G. cruciata</i>	с. Креничі, Київська обл.	0,149	0,056-0,223
	заповідник «Медобори», Тернопільська обл.	0,113	
<i>G. pneumonanthe</i>	Корюківське лісництво, Чернігівська обл.	0,134	0,143-0,484
		0,140	
	с. Вигода, Івано-Франківська обл.	0,123	

Примітки: * – генетичні відстані внутрішньовидового поліморфізму для видів *G. acaulis*, *G. punctata*, *G. cruciata* подані за [11], *G. pneumonanthe* – за [12]; ** – для *G. lutea* поданий розмах внутрішньопопуляційної мінливості (неопубліковані дані).

Відомо, що у молодих калусах, зазвичай до 10-12-го пасажу, відбувається становлення клітинної популяції. Саме для цього періоду характерні значні зміни, в т.ч. генетичні, які забезпечують адаптацію клітинних угруповань як біологічної системи до змінених умов існування [1, 2]. Для культур тканин досліджених видів тирличів на ранніх етапах вирощування за допомогою цитогенетичного аналізу були виявлені суттєві зміни геному, які полягали у зміні числа хромосом та хромосомних аберациях [13, 14]. Поряд з цим, блот-гібридизація з 18S-25S рибосомою ДНК показала ідентичність отриманих радіоавтографів за набором гібридизаційних фрагментів молодих калусів та рослин *G. acaulis* та *G. punctata* [15]. При цьому виявлені лише кількісні зміни – у культурі тканин копійність дослідженої ділянки геному була меншою. Результати проведеного RAPD-аналізу підтвердили, що на молекулярно-генетичному рівні зміни в культурі *in vitro* відбуваються повільніше і є не такими масштабними, як на хромосомному. У цілому, рівень соматональної мінливості у калусах п'яти досліджених видів тирличів був значно меншим за визначені раніше внутрішньовидовий (табл.) та внутрішньопопуляційний поліморфізм цих рослин у природі (табл.) [11, 12]. Подібні результати отримані іншими авторами при дослідженні мінливості у культурі тканин *Ungernia victoris* [5] і деяких видів ірисів [16].

Отримані результати вказують на те, що умови введення в культуру *in vitro* та подальше нетривале вирощування на підібраному нами живильному середовищі забезпечують досить високу генетичну стабільність отриманих калюсів. Низький рівень соматональної мінливості дає підстави для використання досліджених культур тканин з метою збереження генофонду цінних видів роду *Gentiana*.

Висновки. Методом RAPD-ПЛІР досліджено геномну мінливість у культурі тканин *G. acaulis*, *G. lutea*, *G. punctata*, *G. cruciata* та *G. pneumonanthe* на ранніх етапах вирощування. Рівень соматональної мінливості був різним і залежав від видової та популяційної приналежності, а також від вихідного генотипу рослини-донора. Генетичні дистанції були вищими у випадку трьох високогірних видів і нижчими у двох рівнинних. Розмах геномного поліморфізму у калюсах п'яти досліджених видів тирличів був значно меншим за внутрішньовидовий та внутрішньопопуляційний (для *G. lutea*) у природі.

Література

1. Кунах В. А. Механізми та деякі закономірності соматональної мінливості рослин // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2003. – № 1. – С. 101-106.
2. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 724 с.
3. Bairu M. W., Aremu A. O., Staden J. V. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods // Plant Growth Regul. – 2011. – Vol. 63. – P. 147–173.
4. Orbović V., Čalović M., Vilorija Z., Nielsen B., Gmitter Jr. F. G., Castle W. S., Grosser J. W. Analysis of genetic variability in various tissue culture-derived lemon plant populations using RAPD and flow cytometry // Euphytica. – 2008. – 161. – P. 329–335.
5. Бублик О.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Кунах В.А. Вивчення геномної мінливості культури тканин *Ungernia victoris* за допомогою RAPD-маркерів // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т.4, № 1. – С. 3-11.
6. Андреев І.О., Спіридонова Е.В., Майданюк Д.Н., Кунах В.А. Генетические эффекты культивирования *in vitro* тканей кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 487-495.
7. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* деяких видів роду *Gentiana* L. // Физиология и биохимия культ. растений. – 2004. – Т.36, №4. – С. 327-334.
8. Страшнюк Н.М., Твардовська М.О., Мельник В.М. Введення в культуру *in vitro* видів тирличу хрещатого (*Gentiana cruciata* L.) та тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол., №3-4 (26). – 2006. – С. 100-107.
9. Твардовська М.О., Страшнюк Н.М., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Кунах В.А. RAPD-аналіз геномного поліморфізму деяких видів роду *Gentiana* L. флори України // Доповіді Національної академії наук України. – 2009. – №5. – С. 200-204.
10. Schluter P. M., Harris S. A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // Molecular Ecology Notes. – 2006. – №6. – P. 569-572.

11. Твардовська М.О., Дробик Н.М., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Кунах В.А. Геномна мінливість деяких видів роду *Gentiana* L. в природі та в культурі *in vitro*: RAPD-аналіз // *Biopolymers and cell*. – 2010. – Vol. 26, № 6. – Р. 499-507.

12. Конвалюк І.І., Мельник В.М., Дробик Н.М., Кравець Н.Б., Твардовська М.О., Кунах В.А. RAPD- та ISSR-аналіз генетичної мінливості у культурі тканин та органів тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, №1. – (у друці).

13. Твардовська М.О., Страшнюк Н.М., Мельник В.М., Кунах В.А. Аналіз генетичної мінливості культури тканин деяких видів роду *Gentiana* L. // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2007. – Т. 5, №1-2. – С. 104-111.

14. Твардовська М.О., Страшнюк Н.М., Мельник В.М., Адо́нін В.І., Кунах В.А. Хромосомна мінливість у культурі тканин рідкісних видів роду тирлич (*Gentiana* L.) // Цитология и генетика. – 2008. – Т.42, №4. – С. 12-17.

15. Мельник В.М., Андреев І.О., Спіридонова К.В., Страшнюк Н.М., Кунах В.А. Зміни 18S-25S рДНК у культурі тканин деяких видів тирличів *Gentiana* L. // Цитология и генетика. – 2007. – Т.41, 2. – С. 19-23.

16. Козыренко М.М., Артюкова Е.В., Лауве Л.С., Болтенков Е.В. Аналіз генетической изменчивости каллусных культур некоторых видов рода *Iris* L. // Биотехнология. – 2002. – №4. – С. 38-48.

Резюме

Досліджено рівень соматоклональної мінливості піврічних калусних тканин п'яти видів роду *Gentiana* L. Показано, що розмах генетичних змін у культурі *in vitro* менший за внутрішньовидовий та внутрішньопопуляційний (для *G. lutea*) поліморфізм. Встановлено відмінності рівня соматоклональної варіабельності залежно від видової та популяційної приналежності, а також від вихідного генотипу рослини-донора.

Изучен уровень соматоклональной изменчивости полугодовых каллусных тканей пяти видов рода *Gentiana* L. Показано, что размах генетических изменений в культуре *in vitro* был меньше, чем внутривидовой и внутривидовой (для *G. lutea*) полиморфизм. Установлены отличия уровня соматоклональной вариабельности в зависимости от видовой и популяционной принадлежности, а также от исходного генотипа растения-донора.

Somaclonal variability level for semi-annual callus tissues from five *Gentiana* L. species has been studied. The range of genetic changes was shown to be lesser than intraspecific and intrapopulation (in case of *G. lutea*) polymorphism. Differences in somaclonal variability levels were found to depend on species and population belonging as well as the initial donor-plant genotype.

ЕГОРОВА Н.А., СТАВЦЕВА И.В., ЛОЛОЙКО А.В., МЕРКУРЬЕВ А.П.

*Институт эфиромасличных и лекарственных растений НААН Украины,
Украина, 95493, Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: yegorova.na@mail.ru*

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОМАКЛОНАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСХОДНОГО СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА У ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Явление соматоклональной изменчивости культивируемых клеток *in vitro* достаточно давно привлекает внимание биотехнологов, так как позво-

ляет не только создавать штаммы-продуценты вторичных метаболитов, но и разрабатывать клеточные технологии, используемые при создании новых генотипов в селекции [1,5]. К настоящему времени для многих видов растений получен обширный экспериментальный материал, свидетельствующий о значительной изменчивости растений-регенерантов по многим морфологическим и хозяйственно ценным признакам [2,5,7]. Тем не менее, остаются не достаточно изученными очень многие вопросы, касающиеся закономерностей проявления соматональной вариабельности у полученных в изолированной культуре растений, а также влияния на этот процесс различных факторов, что затрудняет практическое использование этого уникального явления.

Для основных эфиромасличных растений, возделываемых на Украине, эти вопросы почти не исследованы, а имеющиеся литературные данные в основном затрагивают оптимизацию режимов каллусогенеза и регенерации растений *in vitro* [8-11]. Разработка биотехнологических методов для этих растений, и в частности получения соматоклонов, является очень перспективным направлением, которое позволит интенсифицировать процесс создания новых сортов. Индукция соматональной изменчивости может использоваться как самостоятельный методический подход для получения разнообразного исходного селекционного материала, а также является основой клеточной селекции, позволяющей отбирать генотипы с желаемыми свойствами.

Целью данной работы было изучение морфогенетической способности каллусных тканей некоторых эфиромасличных растений и анализ полученных *in vitro* регенерантов.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили ткани и органы эфиромасличных растений: лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) – сорта Степная, Синева, Вдала; шалфея (*Salvia sclarea* L.) – сорта С-785, С-1122, Тайган; кориандра (*Coriandrum sativum* L.) – сорта Янтарь, Ранний, Мисхор, Нектар; фенхеля (*Foeniculum vulgare* Mill.) – сорта Мэрцишор, Крымский; тысячелистника (*Achillea filipendulina* Lam., *A. millefolium* L.). В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали сегменты листьев, стеблей, соцветий, зародышей, молодых проростков и меристемы. Введение в культуру *in vitro* и культивирование проводили с применением традиционных биотехнологических методов на различных модификациях среды Мурасиге и Скуга [4]. Длительность цикла выращивания составляла 40-50 суток. Каллусные ткани культивировали при +26°C, влажности 70% и освещенности 600 люкс. Морфогенные каллусные культуры и проростки выращивались при освещенности 2-3 тыс. люкс с 16-часовым фотопериодом. Полученные из каллусов проростки укореняли *in vitro*, а затем переносили для адаптации в условия *in vivo*. Анализ растений-регенерантов в полевых условиях проводили согласно имеющимся рекомендациям [6]. Все

эксперименты воспроизведены не менее 2-3 раз, а данные обработаны статистически с использованием пакета программ Microsoft Office.

Результаты и обсуждение

Основой биотехнологических методов получения соматональных вариантов прежде всего является оптимизация режимов индукции каллусных культур и регенерации из них растений. Для изученных видов растений нами были разработаны эффективные методики получения и длительного пассирования каллусных тканей, обладающих хорошим приростом биомассы. Обычно более сложной проблемой при получении соматоклонов является стабильная индукция морфогенеза *in vitro*, при этом желательно получить регенерацию растений из каллусов поздних пассажей, так как известно, что с увеличением длительности культивирования возрастает генетическая вариативность клеток и, как следствие – вероятность получения соматональных вариантов [2,5,7]. Показана возможность индукции морфогенеза и регенерации растений из каллусных тканей у всех изученных эфиромасличных растений, однако частота этих процессов существенно зависела от многих экзогенных и эндогенных факторов. Были подобраны оптимальные составы питательных сред и типы эксплантов, обеспечивающие индукцию органогенеза (шалфей, лаванда, тысячелистник) или соматического эмбриогенеза (кориандр, фенхель). Способные к морфогенезу каллусные культуры были получены: у лаванды из эксплантов листьев и меристем, у шалфея – меристем и основания микрочеренков, у фенхеля – стеблевых сегментов и зародышей, у кориандра – соцветий и гипокотили или листьев проростков, у тысячелистника – листьев.

Одним из наиболее важных факторов индукции морфогенеза являлся генотип, при этом было показано, что наименьшая частота этого процесса была у тысячелистника (до 3,5 – 13,6%), а у лаванды и фенхеля в отдельных вариантах достигала 90-94%. Выявлена значительная сортовая вариативность по способности каллусных культур к регенерации *in vitro*, причем у некоторых генотипов при используемых условиях морфогенез не наблюдался. Например, у кориандра частота образования эмбрионного каллуса у 8-ми проанализированных сортов и сортообразцов варьировала от 11,1 до 52,2%. Для генеративно размножаемых перекрестно опыляющихся эфиромасличных растений (кориандр, фенхель, шалфей) было установлено, что частота морфогенеза и длительность сохранения морфогенетического потенциала каллуса зависели не только от сорта, но и генотипа индивидуального донорного растения. Так, у шалфея растения в пределах одного сорта Тайган варьировали по частоте индукции морфогенеза в каллусной ткани от 10,6 до 76,8%.

Регенерация растений в каллусной культуре в значительной степени лимитировалась длительностью ее культивирования и у большинства изученных видов, как правило, ограничивалась 2-3 пассажами. Разработаны методические приемы, позволяющие не только повысить частоту индукции

морфогенеза, но и стимулировать регенерацию в течение достаточно длительного периода. Для всех видов очень эффективным было проведение скрининга морфогенных штаммов, которые сохраняли способность к регенерации при культивировании в течение 1,5 – 2,5 лет. Для лаванды, фенхеля и тысячелистника было показано, что при использовании каллусов, полученных из регенерантов, можно не только повысить в 2-4 раза частоту морфогенеза, но и продлить до 2 лет их способность к регенерации по сравнению с исходными сортами.

Повышение морфогенетического потенциала также было возможно при проведении отборов индивидуальных растений с высокой регенерационной способностью среди исходных сортов (шалфей, кориандр, фенхель) или использовании в качестве донорных растений гибридов (фенхель).

При полевых испытаниях семенного потомства регенерантов кориандра, шалфея, фенхеля и вегетативного потомства лаванды и тысячелистника в течение нескольких лет была показана их вариабельность по некоторым морфологическим и хозяйственно-ценным признакам, при этом были выявлены соматоклональные варианты с наследуемыми изменениями. Уровень изменчивости полученных в культуре тканей растений у этих эфиромасличных видов был гораздо ниже, чем у ранее изученной нами эфиромасличной герани, у которой частота измененных форм достигала 56% [3]. Максимальная изменчивость регенерантов (до 24,1%) была отмечена у лаванды, а у других видов в большинстве экспериментов не превышала 7-12%. Следует отметить, что среди растений, полученных из каллусов поздних пассажей (6-9 пассаж), у многих исследованных видов часто встречались мало жизнеспособные образцы с угнетенным ростом и плохой приживаемостью при адаптации *in vivo*.

Показано, что у шалфея 12,5 % регенерантов имели морфологические отклонения по сравнению с исходным сортом С-785, что проявлялось в изменении формы листьев, структуры соцветий (появлялось ложно-мутовчатое ветвление), появлении раннеспелых образцов. У лаванды среди растений-регенерантов были выявлены отклонения по сравнению с исходными сортами, в частности, изменение формы куста, формы и окраски листовой пластинки, морфологии соцветия, появление утолщенных антоциановых побегов и укороченных междоузлий. Были выделены образцы с увеличенным числом мутовок в соцветии и цветков в мутовках, с пониженной или повышенной фертильностью пыльцы, раннеспелые и позднеспелые формы.

Сравнительный анализ исходных сортов и полученных из них в культуре тканей регенерантов у лаванды (таблица) и шалфея показал, что размах изменчивости значений некоторых количественных признаков у растений-регенерантов был гораздо выше, а коэффициенты вариации по всем признакам были почти в 2 раза больше, чем у сортов. Следует отметить, что по всем признакам происходил сдвиг популяции регенерантов как в сто-

рону уменьшения, так и в сторону повышения значений признака. Однако при любом сдвиге популяции (к верхней или нижней границе) по всем изученным признакам можно было выделить единичные формы с более высокими, чем у сорта показателями (улучшающие вариации), которые представляют интерес для селекции. Так, у лаванды при дальнейшем анализе в селекционном питомнике были выявлены регенеранты с повышенной масличностью, которые превысили исходный сорт Синева по массовой доле эфирного масла на 45-67%. Среди регенерантов шалфея также были отобраны перспективные образцы, превышающие исходный сорт С-785 по сбору эфирного масла на 8-142%.

Таблица

Характеристика растений-регенерантов лаванды, полученных из каллусных тканей, по некоторым количественным признакам (2007-2009гг)

Признак	Исходный сорт Синева		Регенеранты	
	$\bar{x} \pm S_x$	V, %	Lim	V, %
Высота куста, см	61,8±2,5	8,2	48,5-68,0	10,3
Диаметр куста, см	67,2±5,1	15,1	48,7-92,0	22,3
Число цветоносов на куст, шт	412,2±41,8	20,3	235,0-775,0	43,7
Длина соцветия, мм	51,5±1,9	7,5	42,3-90,4	25,4
Количество мутовок в соцветии, шт	5,3±0,1	3,2	4,9-6,2	6,9
Количество цветков в мутовке, шт	9,4±0,4	8,5	6,9-14,1	19,7
Масса соцветий гр/куст	311,3±36,0	23,1	120,6-533,5	52,6
Фертильность пыльцы, %	42,3±2,3	11,1	19,2-81,0	41,7
Массовая доля эфирного масла, %	1,56±0,06	7,9	0,77-1,84	25,3
Содержание линалоола, %	28,5±0,7	8,3	23,8-51,0	22,3

При изучении семенного потомства регенерантов кориандра были выявлены образцы, отличающиеся от исходного сорта Янтарь по высоте растений, количеству побегов и соцветий, форме листьев, окраске стебля и цветков, продолжительности вегетационного периода, а также с повышенной до 40-89% урожайностью плодов. Среди полученных в условиях *in vitro* растений тысячелистника были выделены формы с более высоким содержанием эфирного масла, а у фенхеля – перспективные образцы, устойчивые к церкоспорозу, превышающие исходный сорт по массовой доле эфирного масла и анетола до 20-30 %.

Таким образом, в результате исследований некоторых эфиромасличных растений были выявлены особенности морфогенеза *in vitro* и установлены экспериментальные подходы, позволяющие повысить регенерационный потенциал каллусных тканей – скрининг морфогенных штаммов, использование в качестве донорных растений регенерантов и отбор индивидуальных растений с высокой регенерационной способностью. Показано, что регенеранты, полученные в культуре каллусных тканей, отличаются

вариабельностью по некоторым морфологическим и хозяйственно полезным признакам, что позволяет выделить перспективные образцы, представляющие ценный исходный селекционный материал, который можно использовать при создании новых сортов.

Литература

1. Бутенко П.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. Учебное пособие. – М.: ФБК – ПРЕСС, 1999. – 160 с.

2. Дубровна О.В. Мінливість геному буряків (*Beta vulgaris L.*) за інбридингу та в культурі *in vitro*: Автореф. дис. д-ра біол. наук: 03.00.15. НААНУ ІФРГ – К., 2005.– 41с.

3. Егорова Н.А., Бугара А.М., Ермилова А.М. Получение исходного материала для селекции эфиромасличной герани методами культуры тканей // Труды ИЭЛР. – Симферополь, 1998. – 24. – с. 98-110.

4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка. 1980. – 488 с.

5. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.

6. Селекция эфиромасличных культур. Методические указания. Под ред. А.И. Аринштейн. – Симферополь. – 1977. – 150с.

7. Сидоров В.А. Биология растений. Клеточная селекция. – Киев.: Наук. думка. – 1990 – 280 с.

8. Calvo M.C., Segura J. Plant regeneration from cultured leaves of *Lavandula latifolia* Medicus: Influence of growth regulators and illumination conditions. // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1989. – 19, №1. – p. 33-42.

9. Hunault G., Maatar A. Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1995. – 141, № 2. – P. 171-176.

10. Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum L.* // Scientia Hort. – 2008. – V.118, N2. – P.168-171.

11. Skala E., Wysokinska H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa L.* from shoot tips and leaf explants // *In vitro* Cell. Dev. Biol.– Plant. – 2004. – V.40, N 6. – P. 596-602.

Резюме

Исследовано влияние генотипа, типа экспланта, длительности культивирования и других факторов на индукцию морфогенеза в каллусных тканях лаванды, шалфея, кориандра, фенхеля, тысячелистника. Виявлена вариабельность полученных *in vitro* растений-регенерантов по некоторым морфологическим и хозяйственно полезным признакам.

Досліджено вплив генотипу, типу експланту, тривалості культивування і інших факторів на індукцію морфогенезу в калюсних тканинах лаванди, шавлії, коріандру, фенхелю, деревію. Виявлена мінливість отриманих *in vitro* рослин-регенерантів по деяких морфологічних та господарсько корисних ознаках.

The influence of genotype, explant type, cultivation time and another factors on morphogenesis induction in callus tissues of lavender, sage, coriander, fennel, yarrow have been investigated. The variability of obtained *in vitro* plant-regenerants by morphology and some economically valuable characters have been shown.

ЕФЕКТИВНІСТЬ РІЗНИХ СЕЛЕКТИВНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ДОБОРУ ТОЛЕРАНТНИХ ДО ПОСУХИ ФОРМ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Посуха – один із найголовніших обмежуючих факторів довкілля, які знижують продуктивність рослин. Стійкість до посухи є дуже складною ознакою, яка знаходиться під контролем багатьох різних генів. У сучасних умовах традиційні методи селекції, що ґрунтуються на тривалих емпіричних дослідженнях, комбінативній мінливості та схрещуваннях з носіями бажаних генів не можуть повною мірою задовольнити потреби селекціонерів. Особливо, коли гени стійкості до певного стресового чинника у роді *Triticum* невідомі, або не знайдено джерел стійкості. Враховуючи це, значні перспективи для селекційного процесу може мати технологія клітинної селекції, як метод створення нових форм рослин шляхом виділення мутантних клітин і соматональних варіацій у селективних умовах.

При отриманні методом клітинної селекції толерантних до посухи рослин з метою імітації *in vitro* стресового ефекту застосовують поживні середовища з осмотично активними речовинами, які знижують зовнішній водний потенціал, такі як поліетиленгліколь (ПЕГ) або маніт. Було зроблено декілька спроб отримати стійкі до посухи форми пшениці в культурі *in vitro* [1-6]. Показана позитивна кореляція між ростом культивованих тканин на середовищах з ПЕГ та посухостійкістю рослин-регенерантів [5]. Вивчаючи ефекти різних концентрацій ПЕГ (10, 20 і 30 %) на життєздатність культури тканин пшениці Кондік-Спіка та Зесек [7] встановили, що ці концентрації є летальними для калусної культури. Галовік та співавтори [5] довели, що 5% – концентрація високомолекулярного ПЕГ може бути селективним маркером, оскільки було виявлено як суттєві відмінності між генотипами, так і зменшення приросту маси калусів на 50 % і більше. Єгипетські дослідники [8] встановили чітку позитивну кореляцію між стійкістю сорту та виживаністю калусів на селективних середовищах з різними концентраціями маніту і життєздатністю цих генотипів у польових умовах.

Оскільки кожен вид рослин має свою чутливість до осмотиків рекомендовані в літературі селективні концентрації ПЕГ та маніту суттєво відрізняються. У зв'язку з цим метою нашої роботи було порівняння ефективності селективних систем з високомолекулярним непроникаючий у клітину поліетиленгліколем та низькомолекулярним проникаючий манітом для добору конкретних умов проведення клітинної селекції.

Матеріали та методи досліджень

Для введення в культуру *in vitro* використовували зріле насіння м'якої пшениці сорту Зимоярка. Насіння пророщували на модифікованому живильному середовищі МС [9] без фітогормонів. Материнські рослини куль-

тивували в скляному посуді, об'ємом 200 мл, в який було розлито по 30 мл середовища. Культура калусної тканини була отримана із верхівки пагона 3-добових проростків, попередньо вирощених в умовах *in vitro*. Для індукції калюсу використовували середовище МС та регулятори росту – 2,4-Д і піклорам у концентрації 2,0 мг/л. Подальше культивування отриманих калусних культур здійснювали на безгормональному середовищі МС. Калюс вирощували при освітленні 3-4 клк, відносній вологості повітря 70% і 16-годинному фотоперіоді.

В якості селективних агентів використовували високомолекулярний (мол. маса 6000) ПЕГ та низькомолекулярний маніт, які додавали до модифікованого середовища МС. Для визначення селективних концентрацій маніту та ПЕГ калюс вирощували на середовищі з стресовими чинниками у наступних концентраціях: ПЕГ – 0; 2,5; 5; 10; 15; 20; 25 %; маніт – 0, 0,6; 0,8; 1,0 та 1,2 М. Калюси масою 10 мг висаджували в чашки Петрі (по 40 в кожній) у 5 повторностях. Після 4 тижнів вирощування оцінювали приріст маси калюсу та частку калусів, які зберегли здатність до морфогенезу. Кожен дослід повторювали тричі.

Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу [10].

Результати і обговорення

В ході досліджень аналізували наступні показники: відносний приріст сирі маси калусів та частоту утворення морфогенного калюсу на селективних середовищах з різною концентрацією осмотиків. На всіх середовищах, що містили ПЕГ, спостерігалось пригнічення росту калусів, зменшення приросту їх маси, а також відмічено появу некротичних плям темного забарвлення та загальне погіршення фізіологічного стану калюсу.

На рис. 1 представлено дані, які відображують відносний приріст сирі маси калюсу на середовищах з різною концентрацією ПЕГ. Інгібування росту культури було відмічене вже при концентрації осмотика 2,5 % та спостерігалось зниження приросту сирі маси калюсу до 88 % відносно контролю. При збільшенні концентрації ПЕГ приріст маси калюсу поступово зменшувався і на середовищі з самою високою концентрацією ПЕГ – 25% був найменшим. За цієї концентрації осмотика виживало менше 20% висаджених калусів.

Таким чином, при використанні селективного середовища з ПЕГ не вдалося досягти повного інгібування росту калюсу. Проте при найбільшій концентрації було відмічене суттєве зниження здатності до морфогенезу.

На рис. 2 представлено дані, які відображують відносний приріст калюсу на середовищах з різною концентрацією маніту. Використання маніту в концентрації 0,6 М викликало зниження приросту маси калюсу більш ніж у 2 рази, проте клітини залишались живими та зберігали здатність до регенерації рослин. При збільшенні концентрації осмотика до 0,8 М пригнічення росту було виражене ще сильніше – приріст сирі маси зменшився у 4

рази, крім того, на частині калюсів з'явилися зони некрозу. Маніт, починаючи з концентрації 0,8 М, повністю інгібував морфогенез. На середовищах з 1,0 та 1,2 М маніту росту калюсу практично не було, відмічена масова загибель клітин.

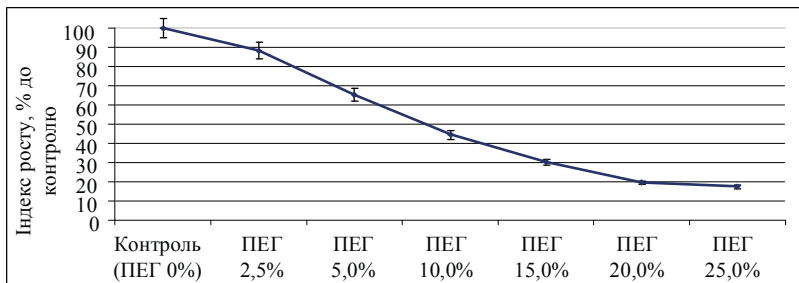


Рис. 1. Відносний приріст сирої маси калюсу пшениці на середовищах з різною концентрацією ПЕГ.

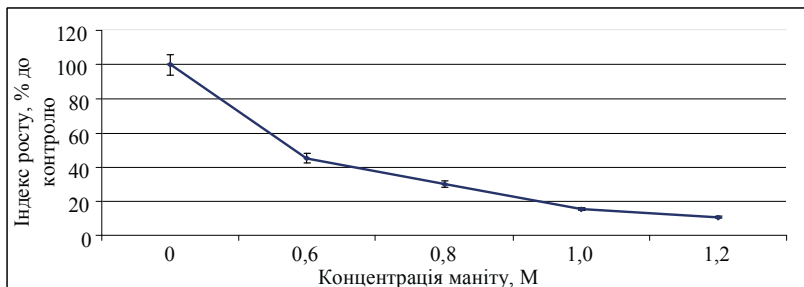


Рис. 2. Відносний приріст калюсу пшениці на середовищах з різною концентрацією маніту.

Обидва осмотики інгібували ріст калюсних тканин, проте в різній мірі. На середовищі з високим вмістом ПЕГ (20 %) приріст калюсу за місяць був у середньому в 5 разів меншим, ніж у контролі, а на середовищі з 0,8 М маніту – в 6-7 разів. Усі вивчені генотипи утворювали морфогенний калюс на живильних середовищах з різною концентрацією селективних чинників (рис.3, рис. 4).

Встановлено, що із збільшенням концентрації селективного агента частота утворення морфогенного калюсу поступово знижувалася. Проте навіть при найвищій концентрації ПЕГ- 25 % у калюсів не втрачалася здатність до морфогенезу. Разом з тим, подальшому збільшенню концентрації ПЕГ у поживному середовищі заважає його обмежена розчинність у воді, у зв'язку з чим, повної елімінації чутливих клітин досягти не вдалося. На відміну від селективних середовищ з ПЕГ на середовищах з манітом частота утворення морфогенного калюсу знизилася більш ніж у 2 рази вже за кон-

центрації 0,6 М, проте частина клітин залишилася живою і зберігала здатність до морфогенезу. Найнижчою частота утворення морфогенного калюсу спостерігалась на середовищі з концентрацією маніту 1 М, та складала 3%.

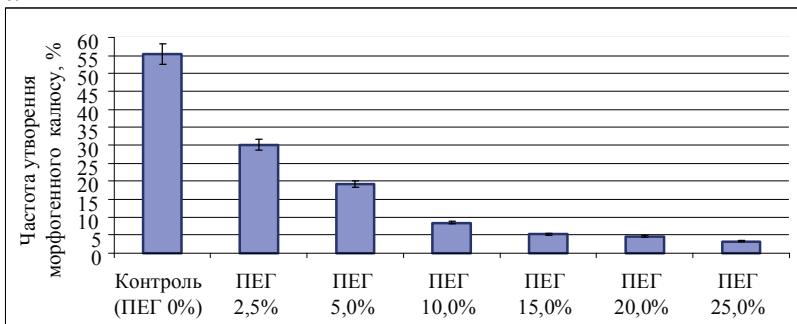


Рис.3. Частота утворення морфогенного калюсу на поживних середовищах з різними концентраціями ПЕГ.

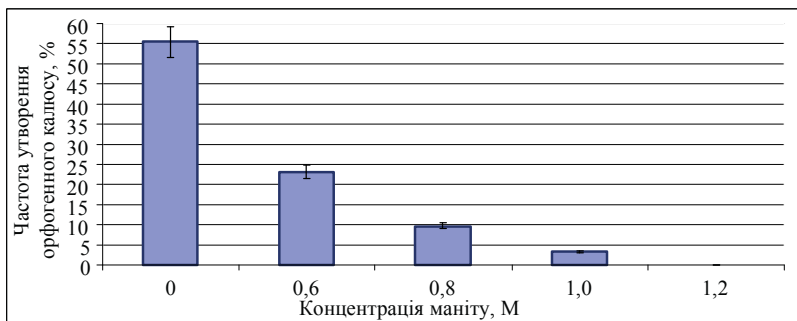


Рис.4. Частота утворення морфогенного калюсу на поживних середовищах з різними концентраціями маніту.

Калюсні інокулами (близько 10 мг) висаджували на поживне середовище, яке містило один із селективних факторів: ПЕГ в концентрації 20% або маніт у концентрації 0,8 М. Після місяця культивування інокулами, що зберігали здатність до активного росту знову пересаджували на селективне середовище, яке містило селективний чинник у тій же концентрації. Цей процес повторювали тричі. Після 3 циклів селекції на середовищі з ПЕГ доля виживших калюсів складала 15%, а за селекції на середовищі з манітом – 7%.

Із стійких клітин були регеновані рослини – 20 після добору калюсу на середовищі з ПЕГ та 8 після селекції на маніті. Більша частина отриманих рослин мала нормальну морфологію, проте зустрічалися регенеранти з деформованими листками та високим рівнем вітрифікації. Частіше

аномальні рослини отримували після селекції на середовищі з ПЕГ. Вони мали більш низьку життєздатність – більша частина загинула при пересадці в ґрунт на ранніх етапах онтогенезу. Регенеранти, отримані після селекції на середовищі з манітом, навпаки, добре прижилися в ґрунті. На підставі цих досліджень для проведення масової селекції *in vitro* доцільно застосувати систему добору, що базується на використанні в якості селективного агента маніту.

Таким чином, підібрана селективна система *in vitro*, спрямована на створення рослин, толерантних до водного стресу. Показано, що селективна система з манітом є більш ефективною, оскільки забезпечила більш повну елімінацію чутливих клітин та більш високу життєздатність рослин-регенерантів.

Робота виконувалась у рамках цільової програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальної основи молекулярних та клітинних біотехнологій».

Література

1. *Abdel-Ghany H., Nawar A, Ibrahim M., El-Shamarka S., Selim M., Fahmi A.* Using tissue culture to select for drought tolerance in bread wheat // New directions for a diverse planet: Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. – Brisbane, Australia, 26 Sep – 1 Oct. 2004.- P. 345.

2. *Bajji M., Lutts S., Kinet J.* Physiological changes after exposure to and recovery from polyethyleneglycol induced water deficit in callus cultures issued from durum wheat (*Triticum durum*) cultivars differing in drought resistance // J.Plant Physiol.- 2001.- v. 156.- P. 75-83.

3. *Barakat M., Abdel-Latif T.* *In vitro* selection for drought tolerant lines in wheat. 1. Effect of polyethylene glycol on the embryogenic cultures // J. Agric., 1995.- v.40.- P. 97-112.

4. *Barakat M., Abdel-Latif T.* *In vitro* selection for drought-tolerant lines in wheat. II. *In vitro* characterization of cell lines and plant regeneration// J. Agric. Res.-1995.- 40, N 1.- P. 167-190.

5. *Galovic V, Kotaranin Z. Dtnic S.* *In vitro* assessment of wheat tolerance to drought // Gtnetika .- 2005.- 37, N. 2.- P. 165-171.

6. *Hsissou D., Bouharmont J.* *In vitro* selection and characterization of drought-tolerant plants of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // Agronomie.-1994, N 2.- P.65-70.

7. *Kondic-Špika A. Šesek S.* Korišćenje kalusne kulture za ispitivanje tolerantnosti genotipova pšenice prema suši // Selekcija i semenarstvo.-2000.-7.N1-2.- P. 57-59.

8. *Abdel-Hady M., Hoda M., El-Naggar H.* Wheat Genotypic Variation and Protein Markers in Relation with *In Vitro* Selection for Drought Tolerance// J. of Applied Sciences Research.- 2007.- 3, N 10.- P. 926-934.

9. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Planta.-1962.- vol.15.-P.473-497.

10. *Лакін Г.Ф.* Биометрия –М.: Высшая школа, 1990. –352 с

Резюме

З метою добору конкретних умов проведення селекції *in vitro* на стійкість до водного дефіциту були апробовані дві селективні системи – з високомолекулярним непроникаючим у клітину поліетиленгліколем та низькомолекулярним проникаючим манітом. Показано, що селективна система з манітом є більш ефективною, оскільки забезпечила більш повну елімінацію чутливих клітин та більш високу життєздатність рослин-регенерантів.

С целью подбора конкретных условий проведения селекции *in vitro* на устойчивость к водному дефициту были апробированы две селективные системы – с высокомолекулярным непроникающим в клетку полиэтиленгликолем и низкомолекулярным проникающим маннитом. Показано, что селективная система с маннитом более эффективна, поскольку обеспечила более полную элиминацию чувствительных клеток и более высокую жизнеспособность растений-регенерантов.

In order to select the specific conditions of the *in vitro* selection for resistance to water deficit two selective systems have been tested – with polyethyleneglycol highmolecular non-penetrating into the cell and with low molecular weight penetrating mannitol. Our results show that the selective system with the mannitol is more effective, because it provided more complete elimination of sensitive cells and higher viability of regenerated plants.

**ЗИМИНА О. В.^{1,2}, СЫТНИК Е. С.¹, ВДОВИЧЕНКО Ж. В.¹,
АЛХИМОВА Е. Г.², СПИРИДОНОВ В. Г.¹, ПАРИЙ М. Ф.¹**

*1Українська лабораторія якості та безпеки продукції АПК
Національного університету біоресурсів і природопольовання України,
Україна, 03044, Київ, ул. Героїв Оборони, 15,*

e-mail: Zim4i4ek@yandex.ua, pariityroslav@gmail.com

*2Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ, ул. Академіка Заболотного, 150*

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ ARABIDOPSIS THALIANA ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЯВЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ

Под явлением соматической сегрегации понимают расхождение во время митоза гомологичных хромосом по типу первого деления мейоза. К нему относят соматическую редукцию, мейозоподобную редукцию и разделение хромосом на стадии профазы на две или более групп (профаз-группинг). Случаи соматической сегрегации наблюдали в различных тканях как полиплоидных, так и диплоидных растений разных видов (Huskins, Chounrad, 1950). Особый интерес вызывает индуцирование соматической редукции различными физическими и химическими факторами (Константинов, 1970). Также это явление наблюдали в клетках, культивируемых *in vitro* (Кунах, 1970; Nuti Ronchi et. al., 1992). За небольшим исключением, например изучение гомозиготации клеток моркови, культивируемых *in vitro*, с помощью RAPD-маркеров (Giorgetti et. al., 1994) и растений риса у которых была обнаружена потеря гетерозиготности (LOH) (Wang et al.,

2001), большая часть исследований данного явления проводилось в середине 20-го столетия с помощью обычной световой микроскопии. Однако такой подход позволяет лишь производить наблюдения и не дает возможности исследовать молекулярные механизмы, причины и генетические последствия данного явления. Следствием этого является отсутствие информации по поводу гомологичной рекомбинации хромосом, закономерностей распределения материнского и отцовского геномов в дочерние клетки, поведения образовавшихся дочерних клеток в дальнейшем. Применение современных методов и технологий (трансгенез, флуоресцентная микроскопия, ДНК маркирование) может позволить раскрыть новые неизвестные аспекты рассматриваемого явления.

В попытках найти ответы на перечисленные вопросы мы предлагаем создать модельный гибрид *Arabidopsis thaliana* с маркерами-трансгенами на гомологичных хромосомах, что позволит изучать последствия соматической сегрегации в колониях клеток, культивируемых *in vitro*, и у регенерирующих растений с помощью наблюдений за экспрессией маркерных трансгенов и системы ДНК маркеров.

Материалы и методы

Растительный материал, бактериальные штаммы и векторы. Использовались линии *Arabidopsis thaliana* экотипов *Columbia* (№1093, NASC) и *Landsberg erecta* (№1298, NASC). Растения выращивались в условиях закрытого грунта (рН 5.6 – 5.8) и 16 часового светового периода. Для стимуляции развития множественных стрелок и увеличения количества зазываемых семян первичные стрелки необходимо удалять. Для трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 с бинарными векторами pCAMBIA 2301 и 1302 (рис. 1).



Рис. 1. Схемы участков Т-ДНК векторов для трансформации. LB, RB – левая и правая границы Т-ДНК, соответственно, *nos* – ген нопалин синтазы, *nptII* – ген неомицинофосфотрансферазы, *35S prom* – промотор вируса мозаики цветной капусты, *gusA* – ген β-глюкоронидазы, *hptII* – ген гигромицин фосфотрансферазы, *gfp* – ген белка, флуоресцирующего зеленым.

Генетическая трансформация растений. Растения трансформировали согласно методу Clough and Bent, 1998, путем погружения почек в суспензию *A. tumefaciens*. Бактерию наращивали в течение 1-2 дней на шейкере при 28°C в жидкой среде LB (Bertani, 1951) с добавлением 50 мг/л ампицилина, 25 мг/л рифампицина и 25 мг/л гентамицина. Культуру бактерий центрифугировали при 5000 об/с в течение 5 минут и ресуспендировали в 5% растворе сахарозы до достижения оптической плотности 0.8 при 600 нм. Перед погружением почек в раствор с ресуспендированной бактери-

ей добавляли Silwet L-77 в концентрации 0.05%. После инокуляции растения накрывали полиэтиленовыми камерами и выдерживали при повышенной влажности в течение 48 часов, а затем выращивали в условиях длинного дня до получения семян.

Селекция трансформированных растений. Семена стерилизовали 2 мин. в 70% EtOH, 15 мин в растворе белизны (1:2), промывали 5-6 раз в стерильной дистиллированной воде и высаживали на питательную среду MS (Murashige and Skoog, 1962), содержащую 50 мг/л канамицина (вектор 2301) либо 15 мг/л гирномицина (вектор 1302). Зеленые устойчивые растения пересаживали в землю для получения семян.

Анализ экспрессии трансгенов. Экспрессию гена *gusA* определяли с помощью гистохимической реакции согласно Jefferson et al., 1987. Проростки и части органов растений помещали на 24 ч при 37°C в реакционный буфер, содержащий 0.1 % 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-глюкоронидазу (X-Gluc). О наличии экспрессии свидетельствовало появление синей окраски тканей. Детекция экспрессии гена *gfp* проводилась с помощью микроскопа Zeiss Axiostar Plus, фильтр Filter Set 44 (Carl Zeiss).

Результаты и обсуждения

Для решения поставленных задач модельная система должна обладать совокупностью определенных характеристик. Растения *A. thaliana* имеют небольшой размер, малое число хромосом, короткий онтогенез, дают много семян, для него отработаны методы культивирования клеток *in vitro* и регенерации, а также легкий и быстрый способ получения трансформантов, разработана технология идентификации генотипов с помощью ДНК-маркеров. Таким образом, этот модельный объект удовлетворяет почти всем необходимым критериям. Практически единственным недостатком данного растения для наших задач является малый размер хромосом и невозможность в результате этого проводить стандартные цитогенетические исследования такого неоднозначного явления как соматическая сегрегация. Однако нашей основной целью как раз является не цитогенетические наблюдения, а изучение генетических последствий данного явления, для чего в колониях клеток протопластов и у растений регенерантов модельного гибрида предполагается проследить поведение гомологичных хромосом с помощью анализа наследование трансгенов, внесенных в гомологичные хромосомы гибрида, а также используя системы ДНК-маркеров. Ключевые моменты, которые нам хотелось бы проследить в дальнейшем – это процесс рекомбинации гомологичных хромосом и закономерности их распределения между дочерними клетками.

Модельный гибрид между экотипами *Columbia* и *Landsberg erecta* с парой гомологичных хромосом, маркированных трансгенами, позволит обнаруживать колонии клеток и/или растения-регенеранты – производные клеток, образовавшихся в результате соматической сегрегации и значит унаследовавшие только одну из пары гомологичных хромосом. Для осу-

ществления поставленных целей необходимо выполнение следующих этапов работы (рис. 2).

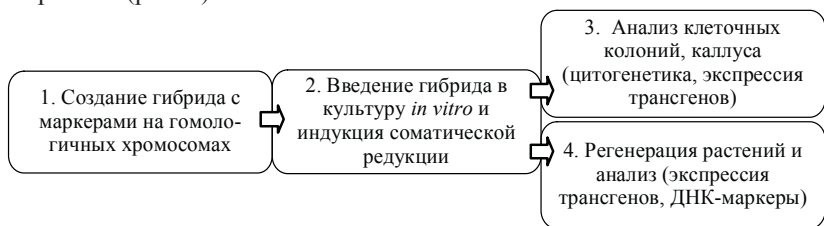


Рис. 2. Схема экспериментов по изучению соматической редукции с помощью модельного гибрида.

В результате работы получены линии *A. thaliana* экотипа Columbia, содержащие селективный ген устойчивости к канамицину (*nptII*) и репортерный ген *gusA* и линии экотипа Landsberg с трансгенами устойчивости к гигромицину (*hptII*) и *gfp*. Чтобы удостовериться в стабильной экспрессии трансгенов в поколениях и получить растения, гомозиготные по вставкам, было проведено 3 цикла самоопыления и проращивания семян на селективных средах (рис. 3).

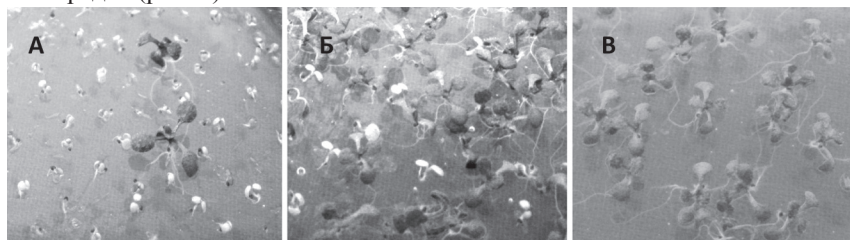


Рис. 3. Проращивание семян на селективной среде, содержащей 50 мг/л канамицина. Зеленые растения устойчивы к селективному агенту, белые – чувствительны. А – отбор трансформированных растений поколения T0. Б – Менделевское расщепление в поколении T1 (3:1). В – поколение T3 – отсутствие расщепления, гомозигота по селективному гену.

Для поставленных целей необходимо иметь линии со стабильной сильной экспрессией репортерных генов. Степень экспрессии *gusA* в проростках и взрослых растениях полученных трансформированных линий была различной (рис. 4). GUS-активность была обнаружена в клетках листьев и меристемы корней. Для создания гибрида отбирались линии с интенсивной окраской. Всего получено 6 гомозиготных линий с сильной экспрессией гена *gusA*.

Экспрессия гена *gfp* обнаруживалась в тканях листьев трансформантов при облучении ультрафиолетовым излучением (рис. 5).



Рис. 4. Гистохимический анализ экспрессии гена *gusA*. 1-й лист – дикий тип, 2 – 4-й – трансформанты, интенсивность окраски свидетельствует о силе экспрессии гена *gusA*.

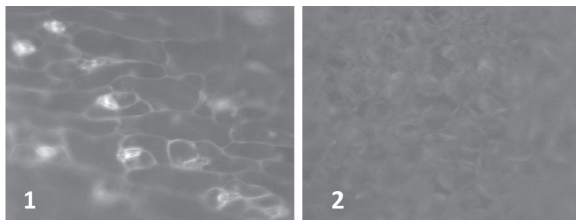


Рис. 5. Анализ экспрессии гена *gfp* в тканях листьев растений под микроскопом Zeiss Axiostar Plus, 100× увеличение. 1- трансформированное растение, 2- контроль.

Существуют предположения, что соматическая редукция возникает, как причина либо следствие соматического эмбриогенеза, а также может иметь эволюционные функции регулирования уровня ploидности соматических клеток растений в природе (Nuti Ronchi et al., 1992; Giorgetti et al., 1995). Для понимания факторов, которые управляют этим процессом и регулируют его на молекулярном уровне, необходимы дальнейшие исследования как в культуре *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, явление соматической редукции может найти колоссальное прикладное применение для получения гомозиготных линий с целью использования в селекции растений, однако для этого необходимо провести его фундаментальное изучение.

Литература

1. Константинов А.В., Тимошенко М.К., Шарено Т.И. В сб. “Генетика и цитология”. Минск, 1970, 184-193.
2. Кунах В.А. Цитогенетическая характеристика культуры ткани гаплопапуса // В.кн.: Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. – М.: Наука, 1970, 155-158.
3. Bertoni G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* J. Bacteriol. 1951, 62: 293-300.
4. Giorgetti L.; Vergara M. R.; Evangelista M.; Lo Schiavo F.; Terzi M.; Nuti-Ronchi V. On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures. Mol. Gen. Genet. 1995, 246:657–662.
5. Clough S.J., Bent A.F. Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* // Plant J. 1998., V. 16. P. 735-743.

6. *Gottschalk W.* 1958. *Z. Vererbungs*, 89, 204-215.
7. *Huskins C.L., Chounrad L.* Somatic reduction: diploid and triploid roots and a diploid shoot from a tetraploid *Rhoeo*. *Genetics*, 1950, 35, 115.
8. *Murashige, T.; Skoog, F.* A Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962, 15:473–479.
9. *Nuti-Ronchi V., Giorgetti L., Tonelli M., Martini G.* Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. I. Prophase chromosome reduction. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1992a, 30:107–114.
10. *Nuti-Ronchi V., Giorgetti L., Tonelli M., Martini G.* Ploidy reduction and genome segregation in cultured carrot cell lines. II. Somatic meiosis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 1992b, 30:115–119.
11. *Richard R.-C., Wang., Xiaomei Li., N. Jerry Chatterton* A proposed mechanism of loss of heterozygosity in rice hybrids. *Euphytica*, 2001, 118:119-126.

Резюме

Созданы линии *Arabidopsis thaliana* экотипа Columbia и Landsberg erecta с парой гомологичных хромосом, маркированных трансгенами, для их дальнейшего скрещивания и получения гибрида с целью исследования поведения гомологичных хромосом и изучения генетических последствий соматической редукции в культуре *in vitro* и *in vivo*.

Створені лінії *Arabidopsis thaliana* екотипів Columbia и Landsberg erecta з парою гомологічних хромосом, до яких внесені транс гени-марери, для подальшого схрещування і отримання гібриду з метою дослідження поведінки гомологічних хромосом і вивчення генетичних наслідків соматичної редукції в культурі *in vitro* та *in vivo*.

Lines of *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia and Landsberg erecta with a pair of homologous chromosomes, marked with transgenes, are designed for further crossing and creating of hybrids to study the behaviour of homologous chromosomes and the genetic consequences of somatic reduction *in vivo* and *in vitro* culture.

**КАРПОВА І.С., БУРНАШЕВА М.В., *САЩУК О.В., *ГЕТЬМАН К.І.,
**ПАЛЬЧЕВСЬКА О.Л., НЕГРУЦЬКА В.В., КОЦАРЕНКО К.В., ЛИЛО В.В.,
ЛУКАШ Л.Л.**

*Институт молекулярної біології та генетики НАН України,
03143, Україна, Київ, вул. Заболотного, 150,*

** Інститут мікробіології та вірусології НАН України, Київ, вул. Заболотного, 154,*

***Київський Національний університет ім. Тараса Шевченка*

ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ У МУТАНТНОГО ШТАМУ *VACILLUS SUBTILIS* ЗА НАЯВНОСТІ В ЙОГО ГЕНОМІ ALU–ПОВТОРУ ЛЮДИНИ

На сьогоднішній день велику увагу вчених привертають мембранно активні вуглеводзв'язуючі білки – лектини, які відіграють важливу роль в процесах біологічного впізнавання, присутні в будь-яких біологічних сис-

темах, характеризуються своїми поліфункціональними властивостями та використовуються в різних галузях біології та медицини [1-4].

Останнім часом лектини досліджуються як фармакологічно активні реагенти з діагностичними, антивірусними, імуномодулюючими та протипухлинними властивостями. Перспективними у цьому відношенні є нещодавно відкриті лектини сапрофітних бацил, для яких показано направлену дію на імунну відповідь макроорганізму та на індукцію гамма-інтерферону [2, 3].

В нашій попередній роботі за допомогою рекомбінантних плазмід були одержані генетично нестабільні мутанти *Bacillus subtilis*, які містили послідовність *Alu*-повтору геному людини [5]. Вони виявляли високу адаптивність до несприятливих умов вирощування. У поколіннях одержаних *Alu*-інтегрантів *B. subtilis* привернули увагу особливі колонії великого розміру, діаметр яких у 3-5 разів перевищував стандартний. Такий фенотип свідчив про суттєві порушення процесів росту або контактного гальмування [5].

Відомо, що *Alu*-повтори не кодують білків, але у їх складі знайдено енхансероподібні структури, сайти зв'язування транскрипційних факторів, промотор РНК-полімерази та інші регуляторні послідовності, які можуть впливати на функціонування генів. У літературі обговорюють участь *Alu*-повторів у молекулярних механізмах нестабільності геному людини при канцерогенезі, оскільки їх знаходять поблизу локусів, що активно транскрибуються, а також у місцях, де виникають розриви та перебудови ДНК [7].

Метою роботи було дослідити, чи існує зв'язок між порушенням ростових характеристик нестабільного *Alu*-інтегранта *B. subtilis* та його здатністю до продукування позаклітинних лектинів, які можуть бути причетними до регуляції ростових процесів.

Матеріали і методи

Бактеріальні штами. Об'єктами дослідження були: стандартний штам *B. subtilis* Lys-42 з колекції ЛІЯФ ім. Константинова РАН, який слугував контролем, та похідний від нього штам ІМБГ 187-31 з колекції відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Контрольний штам *B. subtilis* Lys-42 має ауксотрофну мутацію за лізином, похідний від нього штам *B. subtilis* ІМБГ 187-31 має додаткову ауксотрофну мутацію за орнітином.

Умови культивування. Для продукування лектинів бактерії культивували на рідкому модифікованому поживному середовищі Гаузе згідно [3]. Через кожні 2 год відбирали проби, клітини відділяли від культурального середовища центрифугуванням при 6000 g упродовж 20 хв та тричі відмивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР).

Визначення ГАА. Звільнену від клітин культуральну рідину використовували для визначення гемаглютинуючої активності лектинів (ГАА), яку проводили із залученням трипсинізованих і фіксованих глутаровим альдегі-

дом еритроцитів кроля шляхом двократних серійних розведень в 96-лункових полістирольних мікропланшетах з U-подібними лунками за кімнатної температури. ГАА визначали як останнє розведення, за якого ще спостерігається реакція гемаглютинації [8]. Для запобігання помилок, пов'язаних з автоаглютинацією еритроцитів, ставили контроль, де до 2 % розчину еритроцитів у фізіологічному розчині додавали еквівалентний об'єм поживного середовища.

Вуглеводну специфічність лектинів досліджували в реакції пригнічення гемаглютинації [8] з використанням низки вуглеводів: 1 – рамноза; 2 – D-галактоза, 3 – N-ацетил-D-галактозамін, 4 – D-лактоза; 5 – D-глюкоза, 6 – D-маноза, 7 – D-глюкозамін; 8 – муцин. Додатково дослідили дію двох гліканів – компонентів міжклітинного матриксу: 9 – хондроїтин А, 10 – гіалуронова кислота. Всього було використано десять вуглеводів.

Електрофоретичний аналіз білків проводили у системі ПААГ – ДСН за Леммлі з використанням 12 %-го гелю. Білкові фракції візуалізували фарбуванням гелів 0,25 % Кумасі блакитним R-250 [9]. Для визначення молекулярних мас використовували маркерні білки Fermentas Protein Molecular Weight Marker. Для аналізу отриманих денситограм застосовували програму TotalLab v 2.01.

Результати досліджень

Дослідження продукування позаклітинних лектинів в динаміці росту виявило певні міжштамові відмінності.

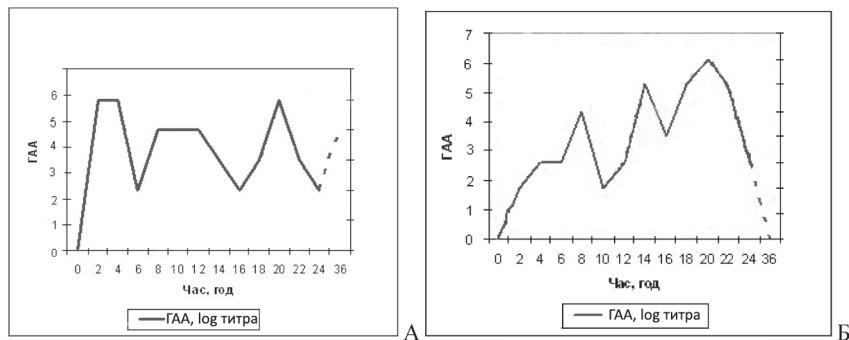


Рис. 1. Лектинова активність контрольного та мутантного штамів *B. subtilis* на середовищі Гаузе: А – контрольний штам *B. subtilis* Lys-42, Б – мутантний штам *B. subtilis* ІМБГ 187-31

Гемаглютинуюча активність описується кривими складної форми, де підйоми чергуються зі спадами. Розчинна форма лектину швидко з'являється і вже на 2 год культивування контрольного штаму *B. subtilis* Lys-42 досягає максимального значення (рис. 1 А). Загалом підйоми активності відображені трьома піками, які розподілились у часі за інтервалом 2, 12 та 22 год. Максимальна інтенсивність реакції з еритроцитами за різно-

го терміну культивування не мала суттєвих відмінностей і досягала величини 5-6 ГАО. У дослідного штаму *B. subtilis* ІМБГ 187-31 крива лектинової активності представлена трьома яскраво вираженими піками (рис. 1 Б). Розчинна форма лектину з'являється на 2 год, проте першого піка досягає лише через 8 год культивування. Після зниження активність лектину знову зростає і досягає піка на 16 год. В цей час у контролі спостерігається падіння ГАА. Інтенсивність реакції з еритроцитами за різного терміну культивування у мутантного штаму підвищується від 4 до 6 ГАО.

Дослідження вуглеводної специфічності лектинів (після 22 год росту) із застосуванням восьми вуглеводів виявило як спільні риси, так і відмінності мутантного штаму *B. subtilis* ІМБГ 187-31 від контролю – штаму *B. subtilis* Lys-42 (табл.). За класичною класифікацією лектини поділяють на 4 групи в залежності від положення гідроксилу при третьому (C_3) та четвертому (C_4) атомах вуглецю, а також D- чи L-форми піранозного кільця вуглеводу. В культуральній рідині обох штамів виявляється сіалоспецифічний лектин, гемаглютинуюча активність якого інгібується муцином. Цей лектин є характерним для штаму *B. subtilis* дикого типу і останнім часом отримав застосування в медицині як противірусний препарат.

У досліджуваного штаму *B. subtilis* ІМБГ 187-31 з'являється відмінна вуглеводна специфічність, про що свідчить інгібування ГАА рамнозою, яка відноситься до групи фукози (І група), галактозою та її похідними (ІІ група), а також гіалуроновою кислотою, яка належить до складних гліканів.

Таблиця

Порівняння вуглеводної специфічності лектинів штамів *B. subtilis* Lys-42 та ІМБГ 187-31

Вуглевод	<i>B. subtilis</i> Lys-42	<i>B. subtilis</i> ІМБГ 187-31
1 – рамноза (І група)	-	+
2 – D-галактоза (ІІ група)	-	+
3 – N-ацетил-D-галактозамін	-	+
4 – D-лактоза	-	+
5 – D-маноза (ІІІ група)	-	-
6 – D-глюкоза	-	-
7 – D-глюкозамін	-	-
8 – муцин (ІV група)	+	+
9 – хондроїтин А	+	+
10 – гіалуронова кислота	-	+

- – вуглевод не має інгібіторних властивостей; + – вуглевод є інгібітором лектинової активності

Специфічність до представників вуглеводів І групи є досить рідкісною серед мікроорганізмів. Найбільш відомим представником бактеріальних лектинів, які мають таку специфічність, є лектин зв'язаної

форми РА-II (*P. aeruginosa*) [2]. Специфічності до вуглеводів II групи (D-галактоза, N-ацетил-D-галактозамін, D-лактоза) лектини штаму *B. subtilis* дикого типу та контрольного штаму *B. subtilis* Lys-42 не виявляють.

Однак таку специфічність мають поширені лектини тваринного походження – галектини, які регулюють міжклітинну адгезію і взаємодію клітин з міжклітинним матриксом. Хоча механізм дії галектинів до кінця ще не вивчений, припускають, що вони беруть участь у регуляції процесів росту і причетні до злоякісної трансформації [4].

Для лектинів характерним є структурно-функціональний поліморфізм, який потребує подальших досліджень.

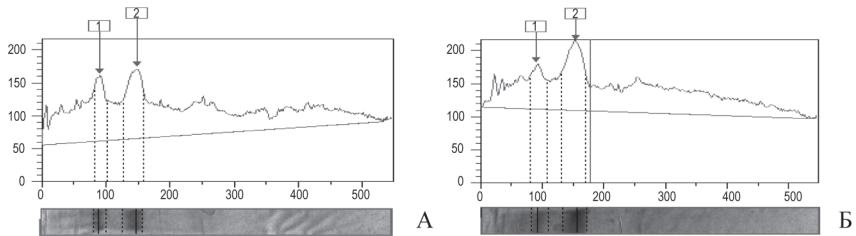


Рис. 2. Електрофореграми і денситограми білків зв'язаної форми контрольного та мутантного штамів *B. subtilis* (1- 55 кДа, 2 – 42 кДа): А – контрольний штам *B. subtilis* Lys-42, Б – мутантний штам *B. subtilis* ІМБГ 187-31.

Крім розчинних лектинів були досліджені також білки зв'язаної форми контрольного та мутантного штамів *B. subtilis*. Профіль цих білків характеризувався наявністю двох мажорних білкових зон з молекулярною масою 55 і 42 кДа, відображених на денситограмі окремими піками (рис. 2 А, Б).

Як видно з сенситограм (за площею піків), у досліджуваного мутантного штаму білок, що відповідає піку 2, має вихід у 2,5 рази більший, ніж у контрольного. За своїми характеристиками цей білок нагадує димер сіалоспецифічного лектину з молекулярною масою субодиниці близько 20 кДа [3].

Висновки. Показано, що у мутанта *B. subtilis* ІМБГ 187-31, який містить вставку Alu-повтору геному людини і характеризується порушенням росту, змінюється динаміка продукування позаклітинних лектинів і спектр їх вуглеводної специфічності. Поява нової вуглеводної специфічності до рамнози і галактози свідчить про вплив мутації на поліморфізм лектинів.

Література

1. Луцук М. Д., Панасюк Е. Н., Луцук А. Д. Лектини. – Львов: Вища школа, 1981.–152с.
2. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Лектины бактерий. – Киев: Наук. Думка, 1992. – 202 с.
3. Коваленко Е.О. Позаклітинні лектини бактерій роду *Bacillus*: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня док. біол. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія». – Київ, 1999.–36 с.

4. Антонюк В.О. Лектины та їх сировинні джерела – Львів:, Друкарня ЛНМУ ім. Данила Галицького, 2005. – 554 с.

5. Карпова И.С., Горovenko Н.Г., Подольская С.В., Россоха З.И. и др. Инсерционный механизм ДНК-мутагенеза // Вісн. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2006, том 4, № 1. – С. 124-128.

6. Карпова И.С., Кузьменко О.Л., Негруцька В.В., Пальчиковська Л.Г., Позур В.К., Лукаш Л.Л. Аналіз методом RER-ПЛР нестабільних мутантів *Bacillus subtilis* з порушеннями росту за наявності в їх геномі інсерції Alu-повтору людини // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. – 2010. – № 19 – С. 213 – 219.

7. Batzer M.A., Deininger P.L. Alu repeats and human genomic diversity // Nature reviews. – 2002. – Vol 3. – P. 370-380.

8. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Антонюк В.А. Методы поиска лектинов (фитогемагглютининов) и определение их иммунохимической специфичности: Методические рекомендации для биохимиков и иммунологов. – Львов, 1980. – 20 с.

9. Методы очистки белков: [ред. Р. Скоупс]. – М.: Мир, 1985. – 358 с.

Резюме

У мутанта *B. subtilis* з порушеннями росту, що має інсерційну послідовність Alu-повтору з геному людини, змінюється динаміка продукування позаклітинних лектинів і спектр їх вуглеводної специфічності. Поява нової специфічності до рамнози і галактози свідчить про вплив мутації на поліморфізм лектинів.

У мутанта *B. subtilis* с порушеннями процесу росту, що містить інсерційну послідовність Alu-повтора геному людини, змінюється динаміка біосинтезу внеклітинних лектинів і спектр їх вуглеводної специфічності. Визначення нової специфічності к рамнози і галактози свідчить про вплив мутації на поліморфізм лектинів.

The *B. subtilis* mutant strain with growth disorders which has insertion of Alu-repeat from human genome shows changes in the dynamics of extracellular lectins production and their carbohydrate specificity. The new specificity to rhamnose and galactose may be the result of the mutation effect on lectins polymorphism.

**КАТЫШЕВ А.И., ШМАКОВ В.Н., ЧЕРНИКОВА В.В., СИДОРЧУК Ю.В.,
ДЕЙНЕКО Е.В., КОНСТАНТИНОВ Ю.М.**

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Россия, 664033,
Иркутск, ул. Лермонтова, 132, e-mail: yukon@sifibr.irk.ru*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ ТАБАКА КОНСТРУКЦИЕЙ С ИНТЕГРАТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ И ОТБОР КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ТРАНСГЕННЫМИ МИТОХОНДРИЯМИ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИЦИНУ А

До настоящего времени как фундаментальные исследования структурно-функциональной организации генома митохондрий с применением современных подходов молекулярной генетики и молекулярной биологии, так и прикладные работы по переносу генов в геном этих органелл с целью решения конкретных задач биотехнологии и биомедицины практически не-

осуществимы в связи с отсутствием системы генетической трансформации этих органелл. В принципе, решением данной проблемы может стать разработка системы генетической трансформации растительных митохондрий, основанная на использовании генетического вектора с геном устойчивости к ингибиторам дыхания, действующим на уровне дыхательного комплекса III растительных митохондрий: антимицину А и миксотиазолу [1,2].

Целью настоящей работы было исследование возможности получения трансформированных митохондрий табака путем введения в системе *in vivo* методом биобаллистической трансформации ДНК митохондриального генетического вектора, несущего в качестве селективного гена ген устойчивости к антимицину А.

Материалы и методы

Схема конструкции митохондриального генетического вектора с интегративными свойствами представлена на рис. 1. Этапы работы по получению конструкции выполнялись как описано в [3, 4] с использованием праймеров, перечисленных в табл.1. Детальное описание получения вектора NtPcob-sod IGR-cob* дано в работе [5].

Таблица 1

Олигонуклеотиды, использованные для создания генетической конструкции NtPcob-sod-IGR-cob*

Название	Последовательность олигонуклеотида (5'→3')	Ожидаемый ПЦР-продукт
Zm1CL	ATGGGGGTGACGACGGTCACA	sod3.1 кукурузы
Zm1CR	TCAAGCAAGAACATTTTCGTACACCT	
ricL	TCAGGGCGCAGCGAAGCCA	5'-область гена <i>cob</i> табака
ricR	TTATTTATTTATCTTTTCTATCGTGACA	
3IRaL	TCGAAGAAAGAAGGTTTCCATTCA	<i>atp9/orf262</i> межгенный участок митохондриального генома арабидопсиса
3IRaR	AATTTAAGTTTCGAGTGTGATCAAA	
cobL	ATGACTATAAGGAACCAACGACTCTCT	Транслируемая последовательность кДНК гена <i>cob</i> табака
cobR	TCAGGTGTGATCAGTCTCATCCGT	
GtoVdir	TCGTTAGCTGTTATTTGTTTAGT	Участок гена <i>cob</i> табака с мутацией (G43V)
GtoVcom	ACTAAACAATAACAGCTAACGA	

Трансформацию клеточной культуры проводили с помощью генной пушки PDS-1000/He System (BioRad), как описано нами ранее в работе [5].

Результаты и обсуждение

Для создания генетической конструкции для трансформации митохондрий табака *in vivo* были получены и клонированы последовательности кДНК генов супероксиддисмутазы (*sod3.1*) кукурузы и апоцитохрома b (*cob*) табака, а также последовательности 5'-области гена *cob* табака и

межгенного участка *atp9/orf262* митохондриального генома арабидопсиса (рис. 1).

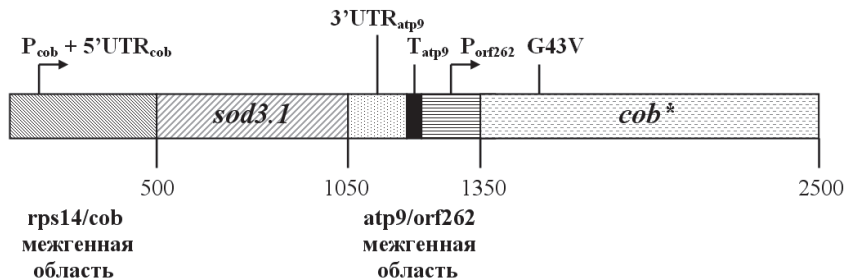


Рис. 1. Схема использованной в работе генетической конструкции NtPcob-sod3.1-IGr-cob*. Обозначения: *cob*- ген апоцитохрома b *Nicotiana tabacum*, *cob** – модифицированный ген *cob*, *sod3.1* – ген Mn-содержащей супероксиддисмутазы кукурузы, IGR – межгенный участок *atp9-orf262* *A. thaliana*.

В структуру клонированной кДНК гена *cob* табака с помощью метода ПЦР с перекрывающимися праймерами была введена мутация, определяющая замену в транслируемой пептидной последовательности аминокислоты глицин в 43 положении на валин. Такая модификация структуры кДНК гена *cob* табака должна придавать на основании данных работ [1, 2] устойчивость к действию антибиотика антимицина А в трансгенных каллусных линиях.

Селекцию трансформированных клеток табака проводили на основе системы, предложенной в работе [1] с нашими модификациями [6]. Для этого кусочки каллуса примерно одного размера от каждого образца, подвергнутого биобаллистической трансформации, параллельно помещали на селективную и контрольную среду (рис. 2А).

В конце периода культивирования, составлявшего 28 дней, проводили оценку ростовой активности каллуса на селективной и контрольной средах (рис. 2Б). Как видно из представленного рисунка, скорость роста отдельных каллусных линий на используемых средах различна. Сравнительно одинаковая ростовая активность каллуса на селективной и контрольной средах является, возможно, результатом экспрессии модифицированного гена *cob* (*cob**) в составе используемой нами генетической конструкции.

Отметим, что в конструкции NtPcob-sod3.1-IGr-cob* помимо модифицированного гена *cob* содержится ген Mn-содержащей супероксиддисмутазы (*sod3.1*). Продукт этого гена осуществляет важную функцию регуляции уровня активных форм кислорода в этих органеллах. В связи с этим в настоящее время нами проводится анализ экспрессии этого гена. В случае, если удастся достигнуть его эффективной экспрессии в полученных нами каллусных линиях, последние можно использовать в качестве информатив-

ной модельной системы для изучения роли антиоксидантной системы митохондрий в биогенезе клетки и всего организма.

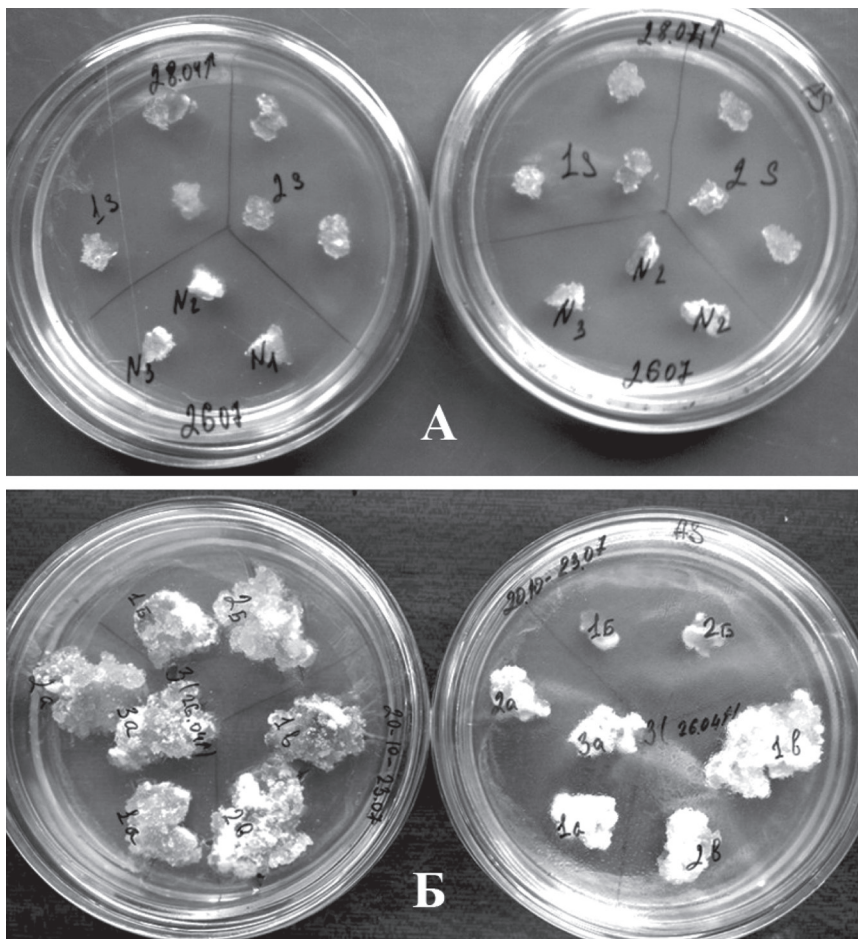


Рис. 2. Селекция трансформированных каллусных культур табака генетической конструкцией *NtPcob-sod3.1-IGr-cob**. Каллусная культура табака N (контроль) и S (получена из листовых высечек, подвергшихся биобаллистической трансформации) на среде Мурашиге-Скуга (МС) (левый образец) и МС + антимицин А 20 мкМ + салицилгидроксамовая кислота 0,25 мМ (правый образец) в начале эксперимента (А) и спустя 1 месяц после начала культивирования (Б).

Видны различия в ростовой активности каллусов на селективной среде.

Выводы

Получена векторная генетическая конструкция с интегративными свойствами NtPcob-sod3.1-IGr-cob* для трансформации митохондрий табака.

Путем биобаллистической трансформации каллусной культуры табака митохондриальной конструкцией NtPcob-sod3.1-IGr-cob* и последующего отбора клеточных линий по устойчивости к ингибитору дыхательного комплекса III антимицину А получены линии, сохраняющие высокую скорость роста в присутствии этого ингибитора в отличие от контрольных нетрансформированных линий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 09-04-00992 и Сибирского отделения Российской академии наук (междисциплинарные интеграционные проекты №№ 7, 83, 98).

Литература

1. Ortega V.M., Bohner J.G., Chase C.D. The tobacco apocytochrome b gene predicts sensitivity to the respiratory inhibitors antimycin A and myxothiazol // *Curr. Genet.* – 2000. – vol. 37, № 5. – P. 315-321.

2. Remacle C., Cardol P., Coosemans N., Gaisne M., Bonnefoy N. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas mitochondria* can be used to insert mutations in complex I genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – vol. 103, № 12. – P. 473-497.

3. Тарасенко В.И., Камышев А.И., Кобзев В.Ф., Константинов Ю.М. Сравнительная характеристика ядерной и митохондриальной ДНК-топоизомеразы I кукурузы // *Молекуляр. Биология.* – 2008. – т. 42, № 1. – С. 88-95.

4. Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N., Neale D.B., Moran G.F. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // *Theor. and Appl. Genet.* – 1996. – vol. 92, № 3. – P. 673-679.

5. Камышев А.И., Шмаков В.Н., Черникова В.В., Сидорчук Ю.В., Дейнеко Е.В., Константинов Ю.М. Трансформация митохондрий табака генетической конструкцией с интегративными свойствами и отбор клеточных линий с трансгенными митохондриями по устойчивости к антимицину А // *Изв. Иркутского госуд. университета. Серия «Биология. Экология.* – 2010. – т.2, № 3. – С. 13-19.

6. Шмаков В.Н., Константинов Ю.М. Изучение возможности использования антимицина А при селекции растительных клеток, несущих трансформированные митохондрии // *Матер. Всероссийской научн. конф. «Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды»* (24-28 августа 2009 г.). Иркутск. – 2009. – С. 530-533.

Резюме

Осуществлена попытка генетической трансформации митохондрий табака путем введения интегративного вектора с геном устойчивости к антибиотику антимицину А и целевым геном супероксиддисмутазы. Получены каллусные линии, сохраняющие высокую скорость роста в присутствии антимицина А в отличие от контрольных нетрансформированных линий.

The attempt of genetic transformation of tobacco mitochondria by introducing of integrative vector with gene of resistance to antimycin A and gene of interest encoding of superoxide dismutase was done. Callus lines having high growth rates in the presence of antimycin A in comparison with untransformed control cell lines were obtained.

КВАСКО О. Ю., МАТВЄЄВА Н. А.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: kvasko.olena@gmail.com

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА НАКОПИЧЕННЯ ПОЛІФРУКТАНІВ ТРАНСГЕННИМИ РОСЛИНАМИ ЦИКОРІЮ *CICHORIUM INTYBUS L.* З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ- α -2b ЛЮДИНИ

Поліфруктани – запасні полісахариди, мономерами яких є молекули фруктози. Фруктани синтезуються переважно в рослин помірних та холодних кліматичних зон [1], що пов'язано із прямою залежністю між накопиченням фруктанів та морозо- і посухостійкістю рослин [2, 3]. Стійкість таких рослин досягається за рахунок здатності фруктанів стабілізувати мембрани та виступати в ролі осморегулятора та антифриза [4]. Найбільш вивченим з фруктанів є інулін. Показано, що в значних кількостях інулін накопичується у таких рослин, як *Inula helenium*, *Helianthus tuberosus*, *Cichorium intybus*.

На синтез речовин в культурі *in vitro* впливає склад поживного середовища. Показано, що на вміст поліфруктанів в коренях нетрансгенних рослин цикорію впливає концентрація макроелементів та наявність індоліла масляної кислоти (ІМК), причому найбільший вміст поліфруктанів зафіксовано при культивуванні рослин цикорію на середовищі зі зменшеною вдвічі концентрацією макроелементів та додаванням 0,5 мг/л ІМК [5].

В даній роботі досліджено вплив умов культивування (наявність в середовищі ІМК) на накопичення поліфруктанів трансгенними рослинами цикорію з геном інтерферону α -2b людини.

Матеріали і методи

Об'єктами даного дослідження були 3 лінії трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону людини, отримані шляхом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації [6]. Пагони з відділеними коренями поміщали на середовища Мурасиге та Скуга [7] зі зменшеною вдвічі концентрацією макроелементів (1/2 МС) та 1/2 МС з додаванням 0,5 мг/л ІМК. Масу кореневої системи визначали в трьох повторностях шляхом зважування.

Вміст поліфруктанів визначали за методикою, в основі якої лежить здатність кетозукрів забарвлюватись резорцином в кислому середовищі [8]. Корені 45-денних рослин висушували при 100 С протягом 10 хв, досушували при кімнатній температурі. До 100 мг подрібненого сухого матеріалу додавали 5 мл теплої дистильованої води. Потім до 5 мл проби додавали 5 мл 0,1 % спиртового розчину резорцину та 5 мл концентрованої соляної кислоти, нагрівали на водяній бані протягом 20 хв. Після цього розчини охолоджували та вимірювали інтенсивність забарвлення на ФЕК (КФК-2) із зеленим світлофільтром (540 нм). Концентрацію поліфруктанів визначали за калібрувальним графіком (за фруктозою).

Результати і обговорення

Експерименти були спрямовані на вивчення впливу ІМК на масу кореневої системи і листків та вміст поліфруктанів в трьох лініях трансгенних рослин цикорію. Проведені дослідження показали, що при додаванні в середовище $\frac{1}{2}$ МС 0,5 мг/л ІМК спостерігається збільшення маси кореневої системи в 2,31-2,66 разів та маси листків в 1,36-3,09 разів в порівнянні з культивуванням на середовищі $\frac{1}{2}$ МС без регуляторів росту (рис. 1).

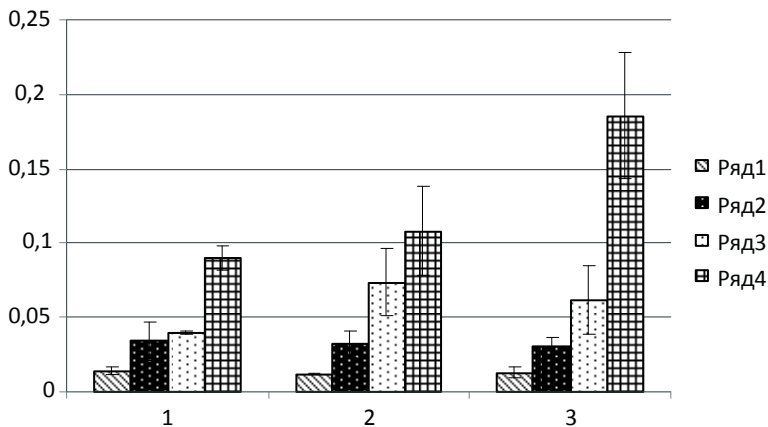


Рис. 1. Маса кореневої системи та листків трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону людини на середовищі $\frac{1}{2}$ МС та $\frac{1}{2}$ МС 0,5 мг/л ІМК: ряд 1 – $\frac{1}{2}$ МС, корені, ряд 2 – $\frac{1}{2}$ МС 0,5 мг/л ІМК, корені, ряд 3 – $\frac{1}{2}$ МС листки, ряд 4 – $\frac{1}{2}$ МС 0,5 мг/л ІМК, листки; 1,2,3 – лінії трансгенних рослин цикорію.

Наявність в середовищі $\frac{1}{2}$ МС 0,5 мг/л ІМК впливає на вміст поліфруктанів в коренях та листках всіх трьох ліній трансгенних рослин цикорію. Так, при культивуванні рослин на середовищі $\frac{1}{2}$ МС без додавання ІМК концентрація поліфруктанів в коренях сягала 39,43-56,44 мг/г сухої маси (залежно від лінії), що є в 1,24-2,06 разів меншим, ніж при культивуванні на середовищі МС із додаванням 0,5 мг/л ІМК (рис. 2). Аналогічний результат отримано стосовно вмісту поліфруктанів в листках цикорію при культивуванні на цих середовищах. Так, при вирощуванні рослин на середовищі МС з додаванням 0,5 мг/л ІМК концентрація поліфруктанів в листках сягала 4,87-13,82 мг/г сухої маси (залежно від лінії), що є в 1,03-2,79 разів більше, ніж при використанні середовища $\frac{1}{2}$ МС без додавання ІМК.

Таким чином, наявність в середовищі Мураєге та Скуга (зі зменшеним вдвічі вмістом макроелементів) індолілмасляної кислоти в концентрації 0,5 мг/л призводить до збільшення вмісту поліфруктанів в коренях трансгенних рослин цикорію. Таке збільшення корелює зі збільшенням маси кореневої системи, що цілком закономірно, адже фруктани є запасними сполуками, що накопичуються у природних умовах в основному саме в ко-

ренях цикорію. Додавання до живильного середовища ІМК також призвело до збільшення вмісту досліджуваних сполук у листках, хоча абсолютні концентрації поліфруктанів виявилися меншими, ніж у коренях.

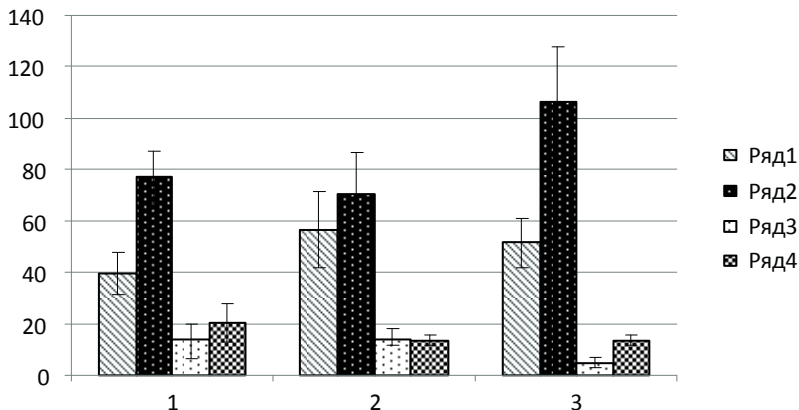


Рис. 2. Вміст поліфруктанів в коренях та листках трансгенних рослин цикорію з геном інтерферону людини на середовищі $\frac{1}{2}$ МС та $\frac{1}{2}$ МС 0,5 мг/л ІМК: ряд 1 – $\frac{1}{2}$ МС, корінь, ряд 2 – $\frac{1}{2}$ МС 0,5 мг/л ІМК, корінь, ряд 3 – $\frac{1}{2}$ МС листки, ряд 4 – $\frac{1}{2}$ МС 0,5 мг/л ІМК, листки; 1, 2, 3 – лінії трансгенних рослин цикорію.

Література

1. French A. D., Waterhouse A. L. Chemical structure and characteristics. In: Suzuki M., Chatterton N J (eds) Science and technology of fructans // CRC Press, Boca Raton. – 1993. – P. 41-81.
2. Gonzalez B., Boucaud J., Salette J., Langlois J. Fructan and cryoprotection in ryegrass {Lolium perenne L.} // New Phytol. – 1990. – Vol. 115, № 2. – P. 319-323.
3. Pilon-Smits E.A.H., Ebskamp M.J.M., Paul M.J. et al. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress // Plant Physiol. – 1995. – Vol.107, № 1. – P.125-130.
4. Livingston D. P. III, Hincha D. K. Heyer A. G. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants // Cell. Mol. Life. – 2009. – Vol. 66. – P. 2007-2023.
5. Матвеева Н. А., Кваско Е. Ю. Влияние состава питательной среды на содержание инулина в корнях цикория *Cichorium intybus* L. // 36. наук. праць «Фактори експериментальної еволюції організмів» —2010. Т.9. – P. 174-178.
6. Матвеева Н.А., Шаховський А.М., Герасименко І.М. та ін. Перенесення гена біосинтезу інтерферону- $\alpha 2b$ в рослини цикорію (*Cichorium intybus* L.) методом агробактеріальної трансформації // Біополімери і клітина. –2009.- Vol. 25, № 2. – С.120-125.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture// Phys. Plant. – 1962. – 15, N. 3. – P.473-497.
8. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агрпроомиздат, 1987. – С.143.

Резюме

Досліджено вплив індолілмасляної кислоти на накопичення поліфруктанів трансгенними рослинами *Cichorium intybus* L. з геном інтерферону α -2b людини. Показано, що при додаванні в середовищі Мурасиге та Скуга 0,5 мг/л індолілмасляної кислоти концентрація поліфруктанів збільшується в 1,24-2,06 разів в коренях, та в 1,03-2,79 разів в листках.

Исследовано влияние индолилмасляной кислоты на содержание полифруктанов в трансгенных растениях *Cichorium intybus* L. с геном интерферона α -2b человека. Показано, что при добавлении в среду Мурасиге и Скуга 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты концентрация полифруктанов увеличивается в 1,24-2,06 раз в корнях и в 1,03-2,79 раз в листьях цикория.

Influence of indole-3-butyric acid on the fructans content in *Cichorium intybus* L. transgenic plants with interferon α -2b gene was investigated. Plants cultivation on the MS medium supplemented with 0,5 mg/l IBA results in increase of fructans concentration in 1,24-2,06 times in roots and in 1,03-2,79 times in leaves of chicory.

КИЩЕНКО Е.М., ГЕРАСИМЕНКО И.М., ВАСИЛЕНКО М.Ю., КУЧУК Н.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: iicb@iicb.kiev.ua*

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАПУСТЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ ГЕНОВ *esxA* И *fbpB* Mycobacterium tuberculosis И *huINF α -2b* ЧЕЛОВЕКА

В сравнении с прокариотами и культурами клеток млекопитающих или насекомых растительные системы экспрессии рекомбинантных белков имеют ряд преимуществ: например, прохождение пост-трансляционных модификаций; минимальный риск заражения конечного продукта бактериальными токсинами, вирусами или другими болезнетворными патогенами; а так же сравнительная дешевизна при широкомасштабном производстве. В настоящее время большинство опубликованных данных, касающихся синтеза и накопления фармацевтических белков в растениях, было получено на модельных объектах, таких как *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *Arabidopsis thaliana* и *Lactuca sativa* с использованием стабильной или транзиторной трансформации [1-6]. Коммерческое же производство рекомбинантных белков в растениях, особенно в аспекте «съедобных вакцин» возможно лишь при использовании генетически-модифицированных сельскохозяйственных культур [7, 8]. Капуста белокочанная (*Brassica oleracea*), выбранная нами в качестве объекта, является традиционной овощной культурой со сравнительно высоким содержанием белка (1,1-2,3%). Капуста хорошо хранится и употребляется в пищу в сыром виде, что открывает возможность ее использования как «съедобной вакцины». Целью нашей работы было получить генетически-модифицированные растения капусты, содержащие гены *esxA* и *fbpB*, кодирующие антигены ESAT6 и Ag85B

Mycobacterium tuberculosis, и ген лейкоцитарного интерферона альфа-2b человека, и провести их молекулярно-биологический анализ.

Материалы и методы

В экспериментальной работе использовали вектор pCB125, содержащий ген лейкоцитарного интерферона альфа-2b человека [9], а так же вектора pCB065, pCB066, pCB067, pCB068 и pCB111, содержащие гены секреторных белков-антигенов ESAT6 и Ag85B *M. tuberculosis*. Для создания бинарных векторов pCB065, pCB068, pCB066 и pCB067 последовательности fbpB, fbpB^{ΔTMD}, esxA и слитая последовательность esxA::fbpB^{ΔTMD}, соответственно, были субклонированны как NcoI-XbaI фрагменты в векторе pCB5290 под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Векторная конструкция pCB111 была создана на базе pCB065 путем вставки перед геном fbpB синтетической последовательности ДНК, кодирующей сигнальный пептид малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы гороха для транспорта белка Ag85B в пластиды. Последовательности генов секреторных белков ESAT6 и Ag85B были любезно предоставлены д.б.н. Ю.Л. Дороховым (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МДУ им. М.В. Ломоносова, Россия). Т-ДНК всех использованных в работе векторов содержали также селективный ген фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазы (ген bar), обеспечивающий устойчивость растений к гербициду фосфинотрицину (PPT). Сконструированные вектора переносили в *Agrobacterium tumefaciens* штамм GV3101 путем трансформации агробактериальных компетентных клеток плазмидными ДНК.

В работе использовали 4 сорта капусты белокачанной (*Brassica oleracea* L.): Харьковская зимняя, Белоснежка, Украинская осень и Слава 1305. В культуру *in vitro* их вводили путем поверхностной стерилизации семян. Семена капусты проращивали на питательной среде MS [10] в термостате при +24°C. Этиолированные проростки 5-6 см длиной использовали для генетической трансформации путем вакуум-инфильтрации агробактериальной суспензией [11]. После агроинфильтрации и 3-х-суточного совместного культивирования проростки нарезали на экспланты и инкубировали на питательной среде MS с 2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 15 мг/л PPT и 600 мг/л цефотаксима. Последующие пассажи проводили на среде для регенерации, содержащей компоненты MS, 2 мг/л зеатина, 1 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,5 мг/л нафтилуксусной кислоты, 30 мкМ тиосульфата серебра, 0,5 г/л водорастворимого поливинилпирролидона, 10 мг/л PPT и 600 мг/л цефотаксима. Сформировавшиеся побеги отсаживали для укоренения на среду MS с 10 мг/л PPT и 300 мг/л цефотаксима. Укорененные растения высаживали в грунт и выращивали в условиях теплицы.

ДНК из растительных тканей выделяли ЦТАБ-методом [12]. Реакцию амплификации ДНК проводили в термоциклере Mastercycler® personal (Eppendorf) с использованием праймеров 1) 5'ATGAGCCCAGAACGACGCCCGCC3' и

5'GCATGCGCACGGTTCGGGT CGTTGG3', амплифицирующих фрагмент гена *bar* длиной 414 п.н., 2) 5'TCTACAGCGACTGGTACAGC3' и 5'TCAGGTTGCTGCTACGAACG3', амплифицирующих 484 п.н. гена *fbpB* или *fbpB^{ΔTMD}*, 3) 5'AGCAGTCCCTGACCAAGCTC3' и 5'TCAGGTTGCTGCTACGAACG3', амплифицирующих 1033 п.н. *esxA::fbpB^{ΔTMD}*; 4) 5'TGACCATGGCAGAGCAGCAGTGGAAATTTCGC3' и 5'GAGAATTCTGCGAACAT CCCAGTGACG3', амплифицирующих 300 п.н. *esxA*; 5) 5'CTCCTGCTTGAAGGACAG3' и 5'GGAGTCCSTTCATCAG3', специфичных к гену *huINFα-2b* (продукт амплификации – 264 п.н.).

Результаты и обсуждение

Генетическую трансформацию капусты с помощью агробактерий проводили векторными конструкциями pCB125 (содержит *huINFα-2b*) [9], pCB065 (*fbpB*), pCB066 (*esxA*), pCB067 (*esxA::fbpB^{ΔTMD}*), pCB068 (*fbpB^{ΔTMD}*) и pCB111 (*fbpB*, слитый с транзитным пептидом ssRUBISCO *Pisum* sp.). Как селективный ген векторы содержали ген фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазы (*bar*), что позволило отбирать трансгенные растения на среде с PPT (10 мг/л). По нашим предварительным данным PPT как селективный агент является более подходящим для селекции трансгенных растений семейства *Cruciferae*, чем канамицинсульфат, поэтому именно эти векторы были выбраны для переноса генов антигенов *M. tuberculosis* и гена лейкоцитарного интерферона человека альфа-2b в геном капусты. Регенерация устойчивых растений происходила в течение 3-4 месяцев на селективных средах. Укоренившиеся растения высаживали в почву и выращивали в закрытом грунте (Рис. 1).

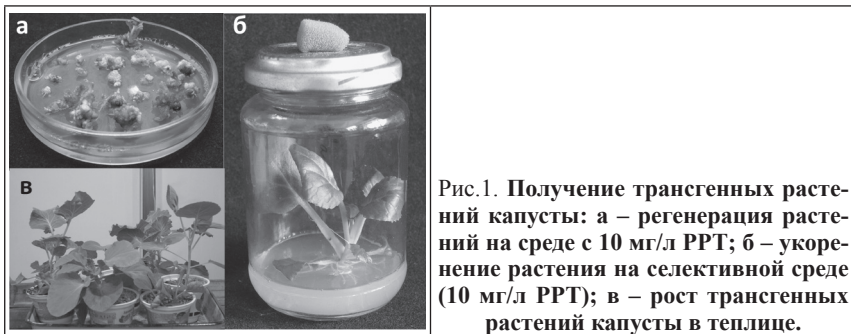
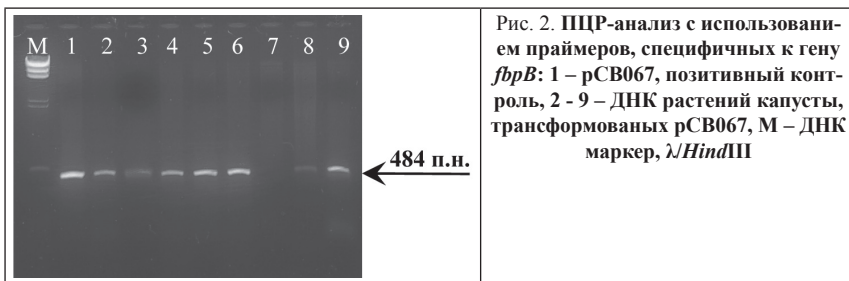


Рис.1. Получение трансгенных растений капусты: а – регенерация растений на среде с 10 мг/л PPT; б – укоренение растения на селективной среде (10 мг/л PPT); в – рост трансгенных растений капусты в теплице.

После укоренения отобранных растений капусты проводили ПЦР-анализ с использованием праймеров, специфичных к селективному гену *bar* и целевым генам (*huINFα-2b*, *fbpB*, *fbpB^{ΔTMD}*, *esxA*, *esxA::fbpB^{ΔTMD}*). Результаты амплификации для девяти образцов ДНК, выделенной из растений капусты сорта Харьковская зимняя, трансформированных pCB067, приведены на рис. 2.



Проведенный анализ позволяет сделать вывод, что эффективность селекции составила 80-100% (в зависимости от вектора и сорта). Итоговые результаты генетической трансформации капусты по результатам ПЦР-анализа приведены в таблице 1.

Таблица 1

Количество трансгенных растений капусты, трансформированных бинарными векторами, содержащими гены антигенов *M. tuberculosis* и ген интерферона человека

	Харьковская зимняя	Белоснежка	Украинская осень	Слава 1305	Суммарное кол-во
рСВ065	5	0	1	2	8
рСВ066	3	0	1	2	6
рСВ067	17	5	2	2	26
рСВ068	2	0	1	2	5
рСВ111	-	-	0	2	2
рСВ125	2	-	4	3	9

Трансгенные растения, экспрессирующие ген рекомбинантного интерферона альфа-2b человека, уже были получены для табака, риса, картофеля, салата, рапса и моркови, и показана противовирусная активность их экстрактов [9, 13-16]. При изучении иммуномодулирующего действия белков из *M. tuberculosis* исследовали рекомбинантные белки, экспрессирующиеся в растениях транзитивно либо стабильно [17-20]. Так же опубликованы данные по получению стабильных трансгенных растений табака, арабидопсиса и салата, содержащих гены *M. tuberculosis*, кодирующие антигены, имеющие потенциал использования как вакцины против туберкулеза [21-23]. В нашей работе были получены трансгенные растения капусты, содержащие гены *esxA* и *fbpB*, кодирующие антигены ESAT6 и Ag85B *M. tuberculosis*, и ген лейкоцитарного интерферона альфа-2b человека, в дальнейшем планируется оценить уровень экспрессии перенесенных генов и иммунопротекторный эффект рекомбинантных белков.

Литература

1. Doran P.M. Foreign protein production in plant tissue cultures // Curr. Opin. Biotechn. 2000. – Vol. 11. – P. 199–204.

2. *Ma J.K., Chikwamba R., Sparrow P. et al.* Plant-derived pharmaceuticals – the road forward // *Trends Plant. Sci.* – 2005. – Vol. 10, N12. – P. 580-585.
3. *Buonaguro F.M., Butler-Ransohoff J.-E.* PharmaPlant: the new frontier in vaccines // *Expert Rev. Vaccines.* – 2010. – Vol. 9, N8. – P. 805–807.
4. *Thanavala Y., Mahoney M., Pal S. et al.* Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B // *Proc Natl. Acad Sci.* – 2005. – Vol. 102. – P. 3378-3382.
5. *Streatfield S.J., Lane J.R., Brooks C.A. et al.* Corn as a production system for human and animal vaccines // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21. – P. 812–815.
6. *Koya V., Moayeri M., Leppla S.H., Daniell H.* Plant-based vaccine: mice immunized with chloroplast-derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73. – P. 8266-8274.
7. *Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G. et al.* Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato // *Nat. Med.* – 1998. – Vol. 4. – P. 607–609.
8. *Tacket C.O., Mason H.S., Losonsky G. et al.* Human immune responses to a novel norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes // *J. Infect. Dis.* – 2000. – Vol. 182. – P. 302–305.
9. *Gerasymenko I.M., Lypova N.M., Sakhno L.A. et al.* Obtaining and analysis of tobacco, lettuce and rape plants transformed with human interferon alfa 2b gene // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / НАН України, УААН, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А.Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – Т. 7. – К.: Логос, 2009. – С. 274-279.
10. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
11. *Kishchenko E.M., Komarnitskii I.K., Kuchuk N.V.* Production of transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin // *Cell Biol. Int.* 2005. – Vol. 29, №1. – P. 15-19.
12. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скотта, Ф. Армитиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
13. *Zhu Z, Hughes KW, Huang L et al.* Expression of human α -interferon cDNA in transgenic rice plants // *PCTOC* – 1994.- Vol. 36, N2. – P. 197–204.
14. *Sawahel W.A.* The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – Vol. 7, N1. – P. 19–29.
15. *Li S., Zhao D., Wu Y., Li Y.* Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce // *J. Zhejiang Univ. Sci B.* – 2008. – Vol. 9, N5. – P. 351–355.
16. *Luchakivskaya Yu., Kishchenko O., Gerasymenko I. et al.* High-level expression of human interferon alpha-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants
17. *Dorokhov Y.L., Sheveleva A.A., Frolova O.Y. et al.* Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves // *Tuberculosis (Edinb.)*. – 2007. – Vol. 87. – P. 218-224.
18. *Floss D.M., Mockey M. Zanello G. et al* Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, Article ID 274346, 14 p. doi:10.1155/2010/274346

19. Wang L.J., Ni D.A., Chen Y.N., Lee Z.M. The expression of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 protein in transgenic carrots // *Acta Bot. Sin.* – 2001. – Vol. 43. – P. 132–137.

20. Rigano M.M., Dreitz S., Kipnis A.P. et al. Oral immunogenicity of a plant-made, subunit, tuberculosis vaccine // *Vaccine.* – 2006. Vol. 24, N5. – P. 691–695.

21. Матвеева Н.А., Василенко М.Ю., Шаховский А.М., Кучук Н.В. Агробактериальная трансформация салата (*Lactuca sativa* L.) конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* // *Цитология и генетика.* – 2009. – №2. – С. 27–32.

22. Doherty T. M., Andersen P. Vaccines for tuberculosis: novel concepts and recent progress // *Clinical Microbiology Reviews.* – 2005, –Vol. 18, N. 4 – P. 687–702

23. Василенко М.Ю., Кучук М.М., Овчаренко О.О., Кучук М.В. Отримання транспластомних рослин *Nicotiana benthamiana* із генами мікобактерії (*Mycobacterium tuberculosis*) // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / НАН України, УААН, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А.Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – Т.9. - К.: Логос, 2010. – С. 224–229.

Резюме

Сконструйована серія бінарних векторів, що містять гени секреторних білків-антигенів ESAT6 та Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*. В результаті Агробактеріум-опосередованої трансформації векторами з генами *esxA* та *fbpB* та вектором з геном рекомбінантного інтерферона альфа-2b людини були отримані трансгенні рослини капусти. Присутність селективного і цільових генів підтверджено ПЦР.

Сконструйована серія бінарних векторів, що містять гени секреторних білків-антигенів ESAT6 та Ag85B *Mycobacterium tuberculosis*. В результаті Агробактеріум-опосередкованої трансформації векторами з генами *esxA* та *fbpB* та вектором із геном рекомбінантного інтерферону альфа-2b людини були отримані трансгенні рослини капусти. Наявність селективного і цільових генів підтверджено ПЦР.

Set of binary vectors harbouring genes coding for secretory antigen proteins ESAT6 and Ag85B from *Mycobacterium tuberculosis* was constructed. Transgenic cabbage plants were obtained using vectors with *esxA* and *fbpB* and plasmid construct with recombinant human interferon alpha-2b gene using *Agrobacterium*-mediated transformation. The presence of selective and target genes was proved by PCR-analysis.

КЛЯЧЕНКО О.Л., БОРОДАЙ В.В.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 13, e-mail: veraboro@gmail.com*

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ КАРТОПЛІ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.), СТІЙКОЇ ДО ФІТОПАТОГЕНІВ

Останніми роками на картоплі масового поширення та зростаючої шкодочинності набувають вірусні захворювання, бактеріози і мікози. Тому необхідно постійно вдосконалювати технології насінництва, застосовувати принципово нові системи захисту насіннєвої картоплі від патогенів, особ-

ливо у зв'язку з появою нового покоління сортів і збільшення асортименту фунгіцидів [1, 2].

Біотехнологічні методи культури *in vitro* широко використовуються в даний час для вирішення прикладних задач селекції сільськогосподарських культур, зокрема картоплі. Наприклад, якщо при селекції картоплі на стійкість до хвороб протягом року необхідно в польових умовах провести оцінку від 50 до 100 тис. рослин, то в умовах *in vitro* можливо протестувати близько 20 млн. протопластів, що виділені з 9 г листків картоплі [8,12].

Одними з проблем розвитку методів селекції *in vitro* є: низький рівень регенерації рослин із стійких культур, легкість появи і нестабільність епігенетичних змін в культивованих клітинах, а також кореляція між проявом селективного ознаки на рівні культури і інтактною рослини. Змінені клітинні лінії втрачають з часом здатність до регенерації (що є одним з головних перешкод до широкого впровадження цих методів), дія селективних факторів залежить від фази розвитку клітинної популяції, оцінку проводять в штучних умовах (необхідні ознаки в польових умовах можуть виявлятися по-різному), господарсько-цінні ознаки регенерантів часто можуть бути зчепленими з небажаними, під час відбору накладається вплив фізіологічно активних речовин, генетична нестабільність в культурі і можливість порушення геному [3,4,6,21].

Однак, не дивлячись на складнощі, огляд літератури за останні десятиліття показує широке використання методів клітинної інженерії, які доповнюють методи класичної селекції: селекція на клітинному рівні на стійкість до абіотичних і біотичних факторів, вирощування гомозиготних ди- і моногаплоїдних ліній рослин з мікроспор, отримання гібридного потомства шляхом злиття протопластів, генетична інженерія [2, 5, 7, 13, 16,18, 20,21,26,27-30].

Методами клітинної селекції в Інституті картоплярства НААН України при використанні комплексу екзоферментів збудника чорної ніжки і токсину збудника кільцевої гнилі отримано генетичну різноманітність соматональних ліній з підвищеною на 2-4 балу стійкістю проти бактеріальних хвороб [2]. При цьому встановлено, що ця стійкість зберігається в бульбових поколіннях. Також проводяться дослідження на стійкість до фітофторозу з використанням як селективного фактора фітотоксичних метаболітів, що продукуються грибом *Phytophthora infestans*. Вперше відпрацьована схема виділення фітотоксичних метаболітів *Ph. infestans*, яка заснована на фракціонуванні культуральних фільтратів і виявленні активних метаболітів [9,10,13]. Виділено лінії сортів селекції інституту, які характеризуються підвищеною на 3-5 балів стійкістю до фітофторозу і проходять випробування на різних етапах селекційного процесу. З використанням методів клітинної інженерії в Україні було створено сорт картоплі Ольвія [2], в Японії – сорт White-baron [23].

На стійкість до збудника кільцевої гнилі була відпрацьована методика тестування регенерантів картоплі та отримані стійкі клітинні лінії у сортів Любимець і Ульяновський. Від 25 до 67% відібраних клітинних ліній зберігали здатність до морфогенезу. Було встановлено, що для того, щоб підвищити ефективність клітинної селекції, необхідна присутність селективного фактора і на перших етапах регенерації до вкорінення [19].

На основі використання культурального фільтрату в якості селективного фактора патогенного грибу *Rhizoctonia solani* також був розроблений метод селекції на стійкість до патогену [15], були отримані форми картоплі, стійкі до ризоктоніозу [8,12]. Біотехнологічні методи отримання, відбору та оцінювання рослин, стійких до патогенів є практично важливими, але і важкодосяжними. Ці труднощі пов'язані як з недостатністю знань з генетики збудників, так і з відсутністю чітких уявлень про фізіологічні основи взаємодії патогена і рослини-хазяїна і ролі метаболітів, що виділяються ними під час контакту. Тому в біотехнологічних роботах цього напрямку основною складністю підбору селекційних факторів є визначення їх сублетальних концентрацій для різних експлантатів на різних етапах культивування. Оптимальний ефект в селекції *in vitro* для картоплі досягався на калюсній тканині при її культивуванні на середовищі, що містить 30-40% КФ *R. solani*. Рослини-регенеранти, отримані на селективних середовищах із зазначеним вмістом КФ, володіли підвищеною стійкістю (на 10-35%) до дії патогенів порівняно з регенерантами контрольного варіанту. У стійких калюсних лініях і рослинах-регенерантів посилюється синтез ендогенних гормонів, особливо гормонів, що мають стимулюючий ефект, і фенольних сполук, які можуть призводити до змін експресії генів; появи неспецифічних білків, синтезу ферментів, зміцненню клітинної стінки та ін. Ознака підвищеної стійкості може бути обумовлена генетичними змінами на рівні ДНК. У клітинних культурах, культивованих на селективних середовищах з використанням культуральної рідини патогенів, відбуваються зміни в нуклеотидних послідовностях, що свідчить про генетичні зміни [8,12].

Методами клітинної селекції було також проведено дослідження на стійкість картоплі до збудника *Streptomyces scabiei* (в якості селективного фактору використовували фітотоксин такстомін А) [31].

У Великобританії останнім часом розробляється комплексна стійкість бульб при зберіганні (температура, тривалість, стійкість до певних хвороб і шкідників) [25]. Комбіновану стійкість бадилля та бульб до фітофторозу з ознаками ранньостиглості і якісними характеристиками селекційного матеріалу досліджують у Федеральному селекційному центрі культурних рослин Німеччини [24].

Використання методів клітинної селекції є перспективним напрямком для створення стійких до хвороб рослин. Розроблені схеми і методи не забезпечують 100%-ного отримання більш стійких форм, а лише сприяють відбору популяції, збагаченої потенційно стійкими рослинами [12]. Мето-

дологічні підходи щодо отримання асептичних культур, приготування поживних середовищ певного складу, дотримання фотоперіодичних і газових режимів культивування, послідовності прийомів культивування в клітинній селекції розроблені в загальних закономірностях. Для різних сортів картоплі та видів патогенів вони можуть змінюватися. Позитивний результат досліджень залежить від правильного вибору стадії життєвого циклу патогену та підбору відповідних умов спільного культивування клітин рослини і гриба, з урахуванням видових і сортових особливостей клітин; типу і віку первинного експлантів; тривалості культивування клітин в умовах *in vitro* і компонентів живильного середовища.

Аналіз літератури показує недостатність проведених досліджень [11] в селекції на стійкість бульб до хвороб при зберіганні, зокрема до *Fusarium solani*. Отже, пошук нових оригінальних і більш ефективних схем селекції на стійкість до патогенів, особливо на комплексну стійкість є актуальним напрямком досліджень.

Література

1. Банадысев С. Картофелеводство: состояние и перспективы развития / С. Банадысев // Аграрная экономика. – 2006. – № 7. – С. 40–43.
2. Бондарчук А.А., Олійник Т.М. Стан та перспективи розвитку біотехнологічних досліджень у картоплярстві // Картоплярство. – 2007.- Вип. 36. – с. 3-18.
3. Глеба Ю.Ю., Зубко М.К. Теоретические и прикладные аспекты клеточной инженерии растений // Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. – Москва, 1988. – Т. 9. – С. 3 – 72.
4. Глеба Ю.Ю., Сьтник К.М. Клеточная инженерия растений. – Киев.- 1984.- 160с.
5. Дерпак І. Створення та оцінка селекційного матеріалу картоплі з використанням цибридних ліній // Вісн. Львівського ДАУ. –2003. – № 7. – С. 305-308.
6. Дубровна О.В., Моргул Б.В. Клітинна селекція пшениці на стійкість до стресових чинників довкілля // Физиология и биохимия культур растений. –2009. – т.41, №6. – с. 464-475.
7. Жук В.П., Олейник Т.Н., Блюм Я.Б., Емец А.И. Регенерация украинских сортов картофеля и их генетическая трансформация синтетическими Сгу-генами // Сборник труд. Никит. бот. сада. – 2009. – том 131. – С. –197-201.
8. Загоскина Н.В., Гончарук Е.А., Дубравина Г.А., Калашникова Е.А. Влияние экзометаболитов гриба *Rhizoctonia solani* на клеточные культуры различных генотипов картофеля // Биотехнология. – 2006. – № 5. – С. 19-22.
9. Захарчук Н.А., Олійник Т.М. Використання культури клітин в селекції картоплі // Наук. вісник Нац. аграрн. ун-ту.- 2001.- Вип. 34.- С. 58-61.
10. Захарчук Н.А., Олійник Т.М., Зайченко О.М. Клітинний добір у селекції картоплі на стійкість проти фітофторозу // Вісник Білоцерківського ДАУ.- Вип. 15.- 2001.- С. 52-60.
11. Какимжанова А.А. Эффективность селекции *in vitro* картофеля на севере Казахстана // Тез. докл. на IX Межд. конфер. «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология», Москва. – 2008. – с. 156.

12. *Калашикова Е.А.* Применение клеточной и тканевой биотехнологии в растениеводстве // *Аграрная Россия*. – 2009. – № 1. – с.30-33.

13. *Кононученко В.В., Резник В.С., Олейник Т.Н.* Использование биотехнологических методов в селекции и семеноводстве картофеля Украины // Использование генетических ресурсов Международного центра по картофелю в селекции и семеноводстве картофеля в России и странах Восточной Европы: Науч.труды. – М., 2000. – с.140-143.

14. *Кучко А.А., Олійник Т.М.* Сомаклональна мінливість у картоплі. — К.: Довіра, 1998. — 191 с.

15. *Леонова Н.С.* Селекция картофеля на устойчивость к *Rhizoctonia solani* в культуре *in vitro*. Леонова Н.С., Железнов А.В. // *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. – 2009. – № 4. – с. 9-16.

16. *Маруненко И. М., Преодо М. Н., Кучко А. А.* Клеточная селекция картофеля: создание форм, устойчивых к бактериальным гнилям // *Методы отбора по комплексам признаков в селекции раст.* – Ялта, 1989. – С. 65

17. *Олійник Тетяна Миколаївна.* Клітинна селекція картоплі на стійкість проти *Erwinia atroseptica*: Автореф. дис...канд. с.-г. наук: 06.00.05 / УААН. — К., 1995. — 24с.

18. *Олійник Т.М., Белошицька Н.Й., Таращенко Н.І., Шевченко О.О.* Отримання та вивчення трансгенних рослин картоплі з геном дефензиви // *Картоплярство України*. – 2005. – № 1. – С. 9-12.

19. *Рассадина, Г.В., Хромова, Л.М., Бутенко, Р.Г., Иванова, Н.Г.* Клеточная селекция на устойчивость к кольцевой гнили картофеля: оптимизация оценки устойчивости соматоклональных линий картофеля к кольцевой гнили // *Биол. культивир. клеток и биотехнол. раст.* – М., 1991. – С. 133-137

20. *Родькина И.А., Яковлева Г.А.* Изменчивость морфологических признаков при вегетативном размножении андроклонов картофеля // *Биотехнология*. – 2001. – №2. – с.31-39.

21. *Сидоров В.А.* Биотехнология растений. Клеточная селекция. К. – Наукова думка. – 1990. – 280 с.

22. *Хромова, Л.М. Седнина, Г.В. Бутенко, Р.Г. Яшина, И.М., Русинов, А.В.* Клеточная селекция картофеля // *С.-х. биол.* – 1983. – N 6. – С. 3-12.

23. *Akihiro Arihara, Tomoyuki Kita, Satoshi Igarashi, Masanori Goto and Yukio Irikura.* White Baron: A non-browning somaclonal variant of Danshakuimo (Irish Cobbler) // *American Journal of Potato Research*, 1995. – Vol. 72. – № 11. – p. 701-705

24. *Darsow Ulrich.* Resistenzzüchtung bei der Kartoffel: Beitrag des genetischen Pflanzenschutzes für einen ökologisch verträglichen Kartoffelanbau / Beitr. Züchtungsforsch. // *Bundesanst. Züchtungsforsch. Kulturpflanz.* – 2002. – 8, №1. – p.110-114.

25. *Mackay G.R., Todd D., Bradshaw J.D., Dale M.F.B.* The targeted and accelerated breeding of potatoes // *Scott. Crop Res. Inst.* – Dundee, 1997. – p. 40-45.

26. *Nguyen T.T., Nugent G., Dix P.* Biolistic transformation of potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Plant Biotechnology: 10th IAPTC&B Congress.* Orlando, June 2002. – Orlando, Florida, 2002. – P. 127.

27. *Park Y.D., Ronis D.H., Boe A.A., Cheng Z.M.* Plant regeneration from leaf tissues of four North Dakota genotypes of potato (*Solanum tuberosum* L.)// *Am. Potato J.* – 1995. – V. 72. – P. 329-338.

28. Romano A., Raemakers K., Visser R., Mooibroek H. Transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using particle bombardment// Plant Cell Rep. – 2001. – V. 20. – P. 198-204.

29. Secor Gary Allen, Taylor Raymond J., Bidney Dennis Lee, Ruby Cheryl Louise. Method for *in vitro* culturing of potato clones resistant to blackspot bruising and the potatoes produced therefrom: Pat.6060312 USA, MPK C12N 5/00/ -№ 07/716115. Заявл.17.06.91. Оpubл.09.05.00.

30. Trujillo C., Rodriguez-Arango E., Jaramillo S., Hoyos R., Orduz S., Arango R. One-step transformation to two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. *andigena*) // Plant Cell Rep. – 2001. – V. 20. – P. 637-641.

31. Wilson C. R., Luckman G. A., Tegg R. S., Yuan Z. Q., Wilson A. J., Eyles A., Conner A. J. Enhanced resistance to common scab of potato through somatic cell selection in cv. Iwa with the phytotoxin thaxtomin A // Plant Pathology. – 2009. – Volume 58, Issue 1. – p. 137–144.

Резюме

In the review contemporary state of methods of tissues cultures using have been considered. Achievements of Ukrainian and foreign scientists have been summarized. The attention have been paid to the basic directions, possibilities, prospects and problems of one of the major branches of modern biotechnology of plants – cellular selection.

В обзоре рассматривается современное состояние использования биотехнологических методов получения картофеля, устойчивого к фитопатогенам. Обобщены результаты научных исследований украинских и зарубежных учёных. Уделено внимание клеточной селекции – как одному из основных направлений в современной биотехнологии.

В огляді розглядається сучасний стан використання біотехнологічних методів отримання картоплі, стійкої до фітопатогенів. Узагальнено результати наукових досліджень українських та зарубіжних вчених. Придлено увагу клітинній селекції – як одному з основних напрямків в сучасній біотехнології.

КОВАЛЕВА Л.В., МИНКИНА Ю.В.* , ЗАХАРОВА Е.В.**

Институт физиологии растений им.К.А.Тимирязева РАН, Россия, 111395, Москва, ул. Ботаническая, 35, e-mail: kovaleva_l@mail.ru

**Институт атомной энергетики НИЯУ «МИФИ», Россия, Обнинск,*

***РГАУ-МСХА им.К.А.Тимирязева, Россия, Москва*

ФЛАВОНОЛЫ В *IN VITRO* ПРОРАСТАЮЩЕМ МУЖСКОМ ГАМЕТОФИТЕ ПЕТУНИИ (*PETUNIA HYBRIDA* L.)

Участие флавоноидов (Фл) в репродуктивном процессе у растений неоднократно показано во многих исследованиях. Трансгенные растения петунии, дефицитные по гену халконсинтазы (одного из ферментов биосинтеза Фл), и флавоноид-дефицитные мутанты петунии обладали мужской стерильностью (1, 2), что позволило авторам сделать вывод о причастности Фл к фертильности мужского гаметофита.

В последние годы накапливаются данные о Фл как сигнальных молекулах, участвующих в различных процессах роста и развития растений (3). Локализация ферментов биосинтеза Фл (халконсинтазы и халконизомеразы) как в ядре, так и в цитоплазме позволила авторам предположить участие Фл в регуляции генной транскрипции на субклеточном уровне. Полагают, что ФЛ могут участвовать в ингибировании сигнальных каскадов фосфорилирования или специфических киназ. Согласно данным Benjamins с соавт.(4), PID-киназа участвует в полярном транспорте ауксина и взаимодействует с Ca^{2+} -связывающими белками. Анализ PIN-белков и транспорта ауксина у флавоноид-дефицитных мутантов предполагает, что PID-медируемая киназная активность может модулироваться эндогенными Фл. У *Arabidopsis thaliana* накопление Фл отмечено в областях, где экспрессируется белок AtPTEN1 (специфический для пыльцы) (4).

Согласно литературным данным (5), совместная локализация Фл и ИУК в различных органах растений может свидетельствовать об участии Фл в регуляции транспорта ИУК. Целью данного исследования была проверка гипотезы о том, могут ли Фл быть эндогенными регуляторами транспорта ИУК в процессе прорастания и роста мужского гаметофита. Для этого определяли динамику содержания ИУК и Фл в прорастающей *in vitro* зрелой пыльце и системе *in vivo* пыльца-пестик петунии двух клонов (самосовместимого и самонесовместимого).

Материалы и методы

Объектом исследования служили растения двух клонов петунии (*Petunia hybrida* L., совместимый и несовместимый клоны), выращенные в почвенной культуре при естественном освещении в оранжерее. В работе использовали прорастающую *in vitro* пыльцу, а также опыленный пестик и отдельные его части (рыльце, столбик и завязь) после совместимого и несовместимого опыления.

Пыльцевые трубки культивировали в термостатируемых условиях при 25–26°C на среде, содержащей 0.4 М сахарозы и 1.6 мМ борной кислоты. О степени прорастания пыльцевых трубок судили по количеству проросших в течение 6 ч пыльцевых зерен ($n = 200$). Длину растущих пыльцевых трубок измеряли с помощью микроскопа с окуляр-микрометром при 150-кратном увеличении. В каждом варианте опыта оценивали длину 100 проросших пыльцевых трубок в 6 биологических повторностях.

Эффекты действия экзогенных Фл на прорастание и рост пыльцевых трубок *in vitro* исследовали на образцах пыльцы, собранной со зрелых цветков петунии самосовместимого и самонесовместимого клонов.

Свежесобранную пыльцу (10 мг) проращивали в течение 6 ч при 25–26°C на среде, содержащей 0.4 М сахарозы и 1.6 мМ борной кислоты, затем промывали дистиллированной водой и фиксировали 70%-ным этанолом. Навески (50–150 мг) пестиков (а также рылец, столбиков и завязей) также фиксировали 70%-ным этанолом. Содержание Фл определяли спект-

рофотометрически с хлористым алюминием (поглощение при 415 нм), согласно методике [6].

Содержание ИУК определяли методом ВЭЖХ [7]. Образцы (1–5 г) фиксировали жидким азотом, лиофильно высушивали и анализировали. Условия хроматографирования: детектор флуоресцентный RF-530 (“Shimadzu”, Япония); колонка – Ultrapac Column Lichrosorb RP (18.5 мкм, 4 × 250 мм, Швеция); элюент – 40%-ный метанол, скорость протекания – 0.3 мл/мин, время удерживания – 5 мин. Идентификацию ИУК проводили, сравнивая времена удерживания в образце и стандартной ИУК (“Sigma”, США). Минимальная регистрируемая концентрация ИУК составляла 250 пкг в аликвоте пробы (20 мкл).

Результаты

Зрелая пыльца содержала 60–70 нг ИУК/г сырой массы и 20 мг Фл/г сырой массы. Зрелый мужской гаметофит (пыльца) и неопыленные пестики содержали примерно одинаковое количество ИУК, но различались по уровню Фл: по сравнению с мужским гаметофитом спорофитные ткани пестика характеризовались в 10 раз более низким содержанием Фл.

В прорастающих *in vitro* мужских гаметофитах обоих клонов отмечено повышение уровня ИУК в течение 2 ч культивирования, в то время как повышение содержания Фл наблюдали только в течение первого часа прорастания (рис. 1).

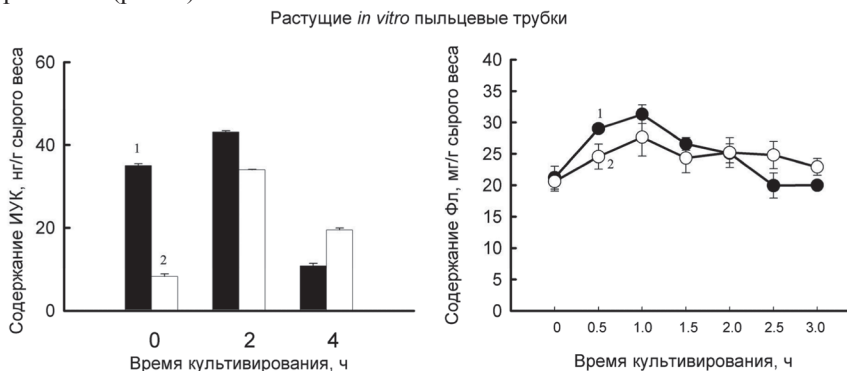


Рис.1. Содержание ИУК и флавоноидов в *in vitro* прорастающих пыльцевых трубках петунии. (1) – самосовместимый клон; (2) – самонесовместимый клон

Динамика содержания ИУК и ФЛ при прорастании пыльцы и росте пыльцевых трубок *in vivo*, в проводниковых тканях пестика, была несколько иной. Прорастание мужского гаметофита на воспринимающей поверхности рыльца в течение 1–2 ч, так же как и *in vitro*, сопровождалось постепенным повышением уровней ИУК и Фл. Однако дальнейший рост пыльцевых трубок в тканях рыльца (от 2 до 4 ч после опыления), а затем и в

тканях столбика (от 4 до 8 ч после опыления) сопровождался повышением уровня только ИУК при сохранении мало меняющегося уровня Фл. Характер изменений уровней ИУК и Фл в системе пыльца–пестик петунии после самосовместимого опыления в целом оказался сходен с таковым после самонесовместимого опыления, однако их содержание после совместимого опыления было несколько выше.

Динамика содержания ИУК и Фл в отдельных частях пестика (рыльце, столбике и завязи) в процессе прорастания и роста пыльцевых трубок имела свою специфику. Содержание ИУК возрастало в течение 8 ч после опыления во всех частях пестика, значительно сильнее в тканях рыльца (максимальный рост был отмечен в рыльцах после совместимого опыления). Содержание Фл в тканях рыльца повышалось в первые 0.5 ч и сохранялось на постоянном уровне в течение последующих 6 ч.

Внесение в среду культивирования пыльцевых трубок петунии самосовместимого клона экзогенных ИУК и Фл (кемпферол) влияло на их прорастание по-разному. ИУК в концентрациях 10^{-10} – 10^{-12} М стимулировала прорастание пыльцевых трубок в 1.5 раза, при концентрациях 10^{-6} – 10^{-4} –М проявлялась тенденция к ингибированию их прорастания, а при концентрации 10^{-3} М прорастание пыльцы было полностью подавлено. Эффекты ИУК отмечали уже через 1 ч.

Кверцетин и кемпферол в низких концентрациях (10^{-12} – 10^{-8} М) стимулировали, а в высоких (10^{-4} – 10^{-6} М) ингибировали прорастание пыльцевых зерен (Табл.1). Эффекты кверцетина и кемпферола проявлялись только через 4–6 ч культивирования. В концентрации 10^{-3} М оба Фл ингибировали рост пыльцевых трубок на 30% (Табл.1).

Таблица 1.

Эффекты экзогенных флавонолов на рост *in vitro* пыльцевых трубок петунии двух клонов, в мкм

Концентрация, М	Самосовместимый клон		Самонесовместимый клон	
	Кверцетин	Кемпферол	Кверцетин	Кемпферол
0 (контроль)	205.5 ± 9.4	205.5 ± 9.4	252.5 ± 9.4	252.5 ± 9.4
10^{-12}	257.5±10.9	236.2±15.1	323.8±10.3	317.8±16.8
10^{-10}	220.0±13.8	222.5±14.3	219.1±19.0	226.3±12.5
10^{-8}	192.5±12.5	213.3±15.6	211.5±10.0	203.7±16.8
10^{-6}	172.5±8.9	189.8±10.2	205.5±8.9	200.6±14.8
10^{-4}	166.3±10.5	171.7±10.9	200.4±10.3	198.9±11.6
10^{-3}	131.3±8.8	145.5±9.6	176.9±6.3	170.2±11.56

Длину пыльцевых трубок измеряли после 6 ч культивирования на среде (0.4 М сахарозы и 1.6 мМ борной кислоты). Приведены средние арифметические и их стандартные отклонения из 3 независимых опытов, каждый из которых проведен в 2-кратной биологической повторности (n=6). Досто-

верность различий между вариантами оценивали по t-критерию Стьюдента при уровне значимости $P < 0.05$.

Обсуждение

При прорастании пыльцы как *in vitro*, так и *in vivo*, при прорастании и росте пыльцевых трубок в тканях рыльца уровни ИУК и ФЛ повышались. Подобную закономерность наблюдали в течение 3–4 ч после совместимого и несовместимого опыления. Можно предположить, что рост мужского гаметофита в тканях столбика в значительной степени определяется именно эндогенными запасами ИУК и ФЛ. Обращает на себя внимание, что прорастающий мужской гаметофит самосовместимого клона (по сравнению с самонесовместимым) характеризовался более высоким уровнем ИУК и ФЛ. Очевидно, выявленные нами корреляции в содержании ИУК и Фл являются существенным фактором формирования фертильности мужского гаметофита.

В соответствии с литературными данными [4], можно представить Фл как сигнальные молекулы, участвующие в процессах роста и развития растений. В пыльце петунии выявлен специфический фермент – флавонол-3-*O*-галактозилтрансфераза (F3GalTase). Этот фермент экспрессируется исключительно в мужском гаметофите и контролирует образование гликозилированных Фл (флавонол-3-*O*-галактозидов) [8]. В других экспериментах обнаружили, что после обработки кемпферолом в пыльце петунии возрастала транскрипция генов, кодирующих регуляторные (или сигнальные) белки [2]. Согласно высказанной в 60-х годах прошлого века идее, Фл могут контролировать рост и развитие растений, влияя на транспорт ауксинов [9]. В последние годы появляется все больше данных в пользу представлений о том, что ингибирование транспорта ауксина, так же как и сам его транспорт, является существенным фактором, определяющим распределение фитогормона и, тем самым, обеспечивающим устойчивое состояние растения. Можно предположить, что в исследуемой нами системе Фл блокируют отток ауксина из прорастающего мужского гаметофита, повышая, тем самым, его внутриклеточную концентрацию, что, в свою очередь, способствует полярному росту пыльцевых трубок.

Выводы

Зрелый мужской гаметофит петунии, по сравнению со спорофитными тканями пестика, характеризуется более высоким уровнем флавонолов.

Прорастание и рост мужского гаметофита сопровождаются повышением содержания флавонолов.

Экзогенные ИУК и флавонолы стимулировали на 25–30% как прорастание, так и рост *in vitro* пыльцевых трубок.

Литература

1. Van der Meer I.M., Stam M. E., van Tunen A.J., Mol J.N., Stuitje A.R. Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in *Petunia* anthers results in male sterility // Plant Cell. –1992. –V. 4. –P. 253-262.

2. Derksen J., van Wezel R., Knuiman B., Ylstra B., van Tunen A.J. Pollen tubes of flavonol-deficient *Petunia* show striking alterations in wall structure leading to tube disruption // *Planta*. 1999. –V. 207. – P. 575-581.

3. Peer W.A., Brown D.E., Tague B.W., Muday G.K., Taiz L., Murphy A.S. Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* –2001.- V. 126.- P. 536-548.

4. Benjamins R., Ampudia C.S.G., Hooykaas P.J.J., Offringa R. PINOID-mediated signalling involves calcium-binding proteins // *Plant Physiol.* 2003. –V. 132.- P. 1623-1630.

5. Murphy A., Peer W.A., Taiz L. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids // *Planta*. 2000.- V. 211. –P. 315-324.

6. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их определения // Биохимические методы в физиологии растений – Наука. –1971.- С. 185-197.

7. Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Курапов П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н. Изменения в содержании гормонов в развивающихся сеянцах ячменя // *Агрохимия*.- 1999. – Т. 8.- С. 49-53.

8. Rubery P., Jacobs M. Auxin transport and its regulation by flavonoids // *Plant Growth Substances*. Eds Pharis R., Rood S. Berlin: Springer-Verlag.- 1988. –P. 428-440.

9. Brown D.E., Rashotte A.M., Murphy A.S., Normanly J., Tague B.W., Peer W.A., Taiz L., Muday G.K. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*// *Plant Physiol.*- 2001.- V. 126.- P. 524-535.

Резюме

Получены экспериментальные данные в пользу гипотезы о том, что Фл могут быть эндогенными регуляторами транспорта ИУК в прогамной фазе оплодотворения.

Experimental data have been obtained in favour of hypothesis that flavonols act as endogenous regulators of auxin transport in course of progamic phase of fertilization.

Отримані експериментальні дані на користь гіпотези про те, що Фл можуть бути ендогенними регулювальниками транспорту ІУК в прогамній фазі запліднення.

КОВБАСЕНКО Р.В., ДЯЧЕНКО А.І., ДМИТРИЄВ О.П.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: kovbasenko@yandex.ru

ІНДУКЦІЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТОМАТУ (*LYCOPERSICON ESCULENTUM*) ДО ХВОРОБ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Протягом останніх років середній врожай культурних рослин в агропромисловому комплексі складає, як правило, 28-30 % від рекордних. Основною причиною такого розриву є різноманітні стреси, з якими рослини зустрічаються протягом онтогенезу. Посуха, підтоплення, засолення, істотно знижують продуктивність рослин. Але найбільші втрати врожаю викликають збудники хвороб та шкідники. Тому підвищення стійкості рослин до біотичних стресів привертає увагу багатьох дослідників [1].

Томати – одна з найпопулярніших культур в Україні, яка складає майже третину валового збору овочів. Переважна більшість зареєстрованих у державі сортів і гібридів томатів для відкритого ґрунту мають недостатню стійкість до збудників найбільш шкочинних хвороб. Традиційний селекційний процес, який включає цикл гібридних схрещувань та доборів, безумовно, залишається основним. Разом з тим застосування біотехнологічних методів при створенні вихідних форм томата відкриває важливі перспективи. Мікроклональне розмноження культури томатів через калусогенез дає можливість використовувати різноманітні селективні чинники для індукування соматоклональної варіабельності, що значно прискорює відбір та розмноження необхідних ліній із бажаними корисними ознаками. Метою наших досліджень було отримання форм томатів із підвищеною толерантністю до хвороб та закріплення цієї важливої ознаки з домінуванням у наступних поколіннях.

Активність різних хімічних речовин в якості мутагенів досліджується давно [2]. Найбільш часто для цієї мети застосовуються етилметансульфонат і N-етил-N-нітросечовина [3]. В якості мутагенів використовують також іонізуюче опромінення та хімічні мутагени (N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин і N-нітрозометилсечовину) [4]. Для індукування соматоклональної варіабельності в культурі *in vitro* були запропоновані регулятори росту такі як гіберелін, розчини солей заліза [5], культар і нарцис [6], пікс і фуrolан [7], крезацин та препарати з групи піридинів [8]. В результаті застосування біотехнологічних підходів в різних лабораторіях нашої країни було одержано кілька ранньостиглих ліній дині, адаптивні до несприятливих умов сорти цибулі і картоплі, вихідні форми тютюну та інших рослин [2], а також високопродуктивні ранньостиглі сорти томатів [8] та із суцвіттям складна китиця [6] і придатні для механізованого збирання та транспортування [7]. При роботі з хімічними мутагенами досить часто проявляється їх токсична дія на ізольовані клітини. Стабільно високий відсоток летальності при недостатньо контрольованому використанні може призвести до загибелі популяції клітин, а тому при роботі із хімічними мутагенами, як правило, використовуються невисокі дози, які досить часто викликають мутагенні ефекти [9].

Матеріали та методи

Об'єктом досліджень були сортозразки томатів Хорів, Бобриський, Ладідний, Борівський, та Боян. Роботу з рослинами в культурі *in vitro* здійснювали згідно із загальноприйнятими стандартизованими методиками. Калусні культури ініціювали із апексів проростків, а морфогенез та культивування проводили на модифікованому нами мінерально-сольовому агаризованому живильному середовищі за Мурашиге та Скугом [5, 10]. Одержані рослини вирощували в теплиці та в польових умовах за рекомендованими сучасними технологіями [11].

Результати та обговорення

В роботі були використані два нових фіторегулятори росту – циркон та епін-екстра (“НЭСТ М”, Росія). Регулятор росту циркон містить комплекс гідрооксикоричних кислот із ехінацеї пурпурової (*Echinacea purpurea* L.), який активно впливає на метаболізм рослинної клітини, а також бере участь у регуляції її гормонального статусу та ензиматичного профілю. Гідрооксикоричні кислоти виконують важливу для клітини антиоксидантну функцію шляхом активування відповідних ферментів (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза), захищають ІОК через механізм інгібування активності ауксиноксидази, а також, що досить суттєво з точки зору протекторної ролі препарату, інгібують інтегразу вірусу, стимулюючи таким чином безпосередню противірусну дію. Через участь у підтриманні необхідного окисно-відновного балансу клітини гідрооксикоричні кислоти стимулюють розвиток рослини. Результатом такого збалансованого розвитку стає активація фітогормонів, найчастіше ауксину, стимуляція синтезу хлорофілу, підсилення енергії проростання насіння, підвищення резистентності рослин до біотичних та абіотичних стресів. В рослинах гідрооксикоричні кислоти швидко метаболізуються [12].

Регулятор росту епін-екстра – розчин епібрасиноліду в спирті. По механізму дії дуже схожий на фітогормони рослин. Він контролює баланс речовин в рослинах (гомеостаз) і є добрим адаптогеном – бере участь у синтезі антистресових білків. При застосуванні цього регулятора росту розсада не “витагується”, стає більш стійкою до заморозків, хвороб, посухи, а також добре приживається при пікіровці і пересадці у відкритий ґрунт. У оброблених епін-екстра рослин не опадає зав’язь. В підвищених дозах брасиностероїди стримують ріст і підвищують стійкість рослин до абіотичних стресових факторів [13]. Обидва ці регулятори росту є класичними індукторами резистентності рослин до хвороб.

Для індукції калюсогенезу та стабілізації процесів регенерації рослин із первинних калюсів (сегменти гіпокотилу) ми застосовували апробовані та модифіковані в попередніх дослідженнях на культурі томатів агаризовані живильні середовища за прописом Мурашиге і Скуга [14], додаючи до них по 4,0-4,5 мг/л кінетину й ІОК кислоти та відбираючи найбільш морфогенні структури для подальшої роботи. Проведені нами досліди були спрямовані на вивчення можливостей цих двох речовин та/або їх метаболітів індукувати бажані соматональні мутації, оскільки відомо, що основним призначенням цих індукторів резистентності рослин є стимуляція захисних реакцій в процесі онтогенезу.

Одержані результати свідчать, що запропоновані нами регулятори росту, які виступають в якості селективних чинників, зокрема циркон та епін-екстра, при додаванні їх до агаризованого живильного середовища за прописом Мурашиге і Скуга в нашій модифікації на 11,5-12,0 % стимулювали процеси калюсогенезу та морфогенезу в культурі *in vitro*. Виявилось, що

вони також індукують мутаційний процес у напрямку одержання рослин томатів з підвищеною стійкістю до основних хвороб. Найбільш успішні результати були нами одержані у варіанті із застосуванням 0,005 мг/л циркону і 0,007 мг/л епін-екстра, коли отримали найвищий відсоток бажаних рослин. Далі одержані нами рослини були інтродуковані в тепличних та польових умовах лабораторних ділянок, де виділено 2 вихідні форми КР-1 і КР-2. Основні їх характеристики представлені в таблиці.

В результаті проведених досліджень встановлено, що одержані нами дві нові вихідні форми томату КР-1 і КР-2 в польових умовах на природному інфекційному фоні мають в 1,1-2,4 рази нижчу уражуваність найбільш поширеними в Лісостеповій зоні України шкочинними хворобами, які викликані грибними, бактеріальними і вірусними збудниками, що вказує на їх підвищену хворобостійкість. При цьому не відмічено зниження продуктивності обох форм томатів та інших господарсько-важливих показників. В подальшому форми КР-1 та КР-2 можна використовувати в селекційному процесі для одержання більш резистентних до хвороб сортів і гібридів томатів. Також запропоновані нами індуктори резистентності рослин у визначених дозах можна рекомендувати для застосування в культурі *in vitro* для інших рослин.

Таблиця

Характеристика двох одержаних вихідних форм томату

Показники	КР-1	КР-2	Сорт Лагідний, стандарт
Продуктивність, т/га	78,7	78,8	78,5
Розвиток основних хвороб, %:			
рання суха плямистість	7,2	7,1	7,8
фітофтороз	8,8	8,8	9,4
диплодіоз	1,0	1,0	2,4
чорна бактеріальна плямистість	1,3	1,4	2,6
зморшкувата мозаїка	4,0	4,1	4,7
скручування листя	9,9	10,0	12,8

Висновок

Додавання до модифікованого нами мінерально-сольового агаризованого середовища (за Мурашиге і Скугом) селективних чинників (циркону та епін-екстра) в необхідних концентраціях (0,05-0,07 мг/л) індукує в культурі *in vitro* при калюсогенезі та морфогенезі мутаційний процес із формуванням рослин томатів з підвищеною стійкістю до основних хвороб.

Література

1. Дмитрів О.П. Індукування системної стійкості у рослин біогенними елісінторами // Збірник наук. праць Селекційно-генетичного Ін-ту. – 2008. – Одеса СГІ-НЦНС. – С. 256-265.

2. Шевелуха В.С., Калашиникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высш. шк., 2003. – 469 с.

3. Flick C.E. Isolation of mutants from cell culture.// Handbook of Plant Cell Culture. Techniques for Propagation and Breeding. – New York: Macmillan, 1983. – Vol. 1. – P. 393-441.

4. Krumbiegel G. Response of haploid and diploid protoplast from *Datura innoxia* and *Petunia hybrida* L. to treatment with x-rays and a chemical mutagen.// Environ. Exp. Bot. – 1979. – 19. – P. 99-103.

5. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. – К.: Наук. думка, 2005. – 270 с.

6. Ковбасенко Р.В., Ковбасенко К.П., Ковбасенко В.М. Індукція суцвіття складної китиці у томата.// Овочівництво і баштанництво. – 2005. – Вип. 51. – С. 260-263.

7. Ковбасенко Р.В., Ковбасенко В.М. Індукція твердості плода томата.// Наук. вісник національного аграрного університету. – 2008. – Вип. 118. – С. 42-45.

8. Ковбасенко Р.В., Ковбасенко В.М. Індукція ранньспелості у томата.// Соврем. тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы. Материалы I междуна. научно-практич. конф-ции. М.: ВНИИССОК, 2008. – С. 302-304.

9. Шевелуха В.С. Рост растений и его регуляция в онтогенезе. – М.: Колос, 1992. – 325 с.

10. Бутенко Р.Г. Культура клеток и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – 344 с.

11. Довідник по овочівництву і баштанництву. – К.: Урожай, 1981. – 293 с.

12. Малеванная Н.Н., Быховская Н.В. Циркон – новый фитопрепарат для сельского хозяйства, полученный на основе нетрадиционного растительного сырья. – М.: ЦИНАО, 2001. – 10 с.

13. Малеванная Н.Н., Быховская Н.В. Эпин-экстра – регулятор роста и адаптоген широкого спектра действия. – М.: ЦИНАО, 2002. – 8 с.

14. Желтоножська Л.В., Мусяка В.К., Ковбасенко В.М. та ін. Методичні аспекти створення вихідних форм томата, толерантних до абіотичних факторів // Овочівництво і баштанництво. – 2002. – Вип. 47. – С. 109-112.

Резюме

Оптимізоване живильне середовище для мікроклонального розмноження томатів та запропоновані індуктори стійкості (циркон та епін-екстра) в концентраціях (0,05-0,07 мг/л), необхідних для одержання рослин, резистентних до основних хвороб в культурі *in vitro*.

Оптимизирована питательная среда для микроклонального размножения томатов и предложены индукторы устойчивости (циркон и эпин-экстра) в концентрациях (0,05-0,07 мг/л), необходимых для получения растений, резистентных к основным болезням в культуре *in vitro*.

The nutrient medium for microclonal tomato reproduction was optimized. Resistance enhancers (zircon and epin-extra) in necessary concentrations (0,05-0,07 mg/l) were successfully applied for breeding of disease resistant tomato plants *in vitro*.

КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., ДЕМЧУК Т.Л.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: julyja@i.ua*

РЕГЕНЕРАЦІЯ ВИДУ *LYCOPERSICUM ESCULENTUM* MILL. ЧЕРЕЗ КУЛЬТУРУ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ

Проблема харчування населення не знижує своєї актуальності в сучасному світі. Помідор – є найпоширенішою овочевою рослиною родини пасльонових. Світове виробництво його становить близько 70 млн. т. В обсягах переробки овочевої сировини плоди помідора становлять понад 80%. В Україні помідор вирощують на площах, залежно від року, від 140 до 170 тис. га. Урожайність його, стосовно регіону, коливається від 15,0 до 60,0 – 90,0 т/га. Біологічні можливості рослини в умовах відкритого ґрунту сягають до 200, а в захищеному – 600 т/га. Популярність культури помідора зумовлена її екологічною пластичністю, високою врожайністю, універсальністю щодо використання плодів, біологічною цінністю. Плоди помідора відрізняються поживними, смаковими, дієтичними і протекторними властивостями.

В Україні томату належить одне з провідних місць у забезпеченні населення високовітамінними продуктами харчування. У плодах томату міститься 0,95% білка, 3,5 – 4% вуглеводів, 3,5 – 8,0% цукрів, мінеральні речовини, органічні кислоти (лимонна, яблучна, винна, янтарна, щавелева), також високомолекулярні жирні кислоти, різні вітаміни і провітамін А. Завдяки такому складу томату і препарати з них володіють великою кількістю різноманітних лікарських властивостей: від протизапальної, бактеріцидної і загально підтримуючого до противоракового і антисклеротичного. Основні параметри якості томату визначаються багатьма показниками, в тому числі агрокліматичними умовами вирощування, сортами і стійкістю проти захворювань [2, 3].

Сучасний селекційний процес рослин неможливий без застосування методів клітинної і генної інженерії. Впровадження у сільське господарство України методів біотехнології рослин може забезпечити гарантоване виробництво високоякісної сільськогосподарської продукції і сприяти побудові сучасної економіки. Біотехнологія має унікальні можливості практичного використання: це і мікроклональне розмноження рослин, і клітинна селекція, що уможливило цілеспрямований відбір мутантних форм із потрібними ознаками, і оздоровлення рослин. На початку ХХІ століття основним інструментом для створення високоцінного посадкового і насінневого матеріалів сільськогосподарських, технічних, плодоовочевих й декоративних рослин з високим морфогенетичним потенціалом та стійкістю до патогенів є використання культури ізольованих клітин, тканин та органів рослин.

В зв'язку з цим увага дослідників зосереджена на відпрацюванні методів культивування і відбору рослинних клітин, а також регенерації рос-

лин *in vitro*. Без успішної регенерації всі технології генної і клітинної інженерії не матимуть практичного виходу.

Вивчення морфогенетичного потенціалу тканин і органів рослин томатів в умовах *in vitro* є надзвичайно важливим для наукових дослідів та практичних цілей. Останнє пов'язано з тим, що використання тканин дорослих рослин в якості первинного експлантата дозволяє отримувати посадковий матеріал зі збереженими цінними народногосподарськими властивостями. Визначальним фактором, який регулює диференціацію і морфогенез ізольованих тканин й органів, є наявність у живильному середовищі регуляторів росту – ауксинів, цитокінінів та гіберелінів. При підборі співвідношень і концентрацій цих сполук можна спрямовано регулювати їх органогенну дію [1, 6].

Метою нашої роботи було отримання морфогенного калосу, рослин-регенерантів та визначення жирнокислотного складу ліпідів калюсних тканин томатів сорту Оксамит, що буде слугувати підґрунтям для подальших досліджень з підвищення адаптивних властивостей та продуктивності томатів.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були калюсні тканини томатів сорту Оксамит. Для одержання первинного калосу як експлантат використовували сегменти стебла, листків, сім'ядольних листків. Для цього насіння стерилізували 5 хв. в 70%-вому розчині спирту, потім 20 хв. в 16,5% розчині пероксиду водню і вирощували 4–5-денні асептичні проростки томатів на безгормональному середовищі МС в темряві при 25 ± 1 °С. Для індукції калусогенезу експлантати висаджували на модифіковані середовища Мурасіге-Скуга (МС) [8], які містили 8,0 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК), 4,0 мг/л кінетину (МС1); 4,0 мг/л 6-бензиламінопурина (6-БАП), 2,0 мг/л нафтилоцтової кислоти (НОК) (МС2). Експлантати вирощували при 26°C в темряві протягом 10–14 діб. Після утворення первинного калосу продовжували інкубування при освітленні 2 клк і 16-годинному фотоперіоді. Частоту індукції калусогенезу (у відсотках) визначали як відношення числа експлантатів, що утворили калус, до початкової кількості експлантатів. Для індукції морфогенезу калус, отриманий на різних експлантатах, переносили на регенераційне середовище МС, доповнене 0,2 мг/л 6-БАП.

Ліпіди з калюсних клітин екстрагували сумішню хлороформ-метанол-вода (1:2:0,8). Жирнокислотний склад ліпідів калюсних тканин вивчали методом газорідинної хроматографії їхніх метилових ефірів [5, 7]. Для одержання метилових ефірів жирних кислот висушені ліпіди суспендували в 5 мл метанолу, що містив 1,5% H₂SO₄. Метилування здійснювали в запаяних ампулах при 80°C протягом 1 год. Метиліві ефіри жирних кислот екстрагували сумішню ефір-гексан (1:1). Проби перемішували та, після їхнього розшарування, відбирали верхню фракцію, яка містить метиліві

ефіри жирних кислот. Екстракцію здійснювали тричі. Одержані екстракти об'єднували і упарювали на вакуумному роторному випаровувачі.

Результати і обговорення

У досліджах ми використовували різні типи експлантатів для отримання первинного калюсу: сегменти стебла, листків, сім'ядольних листків. На всіх типах експлантатів формувався калюс, але з різною частотою – від 40 – до 100%. Справжні і сім'ядольні листки були ефективнішими експлантами для отримання первинного калюсу в порівнянні з сегментами стебла. Частота індукції калюсоутворення при використанні листових експлантатів була максимальною і становила 86–100 %. При цьому найвищий відсоток калюсоутворення спостерігали на середовищі МС1. При формуванні первинного калюсу із сім'ядольних листків частота калюсогенезу на середовищі МС1 була 100%, при цьому приріст калюсної маси становив 860 мг, тоді як на середовищі МС2 – 540 мг. При використанні сегментів стебла як первинного експлантату максимальна частота калюсогенезу становила 76%. Отже, тип експлантату визначає максимальні і мінімальні показники частоти калюсогенезу.

За використання різних типів експлантатів встановлені відмінності в типах і швидкості формування первинного калюсу. Початок калюсогенезу при формуванні калюсних тканин з справжніх листків відбувався найшвидше – на 2–5 добу з дня перенесення на середовище для культивування. За культивування сім'ядольних листків на поверхні живильного середовища протягом перших трьох днів спостерігали значне їхнє набухання. На четвертий день культивування у 53% експлантатів відмічали початок калюсоутворення, а на 10 добу калюс утворювався у 100% експлантатів. Довше за все формувався калюс з сегментів стебла – на 10–14 добу. Відмінності зафіксовані також за ступенем оводненості, щільності, кольору, наявності елементів диференціювання і прояву морфогенетичного потенціалу.

З сегментів стебла формувався сильно оводнений рихлий майже прозорий пастельного кольору калюс. Із сім'ядольних листків – щільніший менш оводнений коричнюватий калюс (рис. 1), що характеризується наявністю елементів диференціації. Такого ж типу калюс – щільний і світло коричневий, формувався при використанні в якості експлантатів справжніх листків (рис. 2).

У подальших дослідженнях при перенесенні калюсних тканин, сформованих з різних експлантатів, на середовище для індукції морфогенезу встановлено відмінності в морфогенетичному потенціалі різних типів калюсу. Щільний світло коричневий морфогенний калюс, сформований із справжніх листків, характеризувався регенераційною здатністю. На 10–15 добу культивування на середовищі для регенерації було відмічено формування проростків і коріння (рис. 3). Частота регенерації становила 68,5–85,0%. Морфогенез гомогенного рихлого калюсу, сформованого з сегментів стебла, відбувався лише по шляху інтенсивного формування коріння (рис.

4). Багатьма дослідниками відмічено, що такий тип морфогенезу не є регенераційно здатним, тобто надалі неможливе формування повноцінних фертильних рослин-регенерантів [4].

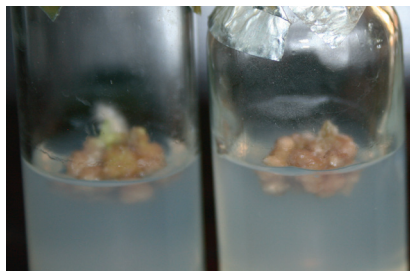


Рис. 1. Калус з сім'ядольних листків.

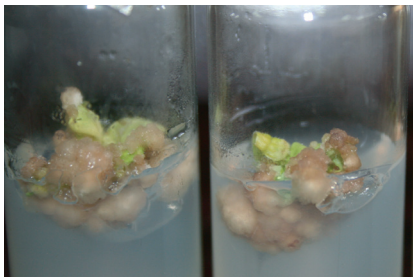


Рис. 2. Щільний, світло коричневий калус із справжніх листків.



Рис. 3. Регенерація проростків із морфогенного калусу, сформованого із справжніх листків.

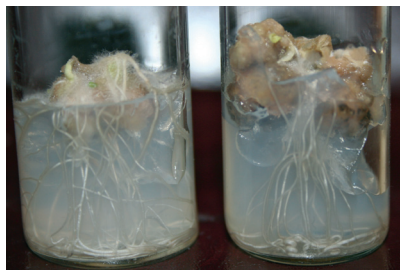


Рис. 4. Регенерація коренів із рихлого калусу, сформованого з сегментів стебла.

Наступним етапом нашої роботи було вивчення жирнокислотного складу ліпідів калусних тканин томатів сорту Оксамит. Ліпіди калусних тканин томатів характеризувалися наявністю жирних кислот з числом вуглецевих атомів від C_{15} до C_{24} . Серед них насичені (тетрадеканова, пентадеканова, гексадеканова, октадеканова, ейкозанова, докозанова, тетракозанова), мононенасичені (гексадеценова, *cis*-октадеценова, *trans*-октадеценова), диненасичені (9,12-октадекадієнова) жирні кислоти. В ліпідах калусних клітин виявлені жирні кислоти переважно з парним числом вуглецевих атомів. Ліпіди характеризуються високим вмістом ненасичених кислот. Вміст мононенасичених жирних кислот становив 13,92%, диненасиченої кислоти – 46,52%. Серед мононенасичених кислот переважала *cis*-октадеценова кислота (12,22%). Сумарний вміст насичених кислот становив 39,56%. Основною кислотою серед насичених є гексадеканова кислота – 30,56%, вміст інших кислот не перевищував 3,73%.

Висновки. Вид обраного експлантату визначає тип сформовано-го калюсу: справжні і сім'ядольні листки формують компактний гетерогенний калюс, що володіє морфогенним потенціалом; сегменти стебла – дають початок рихлому гомогенному калюсу, не здатному до повноцінної регенерації. У ліпідах калюсної тканини томатів сорту Оксамит основними жирними кислотами є гексадеканова, 9,12-октадекадієнова та *cis*-октадеценева.

Література

1. *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. *Внучкова В.А.* Разработка метода получения растений-регенерантов томата в условиях культуры тканей // Физиология растений. – 1977. – Т. 21, № 5. – С. 1094 – 1100.
3. *Горбатенко И.Ю.* Микроразмножение различных генотипов томата *in vitro* // Доклады ВАСХНИЛ. – 1990. – № 12. – С. 18 – 22.
4. *Горбатенко И.Ю.* Особенности регенерации у различных генотипов томата *in vitro* // Состояние и перспективы сельскохозяйственной биотехнологии. – Л., 1986. – С. 118 – 120.
5. *Жеребило О.Е., Вишталюк Н.М.* Жирные кислоты общих липидов некоторых представителей рода других энтеробактерий // Микробиол. журн. – 1987. – 49, №6. – С. 83 – 85.
6. *Кушнір Г.П., Сарнацька В.В.* Мікроклональне розмноження рослин., Теорія і практика. – К.: Наук. думка, 2005. – 270 с.
7. *Brian B.L., Gardner E.W.* Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gasliquid chromatography // Appl. Microbiol. – 1967. – 15, № 6. – P. 1499 – 1500.
8. *Murasige T., Scoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. plant. – 1962. – 15. – P. 473 – 497.

Резюме

Досліджено процеси індукції калюсогенезу томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сорту Оксамит. Показано, що ефективність процесу та тип калюсної тканини обумовлені обраним експлантатом. Встановлено, що морфогенний потенціал проявляють калюси зі справжніх і сім'ядольних листків. Показано, що в ліпідах калюсних тканин основними жирними кислотами є гексадеканова, 9,12-октадекадієнова, *cis*-октадеценева.

Исследованы процессы индукции каллусогенеза томатов (*Lycopersicon esculentum* Mill.) сорта Оксамит. Показано, что эффективность процесса и тип каллусовой ткани обусловлены выбранным эксплантатом. Установлено, что морфогенетическим потенциалом обладают каллусы из настоящих и семядольных листьев. Показано, что в липидах каллусных тканей главными жирными кислотами были гексадекановая, 9,12-октадекадиеновая, *cis*-октадеценевая.

The processes of callusogenesis induction of tomato *Lycopersicon esculentum* Mill., cultivar Oksamyt were investigated. It was shown that callusogenesis and the type of callus tissue were caused by the type of explants. It was established that the callus from mature cotyledonous leaf and leaf explants had morphogenetic potential. It is shown, that

in callus tissue lipids the main fat acids were hexadecanoic, 9,12-octadecadienoic, cis-octadecenoic.

КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., КРИНИЦЫНА А.А., КИНАШ Е.А., ЖУЧЕНКО А.А.*

ГНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН,

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, e-mail: recombination@iab.ac.ru

**Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,*

Россия, 119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, ГСП 1

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ МЕЙОЗ-СПЕЦИФИЧНЫХ ЭНДОНУКЛЕАЗ SPO11 SACCCHAROMYCES CEREVISIAE ИЛИ SPO11-1 ARABIDOPSIS THALIANA

Мейотическая рекомбинация, базирующаяся на перекомбинации отдельных хромосом и кроссинговере – основной процесс, генерирующий генетическую изменчивость в потомстве гибридов. Перекомбинация отдельных хромосом хорошо известна и лежит в основе менделевской генетики. Кроссинговер – молекулярный механизм, основанный на репарации двухцепочечных разрывов ДНК, необходим для правильной сегрегации гомологичных хромосом и приводит одновременно к обмену участками ДНК между ними.

В мейозе кроссинговер инициируется запрограммированными двухцепочечными разрывами ДНК, осуществляемыми эндонуклеазами Spo11. Механизмы, отвечающие за распределение и частоты возникновения в мейозе двухцепочечных разрывов ДНК консервативны, поскольку мейотическая рекомбинация предпочтительно происходит в областях хромосом, получивших название «горячих» точек рекомбинации. Вследствие этого обмену, как правило, подвергаются одни и те же участки хромосом, что на практике приводит к преобладанию в потомстве гибридов спектра генотипов, среди которого трудно обнаружить формы с желаемым или нетрадиционным сочетанием генов. Перераспределение «горячих» точек рекомбинации или изменение их активности может повлиять на частоты мейотической рекомбинации между гомологичными или гомеологичными хромосомами, изменить спектр рекомбинантных генотипов в потомстве гибридов и повысить эффективность традиционных селекционных методов.

Белки Spo11 есть у всех эукариот, геном которых изучен: растения, насекомые, дрожжи, млекопитающие [1]. Эндонуклеаза Spo11 представляет собой субъединицу А топоизомеразы II [2]. Предполагают, что белок Spo11 в мейозе сам определяет участки хромосом, в которые вносит двухцепочечные разрывы ДНК [3]. В тоже время, сравнение некоторых «горячих» точек из дрожжей *S. cerevisiae* и растений *A. thaliana* не выявило корреляции между их последовательностями [4, 5]. Этот факт дает основание предпо-

лагать, что белки Spo11 из различных организмов способны в мейозе инициировать двухцепочечные разрывы в разных участках хромосом, вне зависимости от первичной последовательности ДНК.

Существуют, по крайней мере, два пути реализации кроссинговера у растений, один из которых обусловлен интерференцией, а другой независим или мало зависим от нее [6]. Интерферирующий путь кроссинговера (Pathway 1 или P1) регулируется генами комплекса ZMM, а не интерферирующий (Pathway 2 or P2) работой фермента Mus81 и ассоциированных с ним белков, причем доля пути P2 у томата *Solanum lycopersicum* не превышает 30 % [7]. При этом известно, что создание новой «горячей» точки вблизи уже существующей, уменьшает частоту инициации двухцепочечных разрывов ДНК в обеих, а разрушение «горячей» точки стимулирует активности близлежащих точек [8, 9]. Мы полагаем, что экспрессия в клетках растений томата генов SPO11 *S. cerevisiae* (scSPO11) или SPO11-1 *A. thaliana* (atSPO11-1) приведет к появлению новых точек кроссинговера или к изменению активности уже имеющихся и, таким образом, окажет влияние на рекомбинацию между гомологичными или гомеологичными хромосомами.

Настоящая работа основана на создании и изучении трансгенных растений томата, экспрессирующих гены scSPO11 или atSPO11-1.

Материалы и методы

Ген SPO11 *S. cerevisiae* был клонирован нами ранее [10]. Ген SPO11-1 *A. thaliana* был любезно предоставлен профессором М. Grelon [11]. Трансформацию растений томата сорта Марглоб проводили согласно опубликованным ранее данным [12]. Молекулярно-биологический анализ выполнен с использованием полимеразной цепной реакции и разработанных праймеров на последовательность генов virE2, scSPO11 или atSPO11-1 (табл. 1).

Таблица 1

Праймеры для молекулярно-биологического анализа растений.

Ген	Праймер	5'–3'	Продукт ПЦР, п. н.
virE2	virE(plus)	cgaatacattctcgtcgtcaaacg	600
	virE(minus)	tttcgagtcatgcataatgcctgac	
scSPO11		[10]	
atSPO11-1	atspo11 «+»	ggatccatggagggaattcgcgtatttc	1089
	atspo11 «-»	tctagaatcaaggagagcttacttcacgac	

Выделение геномной ДНК из растений проводили с помощью цетилтриметиламмоний-N-бромид («Sigma», США), а тотальной РНК с использованием Tri reagent («Sigma», США). Для получения кДНК использовали олигонуклеотид dT(18) и обратную транскриптазу M-MuLV («Fermentas», Литва). Температура отжига праймеров («Синтол», Россия) при проведении ПЦР составляла 58°C, количество циклов 35. Для определения размеров

продуктов ПЦР использован маркер *GeneRuler™ 1000 п.н. + ДНК-маркер* («Fermentas», Литва).

Результаты и обсуждение

Для переноса и экспрессии в растениях томата гены *scSPO11* или *atSPO11-1* были клонированы в созданную ранее плазмиду *p35S-recA* [13], предварительно гидролизованную по сайтам *BamH* и *XbaI*, с получением плазмид *p35S-scSPO11* и *p35S-atSPO11-1*, в которых экспрессия генов *scSPO11* или *atSPO11-1* контролируется конститутивным промотором *35S PНК CaMV*. Плазмиды *p35S-scSPO11* и *p35S-atSPO11-1* были перенесены в агробактериальный штамм *AGL0*, с использованием которого была проведена трансформация растений томата сорта Марглоб, при этом в качестве эксплантов использовали семядоли 10-14 дневных проростков. Для элиминации агробактерии после кокультивации использовали антибиотик тиментин в концентрации 150-300 мг/л. Получение каллуса, регенерацию побегов и их селекцию на канамицине проводили согласно опубликованным ранее работам [12]. В результате для каждой конструкции было получено 27 независимых регенерантов томата, устойчивых к канамицину в концентрации 100 мг/л.

Молекулярно-биологический анализ, проведенный с помощью ПЦР, позволил нам отобрать из числа регенерантов растения-трансформанты (19 образцов в каждой группе), не имеющие агробактериального заражения и содержащие последовательность целевых генов *scSPO11* и *atSPO11-1* (рис. 1).

Анализ тотальной РНК и кДНК трансформантов выявил растения томата (16 образцов в каждой группе), экспрессирующие гены *scSPO11* или *atSPO11-1*, соответственно обозначенные *35S-scSPO11* и *35S-atSPO11-1* (рис. 2).

Трансгенные растения, используемые в качестве модели для изучения мейотической рекомбинации, должны не только экспрессировать целевые гены, но и не отличаться по фертильности пыльцы от исходных растений. Нами было установлено, что у некоторых трансформантов фертильность пыльцы ниже, чем у не трансгенных растений сорта Марглоб. В тоже время, часть растений *35S-scSPO11* или *35S-atSPO11-1*, не отличается по этому показателю от контроля. Полученные результаты позволяют заключить, что различия в фертильности пыльцы между трансформантами не зависят от экспрессии целевых генов *scSPO11* или *atSPO11-1*, а, вероятно, определяются генотипом растений, сформировавшимся при трансформации в результате Т-ДНК-инсерционного мутагенеза или соматической изменчивости.

В настоящее время проводится гибридизация трансгенных растений томата, экспрессирующих гены мейоз-специфичных эндонуклеаз дрожжей или арабидопсиса, с маркерной линией Мо938. Полученные гибриды будут использованы для сравнительного изучения частоты мейотической рекомбинации между сцепленными маркерными генами.

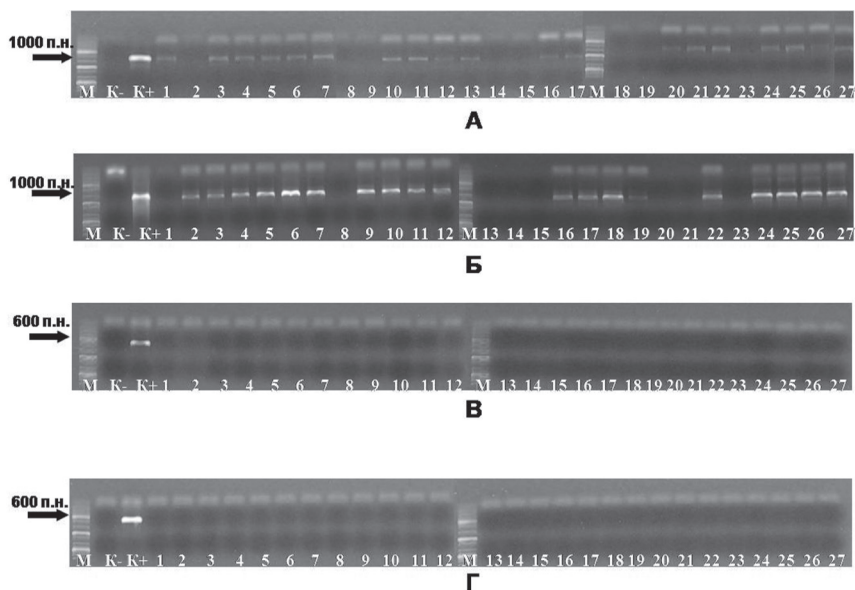


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием образцов ДНК регенерантов томата группы *scSPO11* (А, В) и *atSPO11-1* (Б, Г). А и Б – с праймерами к последовательности генов *scSPO11* или *atSPO11-1* (κ+ – положительный контроль *p35S-scSPO11* или *p35S-atSPO11-1*). В и Г – с праймерами к последовательности гена *virE2* (κ+ – ДНК из *A. tumefaciens*). М – маркер размера фрагментов ДНК. К- – отрицательный контроль (вода). 1-27 – регенеранты томата.

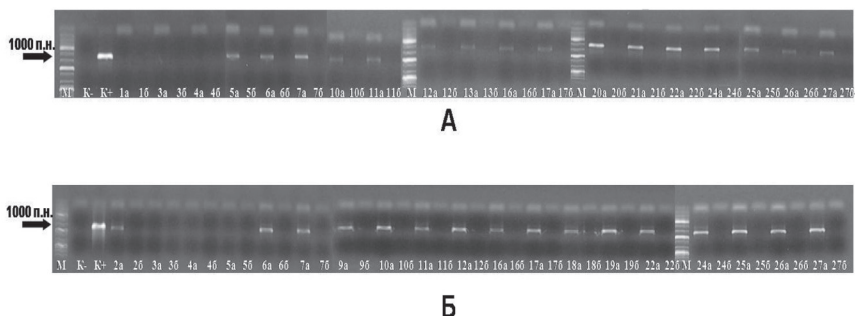


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации κДНК (а) или РНК (б) растений томата группы *scSPO11* (А) или *atSPO11-1* (Б) с использованием праймеров на последовательности целевых генов. К+ – положительный контроль (*p35S-scSPO11* или *p35S-atSPO11-1*). К- – отрицательный контроль (вода). М – маркер размера фрагментов ДНК.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 11-04-00873-а.

Литература

1. Hartung F., Puchta H. Molecular characterisation of two paralogous *SPO11* homologues in *Arabidopsis thaliana* // *Nucleic Acids Res.*- 2000.- 28(7).- P. 1548-1554.

2. Hartung F., Puchta H. Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaebacterial topoisomerase 6 in plants // *Gene.*- 2001.- V.271.- P. 81—86.

3. Murakami H., Nicolas A. Locally, meiotic double-strand breaks targeted by Gal4BD-Spo11 occur at discrete sites with a sequence preference // *Mol Cell Biol.*- 2009.- V. 29(13).-P. 3500-16.

4. Mezard C. Meiotic recombination hotspots in plants // *Biochemical Society Transactions.*- 2006.- V. 34.-P. 531-534.

5. Wahls W.P., Davidson M.K. Discrete DNA sites regulate global distribution of meiotic recombination // *Trends Genet.*- 2010.- V. 26(5). P. 202-208.

6. Falque M., Anderson L.K., Stack S.M., Gauthier F., Martina O.C. Two Types of Meiotic Crossovers Coexist in Maize // *The Plant Cell.*- 2009. V. 21.- P. 3915–3925.

7. Lhuissier F.G., Offenberg H.H., Wittich P.E., Vischer N.O., Heyting C. The mismatch repair protein MLH1 marks a subset of strongly interfering crossovers in tomato // *Plant Cell.*- 2007.-V. 19.-P. 862–876.

8. Fukuda T., Kugou K., Sasanuma H., Shibata T., Ohta K. Targeted induction of meiotic double-strand breaks reveals chromosomal domain-dependent regulation of Spo11 and interactions among potential sites of meiotic recombination // *Nucleic Acids Res.*- 2008.- V. 36(3).- P. 984-997.

9. Юнусов З.Р., Соловьев А.А., Михайленко С.Н., Комахин П.А., Жученко А.А. Влияние трансгенов на мейотическую рекомбинацию у высших эукариот, на примере растений томата // *Сельскохозяйственная биология.*- 2009. № 3.- С. 52-59.

10. Комахин П.А., Комахина В.В. Компартиментализация Spo11p в вегетативных клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // *Молекулярная биология.*- 2008.- Т.42. № 3.- С. 494-500.

11. Grelon M., Vezon D., Gendrot G., Pelletier G. *AtSPO11-1* is necessary for efficient meiotic recombination in plants // *EMBO J.*- 2001.- V. 20. № 3.- P. 589-600.

12. Park S.H., Morris J.L., Park J.E., Hirschi K.D., Smith R.H. Efficient and genotype-independent Agrobacterium-mediated tomato transformation // *J Plant Physiol.*- 2003.- V. 160. № 10.- P. 1253-1257.

13. Комахин П.А., Комахина В.В., Жученко А.А. Создание генетических конструкций содержащих бактериальный ген *recA E. coli* для индукции рекомбинации в растениях // *Сельскохозяйственная биология.*- 2007. № 3.- С. 25-32.

Резюме

Для индукции и изучения мейотической рекомбинации получены трансгенные растения томата, экспрессирующие гены мейоз-специфичных эндонуклеаз SPO11 *S. cerevisiae* и SPO11-1 *A. thaliana*.

Transgenic tomato plants with expression of genes of meiotic specific endonucleases SPO11 *S. cerevisiae* и SPO11-1 *A. thaliana* have been obtained to induce and study meiotic recombination frequency.

**КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ЛЕВИНА Т.А.,
ФАДИНА О.А., ЖУЧЕНКО А.А.***

ГНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН,

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, e-mail: recombination@iab.ac.ru

**Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,*

Россия, 119991, г. Москва, ул. Губкина, д. 3, ГСП 1

ИНДУКЦИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН БАКТЕРИАЛЬНОЙ РЕКОМБИНАЗЫ *recA* *ESCHERICHIA* *COLI*

Мейотическая рекомбинация – основной источник комбинативной изменчивости в потомстве гибридов, базирующийся на перекомбинации отдельных хромосом и кроссинговере. У растений кроссинговер, молекулярный механизм необходимый для правильной сегрегации гомологичных хромосом и взаимного обмена участками, проходит двумя альтернативными метаболическими путями в сайтах, которые называют «горячими» точками рекомбинации. Эта генетическая детерминированность кроссинговера ограничивает формирование в потомстве гибридов растений форм с нетрадиционным сочетанием генов. Перераспределение «горячих» точек рекомбинации или изменение их активности может оказать влияние на частоты мейотической рекомбинации между гомологичными или гомеологичными хромосомами, изменить спектр рекомбинантных или интрогрессивных генотипов в потомстве гибридов и повысить эффективность классических методов селекции.

Известно, что экспрессия гена *recA* *E. coli* в клетках растений табака в три раза повышала количество двухцепочечных разрывов ДНК, восстановленных по механизму гомологичной рекомбинации, и более чем в два раза увеличивала число сестринских хроматидных обменов [1, 2]. Это позволило нам предположить, что у растений экспрессия гена *recA* *E. coli* в профазе мейоза может также изменить число и распределение обменов между гомологичными или гомеологичными хромосомами.

Для изучения и индукции мейотической рекомбинации у растений нами были созданы трансгенные гибриды томата F_1 -*RecA* и F_1 -*NLS-RecA-LicBM3*, экспрессирующие соответственно гены *recA* *E. coli* или *NLS-recA-LicBM3* [3, 4]. Настоящая работа посвящена сравнительному анализу частоты мейотической рекомбинации (*rf* – recombination frequency) между сцепленными маркерными генами второй хромосомы у трансгенных гибридов томата и у их не трансгенных аналогов.

Материалы и методы

Гибриды F_1 -*RecA* и F_1 -*NLS-RecA-LicBM3* томата (*Solanum lycopersicum*), экспрессирующие ген *recA* *E. coli* или гибридный ген *NLS-recA-LicBM3*, а также не трансгенные гибриды F_1 , полученные в результате

расщепления, созданы нами ранее [4]. Молекулярно-биологический и биохимический анализ растений F_2 проводили методами ПЦР, с использованием разработанных ранее праймеров, или методом чашечного теста [4]. Статистическая проверка гипотезы по критерию хи-квадрат (χ^2) выполнена согласно методическим рекомендациям [5]. Расчет g_f между маркерными генами проведен методом наибольшего правдоподобия [6].

Результаты и обсуждение

Для того чтобы достоверно оценить мейотическую рекомбинацию между маркерами у трансгенных и не трансгенных гибридов F_1 необходимо было установить характер наследования генов *gcsA* и *NLS-recA-licBM3* по отцовской линии, т.е. через пыльцу. Нельзя было исключить того, что экспрессия целевых генов, находящихся под контролем сильного и конститутивного промотора 35S PHK CaMV, может у растений F_1 -*RecA* и F_1 -*NLS-RecA-LicBM3* оказывать селективное действие на пыльцу и приводить к отклонениям в наследовании как самих трансгенов, так и сцепленных с ними генов. Кроме того с целью минимизации влияния на частоту мейотической рекомбинации Т-ДНК-инсерционного мутагенеза, который имел место при создании трансгенных растений, необходимо было отобрать гибриды F_1 -*RecA* и F_1 -*NLS-RecA-LicBM3* содержащие только одну инсерцию Т-ДНК в геноме. Ранее небольшая выборка растений не позволила достоверно оценить число копий Т-ДНК у всех гибридов F_1 -*RecA* и F_1 -*NLS-RecA-LicBM3* [4]. Поэтому с помощью ПЦР и праймеров к последовательности целевого гена *gcsA* или метода чашечного теста на наличие активности репортерного фермента лихеназы, который является частью гибридного белка *NLS-RecA-LicBM3*, были проанализированы некоторые растения F_2 , полученные в результате самоопыления гибридов F_1 -*RecA* и F_1 -*NLS-RecA-LicBM3* (табл. 1).

Как следует из таблицы 1 гены *gcsA* и *NLS-recA-licBM3* наследуются по отцовской линии. Расщепление по наличию и отсутствию целевых генов среди гибридов F_2 соответствует 3:1, что свидетельствует об одной инсерции Т-ДНК в геноме всех растений F_1 -*RecA* и F_1 -*NLS-RecA-LicBM3* и дает основание исключить селективное влияние экспрессии генов *gcsA* и *NLS-recA-licBM3* на соотношение фенотипических классов в пыльце.

Положение трансгенов в геноме растений томата может приводить к локальному изменению g_f между маркерными генами той хромосомы, в которую произошла инсерция Т-ДНК [8]. Для того, чтобы избежать этого явления, в потомстве трансгенных гибридов F_1 -*RecA* и F_1 -*NLS-RecA-LicBM3* было изучено наследование *gcsA* и *NLS-recA-licBM3* относительно маркерных генов второй хромосомы томата, которые предполагалось использовать для оценки g_f (табл. 1). Данные таблицы 1 свидетельствуют, что во всех расщепляющихся популяциях гибридов F_2 гены *gcsA* и *NLS-recA-licBM3* наследуются независимо от маркерных генов второй хромосомы, поскольку расщепление между ними соответствует 9:3:3:1, что и ожидается при на-

следовании двух генов, локализованных в разных группах сцепления. Таким образом, у всех трансгенных гибридов томата целевые гены были расположены вне второй хромосомы.

Таблица 1.

Наследование в F₂ целевых *recA* и *NLS-recA-licBM3* и маркерных генов второй хромосомы томата.

Гибрид F ₁	Целевой ген	Растений F ₂ , шт.*				Ожидаемое расщепление			
		<i>X-L-</i>	<i>X-ll</i>	<i>xxL-</i>	<i>xxll</i>	по целевым генам	χ^2	между целевыми и маркерными генами	χ^2
1/1	<i>recA</i>	15	3	7	3	3 : 1	0.19	9 : 3 : 3 : 1	2.47
1/8		27	8	8	5		0.11		1.55
3/6		29	3	8	3		1.75		2.69
2/1	<i>NLS-recA-licBM3</i>	37	11	11	5		0		0.43
2/4		29	10	5	4		0.44		2.37
6/3		23	7	8	4		0		0.83
6/4		25	9	9	2		0		0.31

* – здесь X или x маркерный ген второй хромосомы томата (*wv*, *aw* или *d*) в доминантном или рецессивном состоянии; «L» – присутствует активность лихеназы или последовательность гена *recA*, l – активность лихеназы или последовательность гена *recA* отсутствует. Для вероятности ошибки $p \leq 0,05$ и $df = 1$ критическое значение $\chi^2 = 3,84$, а для $df = 3$ $\chi^2 = 7,81$.

Как следует из представленных в таблице 2 результатов, частота мейотической рекомбинации между генами *wv* и *d* у гибридов томата F₁-*RecA* составляла 32.5 %, что в 1.5 раза выше, чем у соответствующих им не трансгенных гибридов (21.8 %), растений F₁-*NLS-RecA-LicBM3* (21.6 %) и их не трансгенных F₁ аналогов (24.9 %).

Частота мейотической рекомбинации в сегменте *aw-d* у F₁-*RecA* и их не трансгенных F₁ аналогов составляла 39-40 %, а у растений F₁-*NLS-RecA-LicBM3* и у соответствующих им не трансгенных гибридов 44-45 % (табл. 2). Отличие *gf* в 5 % между F₁-*RecA* и F₁-*NLS-RecA-LicBM3*, а также их не трансгенными аналогами, не зависит от экспрессии генов *recA* и *NLS-recA-licBM3*, а определяется направлением скрещиваний при создании гибридов. Дело в том, что растения F₁-*RecA* были получены путем опыления трансформантов линии Mo938 пыльцой не трансгенного сорта Марглоб, а F₁-*NLS-RecA-LicBM3* в обратной комбинации скрещиваний, а именно, опылением трансформантов сорта Марглоб пыльцой не трансгенных растений Mo938 [4]. Известно, что реципрокный эффект у томата в сегменте *aw-d* может составлять 4.7 %, [9], что сопоставимо с нашими результатами.

Таблица 2

Частота рекомбинации между маркерными генами второй хромосомы у гибридов F_1 томата, экспрессирующих гены *recA* или *NLS-recA-licBM3*, и не трансгенных гибридов.

Целевой ген	Гибрид F_1	Растений F_2 , шт.	Rf, %		
			wv-d	aw-d	aw-wv
<i>recA</i>	1/1	288	33.2±2.4	40.5±3.9	56.1±7.5
	1/8	375	28.6±1.9	34.5±2.9	44.9±3.3
	3/6	296	36.7±2.5	44.9±3.7	46.2±3.8
	всего	959	32.5±1.3	39.8±1.9	46.7±2.4
-	1/4	331	21.5±1.7	38.4±3.1	38.3±3.1
	3/2	221	23.1±2.2	41.3±3.1	40.9±3.0
	всего	552	21.8±1.4	39.9±2.2	39.6±2.2
<i>NLS-recA-licBM3</i>	2/1	311	23.3±1.9	41.0±2.2	35.8±2.6
	2/4	365	23.6±1.7	48.5±2.3	46.8±2.3
	6/3	315	16.8±1.5	40.1±2.5	40.6±2.5
	6/4	172	22.5±2.5	48.4±2.6	49.2±3.6
	всего	1163	21.6±0.9	44.7±1.2	42.5±1.3
-	2/2	186	21.4±2.3	29.6±2.9	30.8±4.9
	2/3	253	29.0±2.4	48.7±3.3	53.2±3.8
	6/1	295	27.2±2.1	55.1±4.4	48.0±4.1
	6/11	368	21.6±1.7	49.3±3.3	51.6±4.3
	всего	1102	24.9±1.0	44.9±1.7	49.1±2.2

Частота мейотической рекомбинации в сегменте aw-wv у F_1 -RecA составляет 46.7 %, что в 1.2 раза выше, чем у соответствующих не трансгенных гибридов – 39.6 % (табл. 2). Rf у F_1 -NLS-RecA-LicBM3 42.5 % и ниже, чем у их не трансгенных F_1 аналогов – 49.1 %. В целом отличия частоты мейотической рекомбинации на участке aw-wv между группами растений F_1 -RecA и F_1 -NLS-RecA-LicBM3, а также их не трансгенными аналогами, могут быть следствием влияния двух факторов, а именно, экспрессии гена *recA E. coli* и реципрокным эффектом, который имеет место при наследовании гена aw [10].

Выводы

Гены *recA* и *NLS-recA-licBM3* наследуются по отцовской линии. Расщепление по наличию и отсутствию целевых генов свидетельствует об одной инсерции Т-ДНК, локализованной вне второй хромосомы, у всех трансгенных гибридов томата. Сравнительный анализ частоты мейотической рекомбинации выявил, что только у растений F_1 -RecA rf между некоторыми сцепленными маркерными генами второй хромосомы в 1.2-1.5 раза выше, чем у остальных гибридов томата. Трансгенные растения томата, экспрессирующие ген *recA E. coli*, могут быть использованы для индукции мейо-

тической рекомбинации между гомологичными, а также, возможно, между гомеологичными хромосомами растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-244.2011.4 и гранта РФФИ № 11-04-00873-а.

Литература

1. *Reiss B., Klemm M., Kosak H., Schell J.* RecA protein stimulates homologous recombination in plants // Proc. Natl Acad. Sci. USA.- 1996.- V. 93. № 7.- P. 3094-3098.

2. *Reiss B., Schubert I., Kopchen K.* et al. RecA stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by *Agrobacterium* // Proc. Natl Acad. Sci. USA.- 2000.- V. 97. № 7.- P. 3358-3363.

3. *Комахин Р.А., Комахина В.В., Жученко А.А.* Создание генетических конструкций содержащих бактериальный ген *recA E. coli* для индукции рекомбинации в растениях // Сельскохозяйственная биология.- 2007.- № 3.- С. 25-32.

4. *Комахин Р.А., Комахина В.В., Милюкова Н.А., Голденкова-Павлова И.В., Фадина О.А., Жученко А.А.* Трансгенные растения томата, экспрессирующие гены *recA* и *NLS-recA-licVM3*, как модель для изучения мейотической рекомбинации // Генетика.- 2010.- Т. 46. №12.- С. 1635-1644.

5. *Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта. М.: Колос,- 1973.- 351 с.

6. *Орлова Н.Н.* Генетический анализ. М.: Изд-во МГУ,- 1991.- 316 с.

7. *Юнусов З.Р., Соловьев А.А., Михайленко С.Н., Комахин Р.А., Жученко А.А.* Влияние трансгенов на мейотическую рекомбинацию у высших эукариот, на примере растений томата // Сельскохозяйственная биология.- 2009. № 3.- С. 52-59.

8. *Бочарникова Н.И., Уцаповский И.В., Казанцев Э.Ф.* Влияние генотипической среды на частоту кроссинговера у растений томата // Генетика.- 1991.- Т. 27. № 2.- С. 361-363.

9. *Жученко А.А., Король А.Б., Визир И.Ю., Бочарникова Н.И., Заморзаева И.А.* Половые различия по частоте кроссинговера у томата и арабидопсиса // Генетика.- 1988.- Т. 24. № 9.- С. 1593-1601.

10. *Бочарникова Н.И.* Особенности формирования генетической изменчивости в роде *Lycopersicon* Tourm. и её значение для селекции. Диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук: Москва,- 2007.- 294 с.

Резюме

Сравнительный анализ частоты мейотической рекомбинации (rf) свидетельствует, что экспрессия гена *recA E. coli* в клетках трансгенных гибридов томата F₁-RecA приводит к повышению rf между сцепленными маркерными генами второй хромосомы и к увеличению в потомстве гибридов доли рекомбинантных генотипов.

The expression of gene *recA E. coli* in transgenic tomato hybrids F₁-RecA results in increase of meiotic recombination frequency (rf) between linked marker genes of the second chromosome and in increase of percentage of recombinant genotypes in progeny of hybrids.

КОМІСАРЕНКО А.Г.,¹ МИХАЛЬСЬКА С.І.,¹ МУЖАНОВСЬКА О.К.,²
МОРГУН Б.В.,² АДАМЕНКО Н.І.,¹ ТИЩЕНКО О.М.¹

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

ПІДВИЩЕННЯ ЧАСТОТИ РЕГЕНЕРАЦІЇ СОНЯШНИКА СОРТУ ПРОМЕТЕЙ ЗА АГРОБАКТЕРІУМ-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ

Серед олійних культур, які вирощуються в Україні та світі, соняшник посідає одне із перших місць. Соняшникова олія є незамінною сировиною для харчової, кондитерської та хімічної промисловості. На розвиток та продуктивність соняшника, як і будь-якої іншої культури, значною мірою впливають абіотичні стреси. Тому створення сортів соняшника, які характеризуються стійкістю до несприятливих факторів довкілля, є одним із важливих завдань селекційно-генетичних програм. З метою отримання стійких до стресів рослинних форм широкого розвитку набуває розробка молекулярних і клітинних біотехнологій. У той же час соняшник одна із сільсько-господарських культур, яка на сьогодні немає біотехнологічних форм рослин, дозволених для комерційного використання [1].

Під дією абіотичного стресу в клітинах рослини підвищується вміст проліну, що може відбуватися за рахунок змін балансу його синтезу/деградації, яка визначається активністю проліндегідрогенази (ПДГ) [2, 3]. Створення трансгенних ліній соняшника із антисмисловим супресором гена проліндегідрогенази може призводити до підвищення вмісту цієї амінокислоти та рівня толерантності рослин до абіотичних стресів. Найбільш ефективним та широко використовуваним способом перенесення в геном рослин чужорідних генів, які відповідають за бажану ознаку, є *Agrobacterium*-опосередкована трансформація. Запорукою успіху даного процесу являється здатність до агробактеріальної інфекції тотипотентних клітин та отримання фертильних рослин із стабільною експресією трансгенів. Крім типу експлантата на процес агробактеріальної трансформації можуть впливати умови інокуляції та культивування [4]. Тому метою дослідження було встановлення залежності трансформації експлантатів соняшника від складу середовища інокуляції та терміну селекції.

Матеріали і методи

В якості вихідного матеріалу для генетичної трансформації використовували сегмент сім'ядолі насінини [4] сорту Прометей. Інокуляцію експлантатів проводили агробактеріальним штамом LBA4404, який містить векторну конструкцію рBi2E з антисмисловим супресором гену проліндегідрогенази ERD5 арабідопсіса та селективним геном *nptII* *E. coli*, який визначає стійкість до канаміцину (Km), люб'язно надану Кочетовим О.В. (Інс-

титут цитології і генетики Сибірського відділення Російської академії наук, Новосибірськ). Бактеріальну суспензію готували у рідкому середовищі для регенерації (МСМТ): середовище MS з додаванням тіолового компоненту або у буфері (БФ), до складу якого входили MES, NH₄Cl, MgSO₄. Оптична щільність суспензії при довжині хвилі 600 нм була близько 0,4 О.О.

Індукцію регенерації та селекцію трансформантів здійснювали двома способами: у першому селективний агент – канаміцин концентрацією 100 мг/л та бактерицидний – цефотаксим (Cf) 500 мг/л додавали до регенераційного середовища одночасно. В іншому випадку Km додавали після 10 днів культивування експлантатів на середовищі з цефотаксимом, оскільки Km негативно впливає на регенераційну здатність та укорінення регенерантів. Селекцію отриманих регенерантів проводили протягом двох пасажів тривалістю 12-14 днів кожний.

Для аналізу регенерантів методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували загальну ДНК, виділену із листових пластинок застосовуючи модифікований метод Делапорта. Інтеграцію Т-ДНК у геном визначали за допомогою праймерів до екзону 1 (AACAA-ACTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC та GAGAT-GTTGG-TCTAG-ATTTG-GCAGC) та інтрону (AACAA-ACTGG-ATCCG-GCGAT-CTTAC та ATTAA-GCTTT-CGAAC-CAAAC-AAGT) гену ПДГ *Arabidopsis thaliana*. Спостерігали також за перенесенням гену nptII (CCTGA-ATGAA-CTCCA-GGACG-AGGCA та GCTCT-AGATC-CAGAG-TCCCG-CTCAG-AAG). Наявність домішок агробактерії контролювали по гену virC (ATCAT-TTGTA-GCGAC-T та AGCTC-AAACC-TGCTT-C).

Результати та обговорення

Для соняшника найбільш перспективним методом генетичної трансформації вважається трансгенез за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Незважаючи на природну компетентність *Helianthus annuus* L. до агробактеріальної інфекції, ця культура важко піддається трансформації внаслідок низької ефективності інтеграції рекомбінантних молекул ДНК в геном клітин, здатних до реалізації морфогенетичного потенціалу [5, 6, 7]. Тому для конкретних генотипів актуальними залишаються питання, пов'язані з пошуком чинників, які позитивно впливають на частоту регенерації та стабільної трансформації. У зв'язку з цим в роботі аналізували відповідну реакцію рослин соняшника сорту Прометей на агробактеріальну інфекцію за різних умов інокуляції та культивування.

Встановлено, що для сорту Прометей частота регенерації пагонів на середовищі МСМТ становила близько 50 %. При *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації з використанням штаму LBA4404, векторна конструкція якого містила ген nptII, відбувалось значне зниження (майже у 5 разів) морфогенетичного потенціалу, що становило 10,7±2,6 % (табл.)

Частота регенерації пагонів за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації соняшника сорту Прометей при різних умовах культивування та селекції

Показники регенерації	МСМТ, 500 мг/л Cf, 100 мг/л Km	МСМТ, 500 мг/л Cf	БФ 500 мг/л Cf, 100 мг/л Km	БФ 500 мг/л Cf
Загальна кількість регенерантів, %	10,7±2,6	25,5±2,3	22,5±2,5	29,7±2,1
Р/Е, %	1,3±0,7	7,5±1,2	5,6±0,2	8,1±1,8
Р/Р, %	11,1±6,4	28,9±2,4	26,1±3,9	28,1±7,7

Примітка: МСМТ – середовище для індукції регенерації; БФ – буфер, який містить MES, NH₄Cl, MgSO₄; Р/Е – частка Km-стійких регенерантів серед загальної кількості експлантатів; Р/Р – частка Km-стійких регенерантів серед загальної кількості отриманих регенерантів.

Оскільки відомо, що канаміцин пригнічує регенерацію пагонів, аналізували вплив терміну селекції на тотипотентність клітин. У зв'язку з чим було запропоновано селекцію на стійкість до канаміцину проводити після певного періоду культивування без селективного агента. Доцільність збільшення терміну культивування з бактерицидним агентом за відсутності селективного до 10 днів була обумовлена виключенням негативного впливу канаміцину на реалізацію морфогенетичного потенціалу, оскільки індукція пагоноутворення розробленим нами методом регенерації починалася на 5-9 день культивування. Слід також відзначити, що цефотаксим в певних концентраціях може позитивно впливати на частоту регенерації пагонів [8]. Використана нами концентрація цефотаксима (500 мг/л) була оптимальною для елімінації агробактерії та реалізації морфогенетичного потенціалу соняшника [4].

Змінюючи термін початку селекції, збільшувався не тільки вихід регенерантів майже в 2-3 рази, але й компетентність до агробактеріальної інфекції, яка проявлялася в отриманні більшої кількості Km-стійких регенерантів приблизно у 6 разів.

Аналогічний ефект спостерігався і при зміні середовища інокуляції. Так, замінюючи середовище МСМТ БФ-буфером, нам вдалось досягти збільшення виходу регенерантів майже у 3 рази. Процент стійких до селективного агента регенерантів, відносно загальної кількості регенерантів, за вказаних умов також був суттєво вищим і становив близько 30 %. Таким чином, показано, що регенераційна здатність та компетентність до агробактеріальної трансформації у проаналізованого сорту залежала від умов культивування і періоду початку селекції.

Інтеграцію Т-ДНК у геном соняшника досліджували методом ПЛР. На рисунку представлені результати молекулярно-генетичного аналізу одного з чотирьох відібраних позитивних рослин-регенерантів, стійких до се-

лективного агенту. Використовуючи праймери до екзону 1 антисмислового супресора гену проліндегідрогенази був отриманий амплікон очікуваного розміру 545 п.н. Це свідчить на користь того, що цільовий ген був вбудований у геном соняшника. Результати підтвердилися при ампліфікації послідовності інтрону та гену *prtII*.

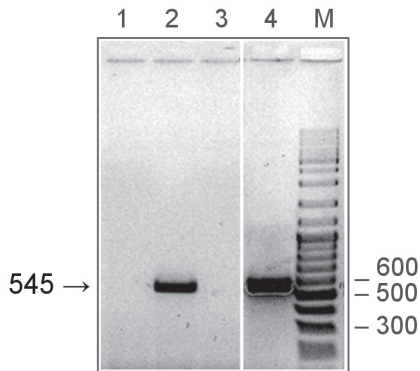


Рис. Электрофореграма продуктів ампліфікації ДНК регенерантів соняшника з використанням праймерів до антисмислової послідовності екзону 1 гену ПДГ у 1,2 %-вому агарозному гелі. 1 – нестійкий до канаміцину регенерант № 57; 2 – стійкий до канаміцину регенерант № 58; 3 – негативний контроль (загальна ДНК нетрансформованої рослини); 4 – позитивний контроль (загальна ДНК *Arabidopsis thaliana*); М – маркер молекулярної ваги (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas)

Таким чином, було оптимізовано умови регенерації пагонів за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації та чітко підтверджена інтеграція антисмислового супресора гену проліндегідрогенази в геном соняшника сорту Прометей.

Література

1. Кантамутто М., Поверен М. ГМ – подсолнечник. Перевод с англ. – Уляницкая Н. // Зерно. – 2010. - №10 (54). – С.34-44.
2. Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // Генетика. – 2004. – Т. 40, № 2. – С. 282-285.
3. Кузнецов В.В., Шевякова Н.И. Пролин при стрессе: биологическая роль, метаболизм, регуляция // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 2. – С. 321-336.
4. Комисаренко А.Г., Михальская С.И., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Индукция регенерации *in vitro* при опосредованной *Agrobacterium*-трансформации инбредных линий подсолнечника // Биотехнология. – 2010. – Т. 3, № 4. – С.67-74.
5. Тищенко Е.Н., Михальская С.И. Агробактериальная трансформация подсолнечника // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 3. С.187-196.

6. Lappara H., Burrus M., Hunold R., Damm B., Bravoangel A.M., Bronner R., Hahn G. Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus*) – evaluation of 3 gene-transfer methods // *Euphytica*. – 1995. – 85, N 1-3. – P.63-74.

7. 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 // *Trangenic Research*. – 2001. – 10. – 435-444.

8. Данилова С.А., Долгих Ю.И. Стимуляція регенерації рослин у культурі тканин кукурузи под дією антибіотика цефотаксима // *Физиол. раст.* – 2004. – Т. 51, № 4. – С.621-625.

Резюме

Встановлено залежність частоти регенерації при *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації соняшника від умов культивування та селекції. Використання БФ-буфера при інокуляції агробактерією та продовження періоду культивування з бактерицидним агентом за відсутності селективного підвищували частоту регенерації та інтродукції рекомбінантних ДНК в геном соняшника.

Показано залежність частоти регенерації при *Agrobacterium*-опосередкованій трансформації підсолнечника від умов культивування та селекції. Використання БФ-буфера в період інокуляції агробактерією та продовження періоду культивування з бактерицидним агентом, при відсутності селективного, підвищує частоту регенерації та інтродукції рекомбінантних ДНК в геном підсолнечника.

The cultural and selection dependence of the regeneration frequency of sunflower during *Agrobacterium*-mediated transformation were established. Using of BF-buffer for bacterium inoculation and prolongation of the period of regeneration induction on the medium with the addition of bactericidal agent away from selective one raised the frequency of regeneration and introduction of recombinant DNA into sunflower genome.

КОРНЯ Т.М.¹, АКСЕЛЬРУД Д.В.², МОЛОДЧЕНКОВА О.О.²

¹ Південний біотехнологічний центр в рослинництві НААН України,

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

² Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення, Україна, 65036, Одеса, вул. Овідіопольська дорога 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ГЕНОТИПУ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ СТВОРЕННЯ ШЛЯХОМ АНДРОГЕНЕЗУ IN VITRO ГОМОЗИГОТНИХ ФОРМ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ІЗ СТІЙКІСТЮ ДО FUSARIUM GRAMINEARUM

В боротьбі із захворюванням фузаріозом колосу (ФК) озимої м'якої пшениці створення методами селекції стійких сортів є найефективнішою, екологічно безпечною та економічно вигідною стратегією [1]. У озимих форм пшениці селекція залишається довготривалою і весь процес доборів до отримання гомозиготної лінії, як правило, триває більше 10-ти років [2]. Біотехнологічними методами гаплоїдії в поєднанні із селекцією in vitro теоретично можливо на рівні популяції гаплоїдних мікроспор (сформованих

гамет) гібридів добирати генотипи з необхідними якостями та лише за один рік шляхом андрогенезу *in vitro* отримувати стійкі до патогенів гомозиготні лінії подвоєних гаплоїдів [3, 4]. Тому, актуальним залишається дослідження морфогенезу мікроспор *in vitro* за впливу селективного фактору у різних за стійкістю до ФК та здатністю до андрогенезу *in vitro* генотипів пшениці.

Матеріали та методи

За матеріал використовували пиляки у стадії сильновакулізованої мікроспори сортів та гібридів озимої м'якої пшениці. Застосовували сорти Обрій, Фантазія одеська та Селянка із середньою стійкістю до ФК та з різною здатністю до андрогенезу *in vitro*. В досліджах використовували міжсортові гібриди F₁ ♀ Обрій × ♂ Фантазія одеська та ♀ Фантазія одеська × ♂ Обрій та гібриди пшениці з лініями СУМІТ з високою стійкістю до ФК: ♀ Селянка × ♂ (Куяльник × Ф10) та ♀ Куяльник × ♂ Ф6, де Ф10 та Ф6 – лінії СУМІТ, стійкі до фузаріозу, Селянка – сорт пшениці з відносно високою здатністю до андрогенезу *in vitro* та середньою стійкістю до фузаріозу. Пиляки вищевказаних генотипів висаджували на контрольне та дослідні поживні середовища з токсинами дезоксиніваленолом (ДОН) та зеараленоном (ЗН) у концентрації 250 та 750 мкг/л [4].

Математичні розрахунки проводили за допомогою методу довірчих інтервалів Уілсона для вибірок великого об'єму та з рідкими подіями [5].

Результати та обговорення

За отриманими даними як сорти так і їх міжсортові гібридні форми виявилися нестійкими до дії мікотоксинів. Це може пояснюватись невисокою стійкістю вихідних батьківських форм гібридів та самих сортів. На всіх варіантах селективних середовищ мікотоксини пригнічували формування новоутворень, що спричинювало зниження регенерації.

Порівнюючи між собою дані щодо морфогенезу мікроспор сортів та реципрокних гібридів на варіанті середовища без токсинів, було показано, що за комбінації схрещування ♀ Фантазія одеська × ♂ Обрій кількість морфогенного калуса перевищувало такий же показник у вихідного сорту Обрій ($p < 0,05$). Підвищення морфогенного калусу у даної гібридної комбінації позитивно впливало на регенерацію зелених рослин подвоєних гаплоїдів (табл. 1).

За зворотної комбінації схрещувань ♀ Обрій × ♂ Фантазія одеська навпаки збільшився показник неморфогенного калусу в порівнянні з таким же показником у вихідного сорту Фантазія одеська та залишався на рівні з показником сорту Обрій. Кількість морфогенного калусу та регенерації відповідала вихідному сорту Обрій. Таким чином, отримані дані показують, що морфогенез мікроспор в культурі пиляків гібридної комбінації за селекції *in vitro* може залежати від напрямку схрещувань вихідних батьківських форм. В наших досліджах оптимальним варіантом виявилось схрещування ♀ Фантазія одеська × ♂ Обрій, у якого відносно висока кількість морфогенних новоутворень та їх регенерація відповідала материнській формі, сорту

♀ Фантазія одеська, що сприяло підвищенню регенерації подвоєних гаплоїдів в культурі пиляків.

За літературними даними у пшениці відомі випадки материнського ефекту та комплементарний характер успадкування здатності мікроспор до андрогенезу [6]. W. P. Bullock вказує на відсутність впливу материнської цитоплазми [7]. Інші автори, так званий реципрокний ефект, відносять до генетичної адитивно-домінантної моделі взаємодії ядерних генів, та зазначають, що материнський ефект визначає індукцію ембріоїдів в культурі пиляків [8]. Дане питання щодо реципрокних ефектів та ролі цитоплазматичних і ядерних генів в наслідуванні ознаки чутливості до андрогенезу *in vitro* пшениці потребує додаткових досліджень.

Таблиця 1

Морфогенез в культурі пиляків сортів та їх міжсорткових гібридів пшениці

Назва генотипу, бал стійкості	Кількість висаджених пиляків, шт.	Кількість новоутворень, %		Регенерація зелених рослин	
		М	НМ	шт.	%
Обрій, 6	970	2,89	2,27	4	0,41
Фантазія одеська, 5	540	4,44	0,74	1	1,30
♀Обрій×♂Фантазія одеська	397	1,51	3,53*	2	0,50
♀Фантазія одеська×♂Обрій	458	6,33*	0,87	8	1,75*

Примітка: М та НМ – морфогенні та неморфогенні новоутворення; * – статистично значуща різниця за методом довірчих інтервалів Уїлсона.

На наступному етапі досліджень впливу генотипів донорів пиляків на морфогенез мікроспор в культурі пиляків з метою пошуку оптимальних умов для здійснення добору кращих за стійкістю до ФК форм нами були використані три генотипи пшениці: чутливий до андрогенезу *in vitro* сорт пшениці Селянка, стійку форму пшениці Куяльник×Ф6 та гібрид між генотипом, чутливим до андрогенезу *in vitro*, та генотипом, стійким до фузаріозу колосу, – ♀ Селянка × ♂ (Куяльник×Ф10) (табл. 2).

Показано, що стійкість до ФК батьківської форми визначає толерантність до фузарієвих мікотоксинів в культурі *in vitro* на рівні регенерації зелених рослин. Так у гібриду ♀ Селянка × ♂ (Куяльник×Ф10) кількість морфогенних новоутворень залишалась на рівні з контролем на варіантах поживних середовищ з токсинами ДОН та ЗН. В культурі пиляків дана гібридна форма ♀ Селянка×♂ (Куяльник×Ф10) особливо вирізнялась толерантністю до токсину зеараленону, присутність якого в середовищі не завадила формуванню морфогенних новоутворень та послідуєчої регенерації з них зелених рослин. У даного гібриду спостерігали підвищення кількості сформованих морфогенних новоутворень під впливом токсину зеараленону (250 мкг/л).

У контрольній материнській формі сорту Селянка, на основі якого був створений гібрид ♀ Селянка×♂ (Куяльник×Ф10), за дії зеараленону спостерігали також збільшення морфогенних новоутворень в порівнянні з контрольним поживним середовищем без токсинів ($p < 0,05$). Однак не було отримано жодної зеленої рослини-регенеранту за дії токсинів ДОН та ЗН. Таким чином, показано, що толерантність до токсинів в культурі пиляків *in vitro* дослідженого гібриду ♀ Селянка×♂ (Куяльник×Ф10) визначається стійкістю батьківської (♂) форми: Куяльник×Ф10. Через низьку морфогенну здатність мікроспор в пиляках гібриду Куяльник×Ф6 майже не було отримано рослин-регенерантів, тому складно було визначити роль стійкості батьківських форм у доборі *in vitro* на фоні фузарієвих токсинів.

Таблиця 2

Вплив генотипу донорів експлантів на морфогенез в культурі пиляків пшениці в умовах добору *in vitro*

Назва генотипу	Концентрація токсину, мкг/л		Кількість пиляків, шт.	Кількість морфогенних новоутворень			Регенерація зелених рослин			
				%	ДІ		шт	%	ДІ	
					НМ	ВМ			НМ	ВМ
Селянка (6 балів стійкості до ФК)	Контроль		381	2,10	1,07	4,09	8	1,05	0,41	2,67
	ДОН	250	168	0,00	0,00	2,24	0	0,00	0,00	2,24
		750	211	1,42	0,48	4,10	0	0,00	0,00	1,79
	Зеараленон	250	102	8,82*	4,71	15,92	0	0,00	0,00	3,63
		750	211	1,42	0,48	4,10	0	0,00	0,00	1,79
Селянка× (Куяльник×Ф10)	Контроль		1550	0,90	0,54	1,51	6	0,39	0,18	0,84
	ДОН	250	494	0,20	0,04	1,14	0	0,00	0,00	0,77
		750	543	0,74	0,29	1,88	2	0,37	0,10	1,33
	Зеараленон	250	588	2,04	1,17	3,53	8	1,36	0,69	2,66
		750	341	2,35	1,19	4,56	4	1,17	0,46	2,98
Куяльник×Ф6	Контроль		521	0,00	0,00	0,73	0	0,00	0,00	0,73
	ДОН	250	91	0,00	0,00	4,05	0	0,00	0,00	4,05
		750	72	0,00	0,00	5,07	0	0,00	0,00	5,07
	Зеараленон	250	62	0,00	0,00	5,83	0	0,00	0,00	5,83

Примітка: Ф6, Ф10 – лінії пшениці СУМІТ, високостійкі до ФК; ДІ – довірчий інтервал Уілсона; НМ та ВМ – нижня та верхня межі ДІ Уілсона.

Для визначення стійкості отриманих рослин-регенерантів в лабораторії біохімії та фізіології рослин СГП-НЦНС було проведено біохімічний аналіз активності інгібіторів трипсину у лінії подвоєних гаплоїдів (ЛПГ) за інфікування збудником *F. graminearum* за методом В. Г. Адамовської із співавторами [9] (рис. 1).

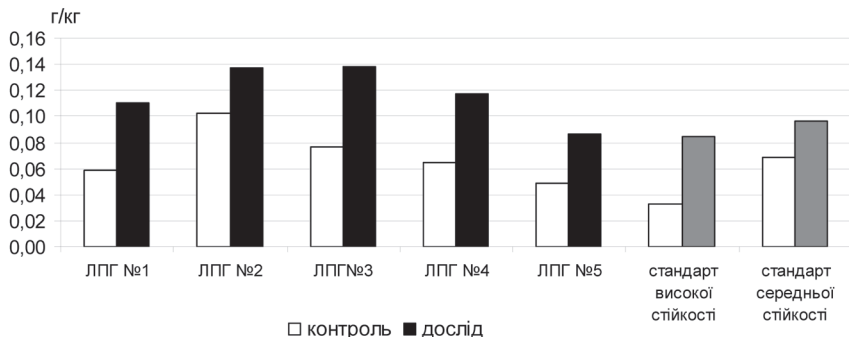


Рис. 1. Активність інгібіторів трипсину у пшениці ліній подвоєних гаплоїдів за інфікування їх збудником *F. graminearum*: ЛПГ №1 – отримані на контрольному середовищі (без токсинів), ЛПГ №2 та №3 – відібрані на середовищі з зеараленоном 250 мкг/л, ЛПГ №4 та №5 – на середовищі з зеараленоном 750 мкг/л

Результати аналізу ЛПГ пшениці показали, що у створених в процесі селекції *in vitro* гомозиготних ліній пшениці активність інгібіторів трипсину за індукції патогеном була на рівні із стандартом високої стійкості.

Таким чином, для забезпечення отримання гомозиготних форм подвоєних гаплоїдів в селекції *in vitro* на стійкість до ФК в культурі пиляків доцільно застосовувати гібриди за схрещування: ♀ (чутлива до андрогенезу форма) × ♂ (стійка до ФК форма пшениці). Оптимальним селективним фактором для добору стійких до ФК генотипів пшениці в культурі пиляків є мікотоксин зеараленон у концентрації 250 мкг/л, що сприяє посиленню морфогенетичного потенціалу мікроспор та може бути використано для збільшення ефективності технології культури пиляків пшениці на стійкість до ФК.

Література

1. *Kawanishi Y.* Development of highly resistant wheat lines to Fusarium head blight derived from Chinese source 'Fujian5114' / Yuki Kawanishi, Ichiro Tsutsui, Atsushi Torada, Haruka Ohta, Minako Ogasawara, Masaya Hayashi, Eriko Nishii // 8th International wheat conference, 1–4 June 2010 : abstracts. - St. Petersburg, Russia, 2010. – P. 271.
2. *Бабаянц Л. Т.* Исходный материал для селекции озимой мягкой пшеницы на групповую устойчивость к фитопатогенам / Л. Т. Бабаянц, О. В. Бабаянц, А. А. Васильев, В. А. Палясный // 36. наукових праць СГІ-НЦНС. – Одеса, 2007. – вип. 9(49). – с. 224-237.
3. *Bruins M.B.M.* Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to *in vitro* selection for fusarium head blight resistance / M.B.M. Bruins, I. Karsai, J. Schepers and C.H.A. Snijders // Plant Science. – 1993. – V. 94, I. 1-2. – P. 195-206.
4. *Eudes F.* Trichothecene-mediated *in vitro* selection in wheat for reduced mycotoxin accumulation caused by *Fusarium graminearum* / Eudes F., Comeau A., Rioux S., Collin J. // Canadian Journal of Plant Science. – 2008. – V. 88, I. 6. – P. 1115-1125.

5. Гржибовский А. М. Доверительные интервалы для частот и долей / А. М. Гржибовский // Экология человека: практикум. – 2008. – № 5. – С. 57-60.

6. Волощук С. І. Вплив обробки зеараленоном та КФ на ефективність отримання гаплоїдів в культурі пиляків м'якої пшениці та тритикале / С. І. Волощук, Г. Д. Волощук // Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека (Геном рослин VI) : VI Міжнародна конференція, 7-10 вересня 2010 р.: тези. – Оdesa, 2010. – С. 80.

7. Bullock W. P. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) F₂'s and Their reciprocal crosses / W. P. Bullock P. S. Baenziger, G. W. Shaeffer, P. J. Bottino // Theor. Appl. Genet. – 1982. – № 62. – P. 155-159.

8. Tabatabaei B. E. S. Genetic analysis of androgenetic traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) / Badraldin Ebrahim Sayed Tabatabaei, Ghodrattollah Saeidi, Mohammad Reza Sabzalian // IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY. – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 34-41.

9. Пат. 12639 А Україна, МПК (2006) А 01 Н 1/04. Спосіб оцінки генотипів пшениці на стійкість до фузаріозу / В. Г. Адамовська, С. В. Вовчук, О. О. Молодченкова, А. П. Левицький, Л. Т. Бабаянц, О. В. Гонтаренко ; власник Селекційно-генетичний інститут УААН. – № 96020534; заявл. 14.02.96 ; опубл. 28.02.97, Бюл. № 1/1997.

Резюме

Визначено умови для створення гомозиготних ліній подвоєних гаплоїдів пшениці із стійкістю до *Fusarium graminearum*. Для забезпечення ефективної селекції *in vitro* в культурі пиляків пшениці необхідним є використання за матеріал пиляків гібридів за схемою схрещування: ♀ (чутлива до андрогенезу форма) × ♂ (стійка до ФК форма пшениці), в якості селективного фактору – мікотоксину зеараленону у концентрації 250 мкг/л.

It was established that to create in the anther culture *in vitro* by androgenesis homozygous forms of wheat with resistance to *Fusarium head blight* is effective to use as donor material for hybrid wheat crosses: ♀ (sensitive form to the androgenesis) × ♂ (resistant form of wheat to *F. graminearum*) and as well as a selective factor – zearalenone (250 mkg/l).

КРУГЛОВА А.Е., КРУГЛОВА Н.Н.

Учреждение Российской академии наук Институт биологии Уфимского НЦ РАН, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru

ПЕРИОДИЗАЦИЯ РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК

Культивируемые *in vitro* клетки, ткани и органы растений представляют собой пластичные системы, способные реализовывать различные онтогенетические программы под воздействием внешних факторов, контролируемых исследователем. Актуальным направлением в этой области является биотехнологический прием эмбриокультуры *in vitro* – культивирования изолированных разновозрастных зародышей. Именно культура *in vitro* позволяет создать условия для наиболее полной реализации всех онто-

генетических подпрограмм зародыша, а значит, и особи в целом, поскольку зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма.

Эмбриокультура *in vitro* привлекает внимание исследователей главным образом начиная с 80-х г.г. прошлого века. К настоящему времени накоплен достаточно большой объем экспериментальных данных по различным аспектам культивирования *in vitro* зародышей, в том числе пшеницы. В то же время привлечение эмбриологических данных к анализу получения растений-регенерантов путем эмбриокультуры *in vitro* достаточно ограничено. Так, абсолютное большинство исследователей не сообщают, на какой именно стадии развития находится незрелый зародыш злаков, инокулируемый *in vitro* для получения растений-регенерантов путем прямого эмбриогенеза (так называемая стадия автономности зародыша). Более того, в проанализированных работах не указывается использованная периодизация эмбриогенеза злаков.

Хорошо известно, что развитие зародыша (эмбриогенез) покрытосеменных растений представляет собой единый процесс, в результате которого из одной исходной клетки – зиготы – формируется зрелый зародыш. Вместе с тем уже на самых ранних этапах исследований эмбриогенеза стало ясно, что в своем развитии зародыш проходит через ряд дискретных фаз, различающихся по морфофизиологическим процессам, функциональной нагрузке, продолжительности, значению для дальнейшего развития растения [1].

У двудольных, зародыш которых приобретает по мере развития морфологически специфические формы, общепринято подразделять эмбриогенез на фазы глобулярного, сердцевидного, торпедовидного, изогнутого и зрелого зародыша [13, 15]. Для однодольных подобной единой классификации не существует, что обусловлено главным образом сложной организацией зародыша представителей этого класса покрытосеменных. Особенно это касается зародыша злаков, характеризующегося как наличием специфических органов (щиток, колеоптиль, эпибласт, мезокотиль, колеориза, эпикотиль с почечкой, лигула), так и дорзовентральностью строения [6]. Более того, особенности процесса развития зародыша злаков позволили выделить отдельный Graminad-тип эмбриогенеза [3].

В литературе предложены различные периодизации эмбриогенеза хлебных злаков. На наш взгляд, наибольшей обоснованностью отличается периодизация, разработанная Т.Б. Батыгиной [4-6]. В развитии зародыша злаков автор выделяет две фазы – бластомеризация (первичная дифференциация), которая состоит в образовании критической массы клеток зародыша и заканчивается дифференциацией эмбриодермы, и органогенез, включая гистогенез (дифференциация гистогенов), которая состоит в обособлении зачатков органов и последующей их тканевой дифференциацией.

Заслуживает внимания периодизация эмбриогенеза хлебных злаков, разработанная В.П. Банниковой с соавт. [1]. Согласно данной периодизации, в развитии зародыша злаков следует выделить пять фаз: зигота, двуклеточный зародыш, глобулярный зародыш, видимая морфологическая дифференциация и инициальный органогенез, созревающий зародыш. Авторы подчеркивают, что процесс эмбриогенеза универсален, и у однодольных и двудольных растений развитие зародыша проходит согласно общим закономерностям. Нельзя не согласиться с мнением авторов о том, что для будущей судьбы зародыша, а впоследствии и взрослого организма, выделенные фазы эмбриогенеза имеют неодинаковое значение. Некоторые из этих фаз являются критическими, т.е. такими, на которых, с одной стороны, закрепляется жесткая детерминация пути развития зародыша, а с другой стороны, при воздействии совокупности неблагоприятных условий именно на этих фазах происходит блокирование развития.

Таким образом, в литературе к настоящему времени предложено несколько периодизаций эмбриогенеза хлебных злаков, каждая из которых имеет свои достоинства. В то же время использование рассмотренных периодизаций в практике биотехнологических исследований хлебных злаков, на наш взгляд, представляет определенные сложности, связанные, например, с отсутствием морфологического критерия выделяемых фаз эмбриогенеза.

Материал и методы

Объектом исследования послужила гибридная линия яровой мягкой пшеницы Фотос, полученная в лаборатории селекции яровой пшеницы Селекционного центра по растениеводству Башкирского НИИ СХ РАСХН (г. Уфа).

В данной статье приводится периодизация эмбриогенеза яровой мягкой пшеницы, основанная на результатах детальных гистологических исследований методами световой микроскопии [2]. Особенностью разработки явилось одновременное использование морфологического критерия – длины зародыша (в мм) и временного критерия – времени (в сут) от искусственного опыления, через каждые 0,5 сут.

Результаты и обсуждение

Обобщив результаты гистологических исследований зародыша пшеницы в динамике развития от зиготы до зрелой структуры, мы предлагаем выделить следующие этапы и стадии эмбриогенеза этого растения.

1. Этап недифференцированного зародыша

Включает стадии: зигота; двуклеточный зародыш; четырехклеточный зародыш, многоклеточный зародыш.

Зигота (длина зародыша 0,001 мм, время после опыления 0,5 сут) – первая инициальная клетка нового дочернего организма, формирующаяся после осуществления процесса оплодотворения. Значение этой стадии в эмбриогенезе: становление полярности зародыша.

Двуклеточный зародыш (длина зародыша 0,05-0,1 мм, время после опыления 1,5-2,0 сут) состоит из апикальной и базальной клеток как результата асимметричного деления зиготы. Значение этой стадии в эмбриогенезе: становление клеточной специализации зародыша.

Четырехклеточный зародыш (длина зародыша 0,12-0,14 мм, время после опыления 2,5 сут) состоит из двух клеток апикального полюса и двух клеток базального полюса как результата асимметричных делений соответствующих клеток двуклеточного зародыша. Значение этой стадии в эмбриогенезе: становление дорсовентральности зародыша.

Многоклеточный зародыш (длина зародыша 0,15-0,2 мм, время после опыления 3,0-4,0 сут) – результат интенсивных клеточных делений апикальной и базальной клеток двуклеточного зародыша. Значение этой стадии в эмбриогенезе: накопление массы клеток (возможно, критической), необходимой для дифференциации зародыша.

II. Этап дифференциации зародыша

Включает стадию органогенеза, которую можно подразделить на три подстадии.

В течение подстадии 1 (длина зародыша 0,4-0,6 мм, время после опыления 4,5-8,0 сут) происходят интенсивные клеточные деления в зародыше, главным образом в апикальной его части. Зародыш быстро растет. В нем постепенно формируется первый орган – щиток (единственная семядоля), закладывается точка роста – область меристематических клеток.

Во время подстадии 2 (длина зародыша 0,8-1,3 мм, время после опыления 8,5-12,0 сут) клеточные деления замедляются, что ведет к приостановке роста зародыша. Формируется еще один орган – колеоптиль.

В течение подстадии 3 (длина зародыша 1,5-2,0 мм, время после опыления 12,5-17,0 сут) клеточные деления также замедлены, рост зародыша происходит за счет растяжения клеток. Постепенно формируются апекс побега, зародышевый корень, колеориза, эпибласт, лигула. К концу этой подстадии рост зародыша постепенно снижается, а затем стабилизируется, и заметных изменений в размерах зародыша не происходит.

Значение этой стадии в эмбриогенезе: происходят важнейшие морфогенетические процессы – морфологическая дифференциация зародыша, формирование всех присущих зародышу злаков органов.

III. Этап дифференцированного зародыша

Включает стадии: сформированный зародыш, зрелый зародыш.

В сформированном зародыше (длина зародыша 2,1-2,2 мм, время после опыления 17,5-20,0 сут) наличествуют все органы, характерные для зародыша злаков. Происходит незначительный рост органов зародыша (за счет растяжения клеток), хотя размеры зародыша существенно не изменяются. Формируется первый лист. Начинается интенсивное накопление запасных питательных веществ (главным образом, крахмала), ко-

торые будут использованы в ходе прорастания. Значение этой стадии в эмбриогенезе: подготовка зародыша к вступлению в период покоя.

В стадии зрелого зародыша (длина зародыша 2,3-2,6 мм, время после опыления 21,0-25,0 сут) формируются второй и третий листья и корневой чехлик. Значение этой стадии в эмбриогенезе: вступление зародыша в период покоя.

В целом, каждый из этапов и каждая из стадий эмбриогенеза, несмотря на все разнообразие происходящих в это время процессов, направлены на реализацию как морфогенетических потенциалов зародыша, так и онтогенетической программы особи в целом.

Выводы

Разработанные в настоящее время экспериментальные методы культивирования *in vitro* незрелых и зрелых зародышей хлебных злаков [7-12, 14] дают возможность использовать культивируемые зародыши как адекватные модельные системы для дальнейшего изучения эмбриогенеза в строго контролируемых условиях. Такой подход позволит получить более детальные данные об особенностях реализации онтогенетических программ развития растений и усовершенствовать периодизацию эмбриогенеза. С другой стороны, и сама эмбриологически корректная периодизация развития зародыша может послужить методологической основой дальнейших биотехнологических разработок в области эмбриокультуры *in vitro*.

Авторы выражают искреннюю благодарность к. с.-х. н. В.И. Никонову, заведующему лабораторией селекции яровой пшеницы Селекционного центра по растениеводству Башкирского НИИ СХ РАСХН (г. Уфа), за предоставленный материал для исследования.

Исследование поддержано РФФИ (грант № 11-04-97056) и программой «Ведущие научные школы РФ» (грант № НШ 7637.2010.4).

Литература

1. Банникова В.П., Хведынич О.А., Кравец Е.А. и др. Основы эмбриогенеза злаков. – Киев: Наукова думка, 1991. – 176 с.
2. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
3. Батыгина Т.Б. О возможности выделения нового типа эмбриогенеза Angiospermae // ДАН СССР. – 1968. – Т. 186. – № 6. – С. 1499-1502.
4. Батыгина Т.Б. Эмбриология пшеницы. – Л.: Колос, 1974. – 206 с.
5. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно: атлас. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
6. Батыгина Т.Б. Эмбриогенез злаков // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 2. – СПб.: Мир и семья, 1997. – С. 528-538.
7. Дунаева С.Е., Лукьянова М.В., Ковалева О.Н., Козырева О.Г. Способность незрелых зародышей к образованию растений-регенерантов в культуре *in vitro* у ранне- и позднеспелых сортов ячменя. I. Регенерация растений в первичном каллусе, полученном от незрелых зародышей // Физиология растений – 2000. – Т. 47. – № 1. – С. 53–57.

8. Ковалева О.Н. Цитологический анализ клонов, полученных от незрелых зародышей ячменя сорта Вгусе // Научно-технический бюллетень ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова – 1992. – №. 218. – С. 66–71.

9. Козырева О.Г., Дунаева С.Е. Генетика регенерации в культуре *in vitro* злаков // Генетика. – 1994. – Т. 30. – № 10. – С.1432–1440.

10. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зайцев Д.Ю., Катасонова А.А. Биотехнологическая оценка экспланта для получения растений-регенерантов яровой пшеницы в культуре *in vitro* в целях адаптационной селекции в условиях Южно-Урала // Известия Челябинского НЦ УрО РАН. – 2006. – Вып. 2 (32). – С. 94–98.

11. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2003. – 227 с.

12. Махновская М.Д., Сечняк А.Л., Игнатова С.А. Разработка условий получения регенерантов из незрелых зародышей пшенично-ржаных гибридов // Физиология и биохимия культурных растений. – 1994. – Т. 26. – № 6. – С. 584–587.

13. Эзау К. Анатомия семенных растений. Т. 2. – М.: Мир, 1980. – 558 с.

14. Ainsley P.J., Aryan A.P. Efficient plant regeneration system for immature embryos of triticale (x *Triticosecale* Wittmack) // Plant Growth Regulation. – 1998. – V. 24. – № 1. – P. 23–30.

15. Raghavan V. Experimental embryogenesis in vascular plants. – London: Acad. Press, 1976. – 603 p.

Резюме

На основании результатов детальных гистологических исследований зародышей пшеницы предложена периодизация эмбриогенеза для использования в биотехнологических разработках.

On the base of detailed histological investigations of wheat embryos the periodization of embryogenesis for the using in biotechnological researches has been proposed.

ЛЁШИНА Л.Г.¹, БУЛКО О.В.¹, ЕГОРОВ О.А.²

¹Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Украина, 02660, Киев, ул. Мурманская, 1, e-mail: llioshina@ukr.net

²Химическая компания «СПОЛУКА»,

Украина, 02660, Киев, ул. Мурманская, 5, e-mail: Oleg.Igorov@gmail.com

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БАРВИНКА МАЛОГО (*VINCA MINOR*): БИОСИНТЕЗ ВИНКАМИНА В РАСТЕНИЯХ-РЕГЕНЕРАНТАХ

Барвинок малый (*Vinca minor L.*) – вечнозеленый стелющийся полукустарник из семейства кутровых (*Aposynaceae*). В надземной части барвинка содержится более 20 индольных алкалоидов, близких по природе к резерпину (индольному алкалоиду, выделенному из растений рода раувольфия), которые используются в фармацевтике как средство кардиотонического действия, стимулирующее кроветворение и деятельность центральной нервной системы [1]. Кроме того, благодаря декоративности и неприхотливости барвинок малый широко применяется в садоводстве.

Однако это медленно растущее растение, которое размножается преимущественно при помощи вегетативных побегов, а его заготовку в одном месте можно проводить не чаще одного раза в три года. Поэтому важной задачей является разработка альтернативных биотехнологических приемов размножения растения и получения из него веществ, ценных для фармацевтики и косметологии.

A.rhizogenes – почвенная агробактерия, трансформирующая растительную клетку и индуцирующая рост культуры «бородатого корня» в месте поранения растительной ткани. Для некоторых растений показано изменение синтеза вторичных метаболитов после агробактериальной трансформации [2-5]. Для ряда растений показано, что Ri-трансформация улучшает биохимические показатели культивируемых корней [6,7] и декоративные характеристики растения [8]. Японскими исследователями получено Ri-трансформанты и регенеранты барвинка с измененной морфологией, но без изменения уровня вторичного метаболизма [9]. Иницирован рост адвентивных корней и мультикультуры побегов как способ для микроклонального размножения растения с некоторым повышением биосинтеза винкамина в растениях-регенерантах [10].

В данной работе мы исследовали особенности агробактериальной трансформации барвинка малого, получения культуры “бородатого корня”, регенерации растений из корней и каллусной культуры и показали изменение вторичного метаболизма в регенерантах как следствие агробактериальной трансформации листовых эксплантов и дифференциации клеток из каллуса.

Материалы и методы

В исследовании использовали асептические растения *V.minor*, культивируемые на среде для пролиферации МС [6] с добавлением 0,4 мг/л ИМК и 0,5 мг/л БАП с удвоенным количеством ионов железа.

Агробактериальные штаммы А4, R-1601, 8196, 15834, любезно предоставленные Кузовкиной И.Н., ИФР им. К.А.Тимирязева РАН, Россия, трансформировали бинарным вектором pBin35S-GFP. Условия культивирования агробактерий: среда YEB [7], с добавлением экстракта из листьев *N. tabacum* 100 мМ [8], 120 об/мин., 32°C, 24ч.

Каллусогенез проводили как представлено в [14], а трансформацию и регенерацию как описано [12].

Пробоподготовка образцов для ВЭЖХ-МС: первичная экстракция 1% HCl с последующим извлечением алкалоидов хлороформом. После упаривания сухой остаток растворяли в водно-ацетонитрильном растворе (1:1). ВЭЖХ-МС проводили на приборе Agilent 1100 LC/MSD SL. Использовали градиентное элюирование, подвижная фаза: А – H₂O + 0,1% HCOOH; Б – CH₃CN + 0,1% HCOOH. Колонка Zorbax SB C-18, l=30mm, d=4,6 mm, размер частиц 1,8 микрон, t = 40°C. В качестве количественного детектора использовали диодную матрицу с длиной волны 220 нм. Для идентификации

пиков использовали одноквадрупольный масс-спектрометр с химической ионизацией при атмосферном давлении (APCI).

Результаты и обсуждения

В результате трансформации через 20-22 дня из кромки и почек инокулированных стеблевых сегментов появлялись адвентивные корни. Самым эффективным трансформирующим штаммом оказался R-1601. Морфологическим доказательством генетической трансформации была высокая скорость роста, интенсивное ветвление и отсутствие геотропизма у образовавшихся корней. Генетический ПЦР-анализ показал наличие в трансформантах *rolB*-гена, что подтверждало перенос трансформирующей последовательности Ri-плазмиды [12]. Линии корней были получены после отделения субкультуры от первичных эксплантов и культивирования их на пролиферативной среде. Среду подбирали, добавляя различную концентрацию НУК и повышая концентрацию сахарозы. Хороший прирост корней наблюдался на среде МС ½N с добавлением 0,5 мг/л НУК и 5% содержанием сахарозы. С меньшей концентрацией сахарозы и без добавления гормонов рост корней был намного медленнее, ветвление не таким интенсивным, что подтверждает мнение о том, что интактное растение *V. minor* содержит низкое количество эндогенного ауксина [9].

Дифференцировку побегов из «бородатых корней» индуцировали увеличением концентрации НУК до 1 мг/л, хотя и на среде без гормонов изредка наблюдалась спонтанная регенерация. Существенным отличием трансформантов от интактных растений были быстро развивающаяся корневая система, увеличенная длина корней, небольшая этиоляция листьев и увеличение их размеров (рис1).



1. а б 2. а б 3. а б

Рис.1. Морфологические отличия трансформантов *V. minor* от интактных растений: 1. *In vitro* а – трансформант; б – контроль; 2. а – листья трансформированного растения; б – листья контрольного растения; 3. а – корень контрольного растения; б – корень трансформированного растения.

Первичный анализ с помощью ТСХ показал, что уровень содержания алкалоидов был минимальным в каллусной культуре, возрастал в культуре корней и наибольшее их количество наблюдалось в растениях-регенерантах [13].

Ранее нами была получена и охарактеризована каллусная культура барвинка малого. При культивировании тканей на среде для каллусогенеза с 1 мг/л 2,4Д и 1 мг/л кинетина преимущественно из верхушечных листьев развивался плотный каллус от светло-желтого до светло-коричневого цвета [14].

Дальнейшее наблюдение показало, что в полученной культуре пассируемых каллусных тканей при определенных условиях можно индуцировать морфогенез. После переноса такого каллуса на среду с добавлением 1 мг/л НУК (5% сахарозы) в каллусной ткани появился эмбриоид, представляющий собой биполярную структуру, в которой одновременно развивались корневой и стеблевой апексы, причем корень был сверху, впоследствии из которого сформировался соматический зародыш, в дальнейшем развившийся в полноценное растение, отличающееся от интактного усиленным ветвлением и интенсивным образованием воздушных корней (рис. 2).

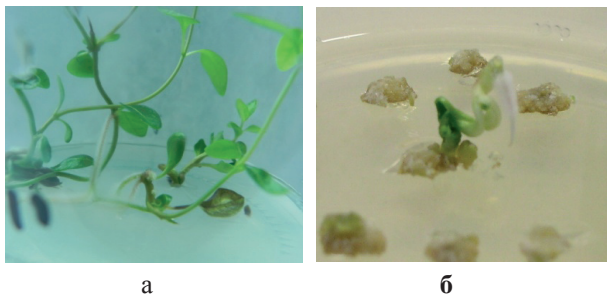


Рис.2. а – соматический зародыш из каллусной культуры *V.minor*; б – воздушные корни растения-регенеранта.

Полученные растения-регенеранты из каллусной культуры и культуры «бородатого корня» были проанализированы с помощью ВЭЖХ-МС на наличие индольного алкалоида винкамина (рис.3).

В качестве стандарта был использован очищенный фармацевтический винкамин. Для исследования брали кислотный экстракт алкалоидов из интактного растения (Рис.3.1), регенеранта из каллусной культуры (Рис.3.2), регенеранта из культуры «бородатого корня» (Рис.3.3) и интактного растения с добавлением стандарта (Рис.3.4).

Определено, что пик со временем выхода 0,71 мин соответствует винкамину, что также подтверждает масс-спектр, представленный на рис.4. Этот алкалоид присутствует во всех 4-х образцах в разной концентрации. Из хроматограммы видно, что в случае с регенерантом из каллусной культуры содержание винкамина увеличивается, по сравнению с интактным растением на 100%, а в экстракте растения-регенеранта из культуры «бородатого корня» на 160% .

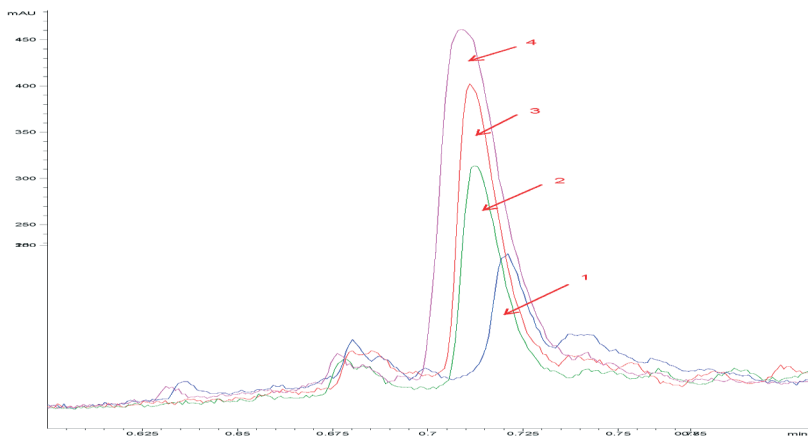


Рис.3. Хроматограммы растительных экстрактов: 1-интактное растение ; 2 – растение-регенерант из каллусной культуры; 3- растение-регенерант из культуры «бородатого корня»; 4 – интактное растение с добавлением стандарта.

Print of window 79: MS Spectrum

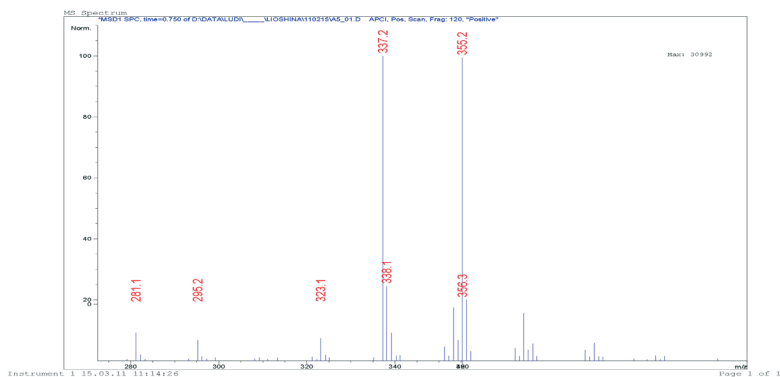


Рис. 4. Масс-спектр вещества с временем выхода 0,71 мин.

Выводы. В результате трансформации барвинка малого (*Vinca minor* L.) почвенной аргобактерией *A.rhizogenes* получена культура «бородатого корня». Установлено, что наиболее эффективным трансформирующим штаммом является штамм R-1601. Из культуры корней, на среде с добавлением 1 мг/л НУК и 5% сахарозы инициированы растения-регенеранты. На среде того же состава из каллусной культуры был индуцирован соматональный зародыш, из которого получено взрослое растение. Растения-регенеранты имели заметные морфологические отличия от интактного растения. Определение с помощью ВЭЖХ-МС содержания алкалоида винкамина показало увеличение его количества в растениях-регенерантах.

Литература

1. Мазнев Н. И. Энциклопедия лекарственных растений. — М.; Мартин.-2004. — 496 с.
2. Hughes E., Hong S.-B., Gibson S., Shanks J., Sana K.-Y. Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine // *Metabolic Engineering*.-2004.-vol.6.-P.268–276.
3. Richter U., Rothe G., Fabian A.-K., Rahfeld B., Dräger B. Overexpression of tropinone reductases alters alkaloid composition in *Atropa belladonna* root cultures // *Journal of Experimental Botany*.-2005.-vol. 56, N412.- P.645-652.
4. Rosic N., Momčilovic I., Kovačević N., Grubišić D. Genetic transformation of *Rhamnus fallax* and hairy roots as a source of anthraquinones // *Biologia plantarum*.-2006.- vol.50,N4. –P. 514-518.
5. Tiwari R.K., Trivedi M., Guang Z.-C., Guo G.-Q. , Zheng G.-C. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of *Scutellaria baicalensis* and production of flavonoids in hairy roots // *Biol Plant*.-2008.-vol.52,N1. – P.26-35.
6. Tanaka N., Matsumoto T. Regenerants from *Ajuga* hairy roots with high productivity of 20-hydroxyecdysone. *Plant Cell Rep*.-1993.–vol.13.-P.87-90.
7. Matsumoto T., Tanaka N. Production of phytoecdysteroids by hairy root cultures of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea*. // *Agr.Biol.Chem*.-1991.–vol.55.– P.1019-1025.
8. Koga M., Hirashima K., Nakahara T. The transformation system in Foxglove (*Digitalis purpurea* L.) using *Agrobacterium rhizogenes* and traits of the regenerants // *Plant Biotechnology*.- 2000.- vol.17, N2.-P.99- 104.
9. Tanaka N., Takao M., Matsumoto T. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated Transformation and Regeneration of *Vinca minor* L. // *Plant Tissue Culture Letters*.-1994.-vol. 11, №3.-P.191-198.
10. Tanaka N., Takao M., Matsumoto T. Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.-1995.-vol.41,N1.- P. 61-64.
11. Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plantarum*. -1962.- vol.15, N3.- P.473-497.
12. Лёвшина Л.Г., Булко О.В. *Agrobacterium rhizogenes*-опосредованная трансформация и регенерация двух видов растений из семейства *Aposynaceae* // *Фізіологія та біохімія культурних рослин* – В друку.
13. Лёвшина Л.Г., Булко О.В. Изучение влияния трансформации *Agrobacterium rhizogenes* на биосинтез вторичных метаболитов барвинка малого *V.minor* // *Український біохімічний журнал* – 2010. – т.82, № 4 (додаток1). – С.205-206.
14. Лёвшина Л.Г., Булко О.В., Галкін А.П. Отримання і характеристика калусної і суспензійної культури барвінка малого *Vinca minor* // *Збірник наукових праць «Фактори експериментальної еволюції організмів»*- К.Логос.- 2009.- т.7.-С.161-166..

Резюме

Агробактеріум-опосередованна трансформація барвінка малого (*Vinca minor* L.) вызвала появлення культури «бородатого корня». Из калусной культуры и культуры «бородатого корня» получены растения-регенеранты, которые проанализированы на содержание алкалоида винкамина.

Агробактеріум-опосередована трансформація викликала появу культури «бородатого кореня» у барвінку малого (*Vinca minor* L.). Из калусної культури і культури «бородатого коріння» отримано рослини-регенеранти, які проаналізовано на вміст алкалоїда винкамина.

Hairy roots cultures from lesser periwinkle (*Vinca minor L.*) has been received with agrobacterium-mediated transformations. Hairy root and callus have shown ability to regeneration and developed into plants. The received plants are analyzed on the vincamin's content.

ЛИХАЧЕВА Л.И., ГУЛЬКО Т.П., РУБАН Т.А., КОРДИУМ В.А.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03143Б Киев, ул. Заболотного, 150*

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЫШИНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

Одной из актуальных проблем клеточной терапии и регенеративной медицины является увеличение количества целевых клеток, предназначенных для введения в организм, путем их размножения *in vitro*. Поскольку это мультиплицирование клеток происходит вне организма, возникает вопрос, не происходят ли с этими клетками нежелательные изменения, которые могут представлять опасность при их последующей трансплантации. В литературе накоплен значительный объем экспериментальных данных о природе и поведении клеток, потенциально пригодных для введения в организм, как *in vitro*, так и *in vivo*, который позволяет сделать вывод о необходимости проведения исследований по генетической безопасности клеточных трансплантатов на геномном, хромосомном и генном уровнях. При длительном пассировании *in vitro* любые диплоидные клетки, в том числе и стволовые, обязательно проходят два контрольных этапа, которые регулируют их жизненный путь – старение и фазу кризиса, при которой наблюдается хромосомная нестабильность, в норме приводящая к апоптозу. Однако данные литературы последних лет свидетельствуют о том, что длительное культивирование может и приводит к отбору и посткризисному выживанию клеточных популяций, обладающих генетической нестабильностью и опухоленностью при трансплантации *in vivo* (1-3). Таким образом, возникает необходимость в разработке способов тестирования клеток на предмет их безопасности для использования в клеточной терапии. Существует большое количество методов идентификации произошедших изменений в клетках, которые основаны на выявлении хромосомных aberrаций, транслокаций, делеций, изменений поверхностного фенотипа и т.д. Однако не всегда известны маркеры измененных клеток, широкий поиск ограничивает имеющийся в наличии набор зондов и праймеров, существует угроза невозможности тестирования ранних, потенциально опасных изменений и т.д.

В основу настоящей работы был положен принцип опознания измененных, чужих клеток в организме иммунной системой. В качестве модели

для воссоздания элементов иммунного надзора *in vitro* были использованы мышинные фибробласты и мышинные клетки периферической крови

Материалы и методы

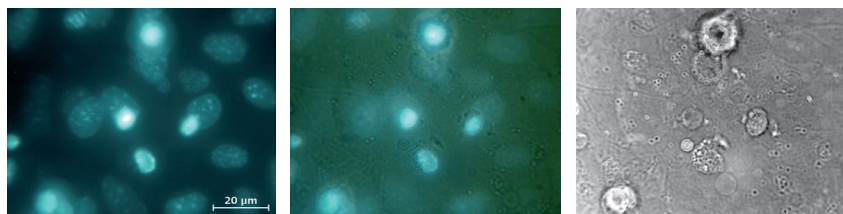
Асептически выделенные мягкие ткани нижних конечностей эмбрионов мышей на 13,5 день беременности 3 раза промывали средой DMEM (Sigma), содержащей 10X пенициллина и стрептомицина, и оставляли на 20 минут при 4°C. Потом среду меняли и добавляли 0,25% раствор трипсина с Версеном (1:1). После ресуспендирования ткани густую клеточную суспензию разбавляли средой DMEM с 2,5% ЭТС и высевали $1,5 \times 10^4$ в чашку Петри (диаметр 3- 5 см). Клетки выращивали при 37°C и 5% CO₂. Клетки, которые выросли, являются нулевым пассажем. Дальнейший пересев дает 1-й, 2-й и следующие пассажи. Из 1-2 мл крови взрослых мышей той же линии получали фракцию клеток белой крови путем центрифугирования в капиллярах. Клетки белой крови отмывали от плазмы средой RPMI, затем $1-5 \times 10^5$ лейкоцитов вносили в чашки с фибробластами (от нулевого до 4-го пассажей). Смесь клеток выдерживали 1 час при 37°C и 5% CO₂, затем средой DMEM отмывали излишек клеток белой крови. Оставшиеся клетки фибробластов и крови фиксировали и окрашивали красителем ДНК Hoechst 33342. Контрольные варианты (без клеток крови) обрабатывали подобным образом. Препараты промывали и микроскопировали в люминесцентном микроскопе, используя ультрафиолетовый фильтр, а также видимый свет и совмещенное освещение (ультрафиолет и видимый свет одновременно).

Результаты и обсуждение

Нами показано, что при взаимодействии клеток белой крови с фибробластами нулевого пассажа в них не наблюдаются изменения по сравнению с контрольным вариантом (рис. 1 и 2).

Внесение клеток периферической крови к клетками культуры фибробластов 1-го и 2-го пассажей приводит к появлению изменений в морфологии и разрушению цитоплазмы и ядра части клеток фибробластов (рис.3), тогда как в контрольном варианте таких явлений нет (рис.4). Дальнейшее увеличение числа пассажей фибробластов сопровождается разрушением практически всех клеток фибробластов внесенными клетками крови (рис. 5), тогда как в контрольных вариантах все клетки целы (рис. 6).

Полученные результаты говорят о том, что в процессе пассирования культуры фибробластов, клетки изменяются до такой степени, что собственные клетки белой крови, среди которых есть клетки, выполняющие защитные функции, воспринимают их как чужие и уничтожают.

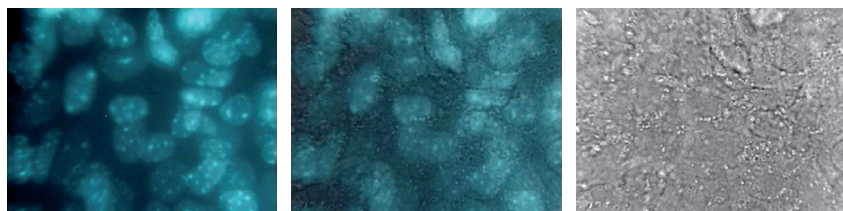


а

б

в

Рис.1. Нулевой пассаж фибробластов, опытный вариант (а – ультрафиолет, б – совмещенное освещение, в – видимый свет).



а

б

в

Рис.2. Нулевой пассаж фибробластов, контрольный вариант (а – ультрафиолет, б – совмещенное освещение, в – видимый свет).

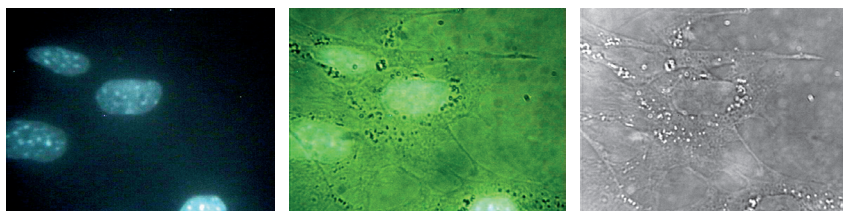


а

б

в

Рис.3. Второй пассаж фибробластов, опытный вариант (а – ультрафиолет, б – совмещенное освещение, в – видимый свет).



а

б

в

Рис.4. Второй пассаж фибробластов, контрольный вариант (а – ультрафиолет, б – совмещенное освещение, в – видимый свет).

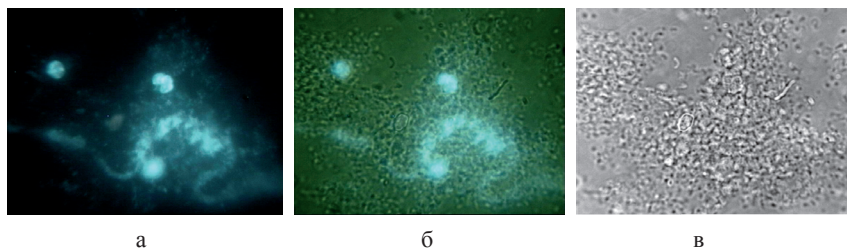


Рис.5. Четвертый пассаж фибробластов, опытный вариант (а – ультрафиолет, б – совмещенное освещение, в – видимый свет)

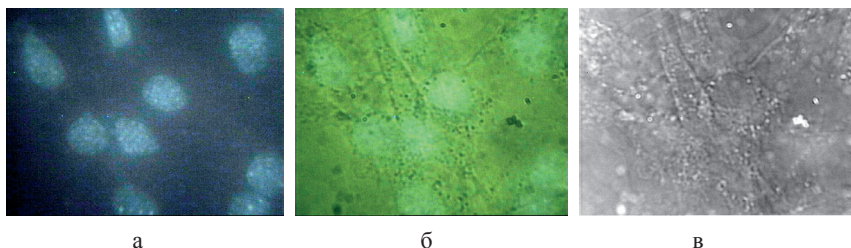


Рис.6. Четвертый пассаж фибробластов, контрольный вариант (а – ультрафиолет, б – совмещенное освещение, в – видимый свет).

Выводы

Проведено изучение отличий взаимодействия клеток периферической крови мышей с аутологичными клетками культуры фибробластов разных пассажей и показано, что в нулевом пассаже нет изменений в клетках культуры или они настолько минимальны, что не узнаются клетками крови. Но в ходе пассирования культуры фибробластов изменения нарастают, что приводит к распознаванию их клетками крови, представляющими элементы иммуннадзора, и в итоге, к разрушению измененных и ставших «чужеродными» клеток фибробластов.

Литература

1. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin M.C., et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005;65(8), p.3035-9.
2. Miura M., Miura Y, Padilla-Nash HM., et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006; 24 (4), p.1095-103.
3. Wang Y, Huso DL., Harrington J., et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytherapy.* 2005; 7(6), p.509-19

Резюме

Различия, выявленные при взаимодействии фибробластов мышей разных пассажей с клетками периферической крови, являются доказательством изменений, происходящих в клетках при культивировании *in vitro* и свидетельствуют о необхо-

димости изучения изменений клеток после их мультипликации вне организма для безопасного использования в регенеративной медицине.

Відмінності, які були виявлені при взаємодії фібробластів миші різних пасажів з клітинами периферичної крові, є доказом змін, які відбуваються в клітинах при культивуванні *in vitro* та свідчать про необхідність вивчення змін клітин після їх мультиплікації поза організмом для безпечного використання в регенеративній медицині.

The differences revealed in the interaction of murine fibroblasts at different passages with the cells of peripheral blood are the evidence of the change, which take place in cells at their cultivation *in vitro* and indicate the need for studying the alterations of cells after their multiplication out of organism for safe use in regenerative medicine.

**МАТВЕЕВА А.Ю., КУРЧИЙ В.М., СИРАНТ Л.В., МОРГУН Б.В.,
БАНИКОВА М.А., ТИЩЕНКО Е.Н.**

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

ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЭНЗИМОВ МЕТАБОЛИЗМА САХАРОЗЫ В ПРОРОСТКАХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ, ИНФИЦИРОВАННОЙ *IN PLANTA* ШТАММОМ GV2260, СОДЕРЖАЩИМ ПЛАЗМИДУ pCB002

Agrobacterium-опосредованная трансформация *in planta* – перспективное направление генетической инженерии растений. Вместе с тем, успешность технологических решений во многом определяется пониманием генетических и физиологических аспектов процесса взаимодействия агробактерия – растение, а также метаболических изменений, происходящих в последних в ответ на инфицирование обезоруженными штаммами.

Особый интерес вызывают ферменты метаболизма сахарозы [1, 2], которым отводится важная роль в установлении баланса между сахарами (сахароза, гексозы) как сигнальными/регуляторными молекулами и компонентами метаболических путей в процессе развития растений. Ранее нами установлено, что на ранних этапах органогенеза *in vitro* кукурузы, индуцированного от клеток незрелых зародышей после их трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, происходит повышение активности сахарозосинтазы (СС) в реакции синтеза сахарозы и ее включения в метаболизм инвертазой [3]. В этой связи предположено, что через гексозы может осуществляться взаимодействие в путях передачи сигналов, активирующих, с одной стороны, агробактериальную *vir*-регуляторную систему процессинга и переноса рекомбинантных ДНК, а с другой – процесс роста и дифференцировки клеток в ходе органогенеза *in vitro*. Целью данной работы было сравнительное изучение активности ферментов метаболизма сахарозы и содержания углеводов на ранних стадиях онтогенеза инбредных ли-

ний кукурузы, инфицированной *in planta* штаммом GV2260, содержащим pCB002.

Материалы и методы

Генетическую трансформацию инбредных линий кукурузы Л250, Л370, 1555 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины) проводили частично модифицированным нами методом Чумакова и соавт. [4]. Использовали выращенную в жидкой LB-среде ночную культуру агробактериального штамма GV2260, векторная конструкция которого содержала гены *E. coli*: селективный – неомоцинофосфотрансферазы (*nptII*) и репортёрный – β -глюкуронидазы. Полученные после инфицирования генеративных тканей зерновки проращивали на модифицированной MS-среде с добавлением селективного агента – канамицина (*Km*) в концентрации 50 мг/л с 16-часовым фотопериодом. Селекцию проводили в течение 2х пассажей продолжительностью в 2 недели. ДНК выделяли из зрелых зерновок (Т0) и побегов Т1-растений, наличие гена *nptII* в геноме кукурузы определяли ПЦР-методом.

Активность энзимов СС и инвертазы *Km*-устойчивых 20-дневных побегов выделяли методами, описанными ранее [5]. Растительную ткань (0,5 г) гомогенизировали в буфере А, содержащем 0,05 М Трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЕДТА, 10 мМ ДТТ и 10 мМ MgCl₂. После центрифугирования супернатант фракционировали сульфатом аммония от 0 до 90% насыщения. Осадок растворяли в минимальном объёме буфера А, диализовали 12 час в том же буфере, разбавленном в 10 раз. В полученном диализате, содержащем растворимые формы инвертазы, определяли белки по Лоури. После солюбилизации белковую фракцию, содержащую преимущественно белки клеточных стенок, диализовали и использовали для определения активности инвертазы клеточных стенок (ИКС) [6]. СС в реакции синтеза определяли по количеству образованной сахарозы [7], в реакции расщепления сахарозы – по количеству образованной фруктозы арсеномолибдатным методом [8]. Активность вакуолярной и цитоплазматической инвертазы, а также содержание сахарозы, моносахаров и крахмала определяли методами, описанными нами ранее [9]. В агробактериальном штамме ночной культуры активность ферментов, определённая теми же методами, отсутствовала. Достоверность полученных результатов определяли по критериям Стьюдента.

Результаты и обсуждение

После *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* с использованием штамма GV2260 (pCB002) были получены зерновки инбредных линий кукурузы: Л250, Л370, 1555, ПЦР-анализ произвольной выборки которых показал наличие гена *nptII* – детерминанты устойчивости к селективному агенту (данные не представлены). Одним из удобных биохимических показателей, который позволяет оценить последствия инокуляции клеток генеративных тканей штаммами *Agrobacterium tumefaciens* на процессы оплодотворения и эмбриогенеза, являются запасные белки. Спектр поли-

пептидов зеинов эндосперма кукурузы на стадии восковой спелости не выявил достоверных отличий между трансформированными и нетрансформированными вариантами (рис.1). Таким образом, инфицирование GV2260, содержащим плазмиду pCB002, не приводило к изменениям в экспрессии генов запасных белков. Это позволяет предположить, что этот штамм не оказывал существенного влияния на процесс эмбриогенеза проанализированных инбредных линий кукурузы.

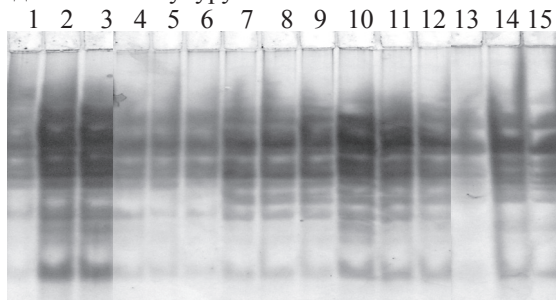


Рис.1. Электрофореграмма запасных белков – зеинов контрольных (Л250 1-3, 1555 7-12) и инфицированных *in planta* с помощью GV2260 (pCB002) растений инбредных линий кукурузы Л250 (4-6) и 1555 (13-15).

Поскольку сахара и гексозы принимают участие в контроле многих физиологических процессов, в том числе прорастания и фотоморфогенеза, изучали особенности функционирования ферментов метаболизма сахарозы в листьях 20-дневных растений кукурузы, молекулярно-генетический анализ которых показал наличие гена *prfH*. На рис. 2 и 3 представлены результаты исследования активности ферментов сахарозосинтазы и инвертазы.

В реакции синтеза сахарозы удельная активность СС ингибировалась лишь у Л370 (на 31 %), у остальных – достоверно не отличалась от контроля, тогда как общая активность СС уменьшалась примерно в 2 раза для инбредных линий Л250, Л370, и на 11% для линии 1555. Расщепление сахарозы СС, в результате которого образуются нуклеозиддифосфатсахара и фруктоза, проведено нами с субстратом УДФ в концентрации, соответствующей максимальной скорости реакции. Ответная реакция на инфицирование штаммом приводила как к понижению (на 26%) для Л370, так и к повышению (соответственно на 10 и 36%) для Л250 и 1555 удельной активности. Что касается общей её активности, то для 1555 она практически не изменялась, а для остальных инбредных линий ингибировалась почти наполовину. Т.о., в ответ на агробактериальную инфекцию наблюдалась генотипическая зависимость функционирования СС в реакциях синтеза и расщепления сахарозы.

Другим путём включения сахарозы в метаболизм является её гидролиз инвертазой с последующим использованием моносахаров в процессах гли-

колиза и дыхания. В отличие от СС инвертаза необратимо катализирует реакцию, в результате которой образуются две гексозы, которые могут быть потенциальными сигнальными и регуляторными молекулами.

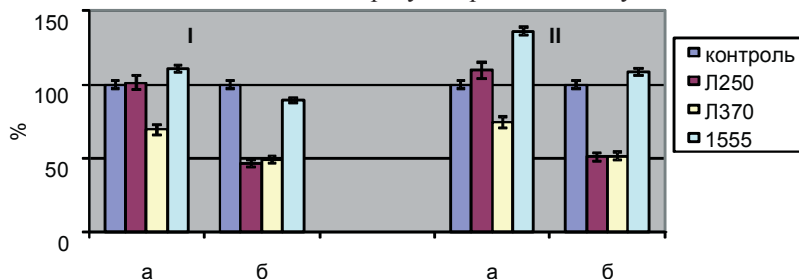


Рис.2. Удельная (а) и общая (б) активность СС: I – в реакции синтеза сахарозы, II – в реакции расщепления с УДФ в листьях 20-дневных растений, полученных после инфицирования *in planta* генеративных тканей *Agrobacterium tumefaciens* штамма GV2260 (pCB002), % от контроля.

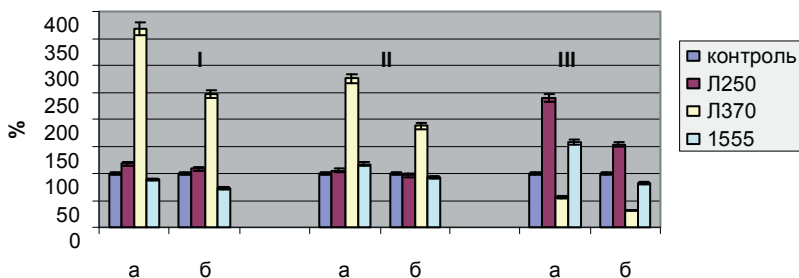


Рис.3. Удельная (а) и общая (б) активность инвертазы: I – VI, II – CI, III – ИКС в листьях 20-суточных растений, полученных после инфицирования генеративных тканей штаммом GV2260 (pCB002), % от контроля.

На рис.3 представлены результаты сравнительного изучения активности трёх форм инвертазы в листьях 20-дневных растений при фотоморфогенезе. Удельная и общая активность VI для L370 возрастала в 3,7, 2,5 раз соответственно, для 1555, наоборот, снижалась на 11 и 28% соответственно, а для L250 незначительно повысилась лишь удельная активность (на 18%). Что касается активности CI, то она изменялась лишь у инбредной линии L370 (возрастала в 2,8 раз для удельной и 1,9 – для общей активности). Активность ИКС линии L370 значительно снижалась (на 44 и 69%), в то время как для L250, наоборот, – возрастала на 140 и 53% соответственно, а для линии 1555 удельная стимулировалась (на 59%), тогда как общая – снижалась (на 19%). В целом, в ответ на инфицирование анализируемым штаммом наблюдаются значительные изменения активности инвертазы, характер которых отличается между генотипами.

Что касается углеводов, то у всех линий (Л250, Л370, 1555) происходило снижение содержания сахарозы на 74, 81, 39% и моносахаров на 36, 25, 23%, соответственно. Содержание крахмала у Л250 и Л370 также снижалось (на 35% и 60%, соответственно), тогда как у 1555 повышалось на 13%.

Выводы

Под влиянием агробактериальной инфекции штаммом GV2260, содержащим рСВ002, наблюдаются генотипические изменения в активности ферментов метаболизма сахарозы – сахарозосинтазы и разных форм инвертазы, а также содержания углеводов.

Литература

1. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Current Opinion in Plant Biology*. 2004. – 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* // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т.8, №1. – С. 18-24.
4. 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.
5. Sowokinos I.R. Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum* // *Plant Physiol.* – 1976. – 57. – P. 63-68.
6. Carlson S.J., Courey P. Reevaluation of the relative roles of two invertases, GNCW2 and GVR1, in developing maize kernels and other tissues // *Plant Physiol.* – 1999. – V.121. – P. 1025-1035.
7. Roe J.H. A colometric method for the determination of fructose in blood and urine // *J. Biol. Chem.* – 1934. – 107, №1. – P. 15-22.
8. Somogyi M. Notes on sugar determination // *J. Biol. Chem.* – 1952. – 195, №1. – P. 18-23.
9. Сакало В.Д., Курчий В.М. Активність сахарозосинтази та інвертази в етіюльованих проростках кукурудзи за дії стресових чинників // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – Т.41, №5. – С. 400-407.

Резюме

Сравнивали активность ферментов метаболизма сахарозы в листьях 20-дневных Т0-растений 3х инбредных линий кукурузы Л250, Л370, 1555, инфицированной *in planta* GV2260 (рСВ002). Под влиянием агробактериальной инфекции штаммом GV2260 наблюдаются генотипические изменения в активности ферментов метаболизма сахарозы – сахарозосинтазы и разных форм инвертазы, а также содержания углеводов.

Порівнювали активність ферментів метаболізму сахарози у листі 20-денних Т0-рослин 3х інбредних ліній кукурудзи Л250, Л370, 1555, інфікованої *in planta* GV2260 (рСВ002). Під впливом агробактеріальної інфекції штамом GV2260 спо-

стерігаються генотипові зміни в активності ферментів метаболізму сахарози – сахарозсинтази й різних форм інвертази, а також вмісту вуглеводів.

Sucrose's metabolism ferments activity at the 20days T0-plants 3 inbred lines L250, L370, 1555 of maize infected *in planta* GV2260 (pCB002) was compared. Genotypic changes in the sucrose's metabolism ferments activity – sucrose synthase and different forms invertases, as well as at the carbohydrates' content under effect of the agrobacterial infection by strain GV2260 are observed.

МАТВЕЕВА Н.А.¹, КУРБАТОВА Л.Е.², КВАСКО Е.Ю.¹

¹ *Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины Украина, 03680, Киев, ул. ак. Заболотного 148, e-mail: jojna56@gmail.com*

² *Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской Академии наук Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д.2.*

IN VITRO КОЛЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ АНТАРКТИКИ КАК ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ

Культивирование растений в стерильных условиях используется как для сохранения редких и исчезающих видов, так и для получения достаточного количества материала для биохимических, молекулярно-биологических и других исследований. Особенный интерес представляет создание и поддержание коллекции *in vitro* растений Антарктики. Это связано с отдаленностью материка, высокой стоимостью доставки живых образцов, а также невозможностью постоянного получения растительного материала. Кроме того, постоянный отбор образцов может нанести непоправимый вред антарктическим экосистемам.

Хотя флора антарктического материка и прилегающих островов изучается достаточно давно, всесторонние исследования антарктических растений представляют большой интерес. Это связано с климатическими особенностями Антарктики – низкими температурами, повышенным уровнем ультрафиолетовой радиации, наличием циклов замораживание-оттаивание. Такие климатические особенности, очевидно, способствовали появлению у растений адаптивных механизмов, позволяющих выживать в экстремальных условиях. Ранее изучались физиологические ответные реакции антарктических растений на действие УФ, замораживание и оттаивание, низкие температуры [1-5]. Кроме того, может представлять интерес также изучение тех молекулярно-биологических особенностей растений Антарктики, которые обуславливают повышенную устойчивость к абиогенным стрессам; результаты таких исследований могут быть использованы в биотехнологиях для создания стрессоустойчивых сельскохозяйственных растений.

С целью получения достаточного количества чистых линий растений нами было начато создание *in vitro* коллекции, которая включает высшие сосудистые растения и мохообразные Антарктики.

Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали живые растения *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobantus quitensis* (Kunth) Bartl., *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) P.Gaertn., B.Mey. & Scherb), *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochyra, *Sanionia georgicouncinata* (Müll.Hal.) Ochyra and Hedenäs (образцы собраны в 2010 г. на о. Галиндез, район станции Академик Вернадский), *Bryum archangelicum* Bruch & Schimp., *Bryoerythrophyllum recurvirostrum* (Hedw.) P.C.Chen (образцы собраны в 2010 г. соответственно в районе станции Новолазаревская, Земля королевы Мод, оазис Ширмахера и на юго-восточном берегу залива Приудс, Земля принцессы Елизаветы, полуостров Брокнес). Для введения в асептическую культуру экспланты (части стеблей) стерилизовали 10-30 сек в 70% этаноле, 1-5 мин в 20% растворе препарата «Белизна», трижды по 5 мин промывали стерильной дистиллированной водой и культивировали на агаризованной среде 1/2МС [6] при температуре 24⁰С и 16-часовом фотопериоде. Растения *D. antarctica*, *C. quitensis* размножали путем отделения боковых побегов на средах: МС, 1/2МС, LS1 (МС+2,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л α-нафтилуксусной кислоты НУК), LS3 (МС+0,5 мг/л кинетина и 0,05 мг/л НУК); укореняли на среде 1/2МС. Растения мхов размножали аналогичным образом (*W. fontinaliopsis*) или путем инициации роста побегов на вторичной протонеме (*B. archangelicum*, *B. pseudotriquetrum*, *B. recurvirostrum*). Для этого использовали среду 1/2МС с 20 г/л сахарозы или ту же среду без сахарозы.

Результаты исследований

При введении в стерильную культуру мохообразных была выявлена их очень высокая чувствительность к стерилизующим агентам по сравнению с *D. antarctica* и *C. quitensis*. Так, наблюдали 100% гибель эксплантов *S. georgicouncinata* при повышении концентрации раствора «Белизны» с 20 до 25%. Время обработки спиртом также существенно влияло на выживаемость эксплантов. Оптимальным для мохообразных было время обработки 10 сек, при более длительной обработке растения погибали.

После поверхностной стерилизации экспланты культивировали *in vitro* с целью получения растений и оптимизации условий для их микроразмножения.

Экспланты *D. antarctica* и *C. quitensis* через 10-30 сут формировали боковые побеги. Изменение состава питательной среды, а именно увеличение содержания макроэлементов, добавление регуляторов роста (кинетин, α-нафтилуксусная кислота, гиббереловая кислота) влияло как на индекс роста (среднее количество растений на одном экспланте), так и на высоту растений. Так, через 45 сут индекс роста у *D. antarctica* и *C. quitensis*

составил соответственно на средах: МС – $6,5 \pm 2,94$ и $2,8 \pm 0,39$; 1/2МС – $10,67 \pm 1,87$ и $5,2 \pm 1,46$; LS1 – $7,2 \pm 2,9$ и $5,4 \pm 1,33$; LS3 – $7,0 \pm 1,8$ и $5,0 \pm 1,45$. Наибольшая высота растений *D. antarctica* – до 60 мм на среде 1/2МС, растений *C. quitensis* – 15 мм независимо от состава среды.

При культивировании эксплантов мхов разных видов выявлены отличия их размножения в стерильных условиях. Так, на эксплантах *S. georgicouncinata* и *W. fontinaliopsis* формировались боковые побеги, число которых на экспланте длиной 10 мм через 1 месяц составляло около 20. Рост трех других видов – *B. pseudotriquetrum*, *B. archangelicum* и *B. recurvirostrum* – начинался с формирования вторичной протонемы, сильно разветвленной у двух видов *Bryum*. Через 20-30 сут на протонеме у *B. pseudotriquetrum*, *B. archangelicum* формировались почки, из которых образовывались новые растения высотой до 15 мм.

Следует отметить, что в культуре *in vitro* наблюдали необычный для растений *W. fontinaliopsis* способ размножения. Так, при длительном выращивании растений на питательной среде без субкультивирования на побегах образовывались выводковые пазушные почки, дававшие начало новым растениям.

Таким образом, среды 1/2МС и LS1 являются оптимальными для микроразмножения растений *D. antarctica* и *C. quitensis* в условиях *in vitro*; коэффициент размножения за 45 сут составлял соответственно $10,67 \pm 1,87$ и $5,4 \pm 1,33$.

Микроразмножение мохообразных Антарктики различными видами в культуре *in vitro* возможно несколькими путями: индукцией роста боковых побегов и их последующего отделения (*S. georgicouncinata* и *W. fontinaliopsis*); инициацией роста вторичной протонемы с последующим образованием на ней побегов (*B. pseudotriquetrum*, *B. archangelicum*); путем образования выводковых пазушных почек.

Созданную коллекцию антарктических растений и разработанные методики их микроклонального размножения в культуре *in vitro* предполагается в дальнейшем использовать в молекулярно-биологических исследованиях.

Авторы выражают признательность Национальному антарктическому научному центру Государственного агентства по вопросам науки, инноваций и информации Украины за логистическую и финансовую поддержку исследований.

Литература

1. Bravo L.A., Griffith M. Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants// J. Exp. Bot. – 2005. – vol. 56, № 414. – P. 1189-1196.
2. Bravo L.A., Saavedra-Mella F.A., Vera F. et al. Effect of cold acclimation on the photosynthetic performance of two ecotypes of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. // J. Exp. Bot. – 2007. – vol. 58, № 13. – P. 3581-3590.

3. Lovelock C. E., Jackson A. E., Melick D. R., Seppelt R. D. Reversible Photoinhibition in Antarctic Moss during Freezing and Thawing// Plant Physiol. – 1995. – vol. 109, № 3. – P. 955–961.

4. Pérez-Torres E., Dinamarca J., Bravo Le A., Corcuera L. J. Responses of *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. to high light and low temperature // J. Polar Biol. – 2004. – vol. 27, № 3. – P. 183-189.

5. Day T.A., Ruhland C.T., Xiong F.S. Influence of solar ultraviolet-B radiation on Antarctic terrestrial plants: results from a 4-year field study// J. Photochem. Photobiol. B. – 2001. – vol. 62, № 1-2. – P. 78-87.

6. 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.

Резюме

Введені в культуру *in vitro* рослини Антарктики *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) P.Gaertn., B.Mey. & Scherb), *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochyra, *Sanionia georgicouncinata* (Müll. Hal.) Ochyra and Hedenäs, *Bryum archangelicum* Bruch & Schimp., *Bryoerythrophyllum recurvirostrum* (Hedw.) P.C.Chen. Для цього оптимізовані умови поверхньої стерилізації і методики мікроклонального розмноження судинних рослин і мохоподібних. Середи 1/2MS і MS+2,5 mg/l кінетин і 0,5 mg/l НУК оказались оптимальними для мікророзмноження *D. antarctica* та *C. quitensis*

Уведено в культуру *in vitro* рослини Антарктики *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) P.Gaertn., B.Mey. & Scherb), *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll.Hal.) Ochyra, *Sanionia georgicouncinata* (Müll. Hal.) Ochyra and Hedenäs, *Bryum archangelicum* Bruch & Schimp., *Bryoerythrophyllum recurvirostrum* (Hedw.) P.C.Chen. Для цього оптимізовано умови поверхневої стерилізації та методики мікроклонального розмноження судинних рослин і мохоподібних. Середовища відповідно 1/2MS та MS+2,5 mg/l кінетину та 0,5 mg/l НОК виявилися оптимальними для мікророзмноження *D. antarctica* та *C. quitensis*

The *in vitro* collection of Antarctic plants *Deschampsia antarctica* Desv., *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl., *Bryum pseudotriquetrum* (Hedw.) P.Gaertn., B.Mey. and Scherb), *Warnstorfia fontinaliopsis* (Müll. Hal.) Ochyra, *Sanionia georgicouncinata* (Müll. Hal.) Ochyra and Hedenäs, *Bryum archangelicum* Bruch and Schimp., *Bryoerythrophyllum recurvirostrum* (Hedw.) P.C.Chen. was created. Methods of surface sterilization and micropropagation for Antarctic plant were optimized. Media 1/2MS and MS+2,5 mg/l kinetin and 0,5 mg/l NAA was optimal for *D. antarctica* and *C. quitensis* micropropagation respectively.

МАШКИНА О.С.^{1,2}, ТАБАЦКАЯ Т.М.¹

¹ФГУП НИИ лесной генетики и селекции

Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

²Воронежский государственный университет,

Россия, 394006, Университетская площадь, д.1, e-mail: olga_mashkina@yahoo.com

СТРАТЕГИЯ ДОЛГОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ *IN VITRO* КОЛЛЕКЦИИ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

К числу современных подходов сохранения *ex situ* ценного генофонда древесных растений относится создание и длительное хранение живых коллекций (генетического банка культур) с помощью различных методов культивирования *in vitro*. Коллекции *in vitro* чаще всего формируются из меристемных клонов, свободных от патогенов, и сохраняются в контролируемых условиях среды. Живые коллекции (целые пробирочные растения, их отдельные органы, ткани и даже клетки) могут долговременно поддерживаться: 1) путем регулярного субкультивирования в условиях нормального роста (пересадочные коллекции), когда обновление питательных сред производят по мере их истощения (в среднем, каждые 1-2 месяца); 2) депонирования при пониженной температуре; добавлении консервантов (ретардантов или осмотически активных веществ), лимитирующих рост; 3) хранением в течение многих лет при сверхнизких температурах, полном отсутствии роста в криобанках (криосохранение). При этом каждый способ имеет свои преимущества и недостатки. Криосохранение в жидком азоте – довольно привлекательный, но дорогостоящий и трудоемкий способ. К тому же методы криосохранения еще недостаточно разработаны для универсального применения, хотя и имеются положительные результаты для отдельных видов древесных [1,2]. Длительное и частое субкультивирование (раз в 1-2 месяца) на питательных средах, обогащенных фитогормонами, удорожает содержание коллекции и может привести к изменению ее генетической стабильности, жизнеспособности и потере ценных признаков [3-6]. Высокое содержание ретардантов или осмотически активных веществ (например, сахарозы) в питательной среде может быть мутагенным фактором [7]. Показала возможность хранения культуры разных видов березы в условиях *in vitro* в течение 12 месяцев при использовании питательных сред, дополненных в разных сочетаниях повышенной концентрации сахарозы, сорбитом, активированным углем и гормонами (АБК и БАП) [8].

Нами был предложен подход [9], уменьшающий вероятность возникновения соматональной изменчивости при многолетнем и относительно редком (раз в 6 месяцев) субкультивировании: полное исключение фитогормонов из состава питательных сред. Важным при этом является вопрос о том, как долго можно культивировать пересадочную коллекцию *in vitro* без изменения ее генетической стабильности и ухудшения хозяйственных качеств растений в полевых условиях. Особый интерес подобные исследо-

вания представляют для карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl.), имеющей большую хозяйственную ценность из-за декоративной узорчатой текстуры древесины, но одновременно являющейся сложным объектом, что связано с ее высоким полиморфизмом, выявляемым на всех изучаемых уровнях организации: клеточном, хромосомном, тканевом, организменном.

Целью настоящих исследований явилось изучение цитогенетической стабильности, особенностей роста и характера проявления узорчатости древесины у растений одного и того же клона «Ia» каллусного происхождения узорчатой высокоствольной формы карельской березы в процессе длительного (свыше 18 лет) субкультивирования *in vitro*.

Материалы и методы

Объектом исследования послужили растения клона Ia узорчатой высокоствольной формы, высаженные в питомник через год, 10 и 11 лет культивирования *in vitro*, а также пробирочные растения в длительной (18 лет) культуре. На момент проведения исследований (2009 год) общий биологический возраст растений составил 18 лет. Регенерация растений проводилась через стеблевые каллусные культуры по способу [10], а длительное субкультивирование микрорастений осуществлялось с интервалом раз в 6 месяцев на питательных средах без гормонов по разработанной нами методике [9]. Цитогенетическую стабильность оценивали по частоте патологий митоза (процент клеток с нарушениями в мета-, ана-, телофазе митоза к общему числу просмотренных делящихся клеток) в листовой меристеме и уровню миксоплоидии (процент клеток с числом хромосом, отклоняющимся от модального диплоидного, $2n=2x=28$); об узорчатости древесины и степени ее выраженности судили по косвенным показателям; наличию и величине вздутий на внешней поверхности ствола).

Результаты и обсуждение

Растения исходного клона Ia, высаженные в питомник после одного года культивирования *in vitro*, характеризовались более высокой морфологической и цитогенетической неоднородностью (а, следовательно, и генетической гетерогенностью соматической ткани) по сравнению с растениями длительного (10 – 18 лет) срока культивирования (табл.). Это может быть связано с клеточной и тканевой селекцией клона каллусного происхождения в процессе его многолетнего культивирования на безгормональной питательной среде. Наряду с типичными по росту растениями, отмечено появление отдельных карликов (с частотой 0,9%) и значительного количества (66%) многоствольных рамет. Ценным свойством явилось раннее (с 3-5 лет), полное (у всех деревьев к 5-8-летнему возрасту) и хорошо выраженное проявление внешних признаков узорчатости древесины. Отмеченные особенности были характерны и для других клонов карельской березы каллусного происхождения (высокоствольной, полукустовидной и кустовидной формы). У растений, полученных из культуры меристем или выра-

щенных по обычной технологии (семенным путем), признаки узорчатости проявляются позже – в 10 – 12 лет. Анатомическое изучение 3-летних растений-регенерантов, проведенное С.В. Щетинкиным [11], подтвердило наличие аномальных структур стебля, характерных для узорчатой древесины. Повторный их анализ в 18-летнем возрасте показал, что древесина растений-регенерантов имеет хорошие декоративные свойства, связанные с формированием типичной узорчатой древесины карельской березы.

Таблица

Морфометрическая и цитогенетическая характеристика растений клона Ia разной длительности культивирования *in vitro*

Анализируемые показатели	Длительность культивирования <i>in vitro</i> / возраст растений, лет			
	1 / 17	10 / 8	11 / 7	18/0
Число изученных растений	223	50	50	–
Высота растений, м	9,3±0,04	4,6±0,08	2,4±0,03	–
% низкорослых растений**	0,9	0,0	0,0	–
% многоствольных растений	66,0	0,0	0,0	–
% растений с признаками узорчатой древесины	100,0	48,0	20,0	–
Число делящихся клеток	2625	–	5024	1061
Патологии митоза, % $\bar{X} \pm S\bar{x}$	4,3±0,7	–	1,3±0,1*	1,4±0,2*
% клеток:				
Диплоидных (2n = 28)	74,5 ± 2,5	–	90,6 ± 0,7*	90,4 ± 1,1*
гипоанеуплоидных (2n=20-26)	18,1 ± 1,8	–	9,2 ± 0,7*	0,0
гиперанеуплоидных (2n=30-34)	5,0 ± 1,3	–	0,2 ± 0,1*	
гаплоидных (14) и гаплоанеуплоидных (2n =10 – 19)	2,4 ± 1,2	–	0,0	0,0
Уровень миксоплоидии	25,5±2,6	–	9,4±0,7*	9,6±1,1*

* различия с исходным клоном (1 год культивирования *in vitro*) достоверны при $P < 0,01$; ** – высота низкорослых растений в 9-летнем возрасте – 1,5 – 2,7 м.

После длительного (10, 11 лет) культивирования *in vitro* не отмечено ни одного случая внутриклоновой изменчивости (отсутствуют карлики, все растения клона одноствольные), а также раннего проявления внешних признаков узорчатости (первые признаки начали проявляться с 6-7 лет у части рамет). Растения исходного клона были миксоплоидными (74,5±2,5% диплоидных клеток и 25,5±2,6% – анеуплоидных), что в целом характерно для карельской березы [12]. С увеличением длительности культивирования наблюдалось существенное уменьшение уровня миксоплоидии (в 2,7 раза) и частоты патологических митозов (в 3 раза). Причем, только у исходного клона были отмечены случаи появления остаточных ядрышек в метафазе митоза, присутствие которых рассматривают как проявление эпигенетической изменчивости и связано с активностью генов рибосомальных цистро-

нов, обычно ингибированных на этой стадии, что приводит к дополнительному синтезу белков, а, следовательно, и к изменениям белково-ферментного состава.

Внутриклоновые различия выявлены и на гормональном уровне. У растений того же клона Ia, высаженных в питомник после одного года культивирования *in vitro*, отмечен более высокий уровень и удельный вес регуляторов роста индольной природы (ауксины) и меньший – ингибиторов роста фенольной природы по сравнению с растениями, высаженными в питомник после 11 лет культивирования *in vitro* [13].

На основании полученных данных высказывается предположение о том, что на проявление признака узорчатости древесины у карельской березы существенное влияние оказывает уровень миксоплазмиды, который обуславливает генетическую гетерогенность клеток соматической ткани, изменяющую их гормональный статус и характер экспрессии генов.

Показано, что различные клоны карельской березы из коллекции в длительной культуре на питательных средах без гормонов сохраняют свои фенотипические особенности: нормальный (клоны Ia, Tr, Ю и А) или мутантный (сомаклональный вариант Л с комплексом измененных признаков) фенотип. Кроме того, относительно редкое (раз в 6 месяцев) субкультивирование микрорастений, способствует поддержанию ювенильности культур на достаточно высоком уровне, высокой укореняемости микрочеренков (95-100%), нормальному росту и сохранности микрорастений. Отсутствие признаки сомаклональной изменчивости и онтогенетического старения. Это позволяет использовать предложенный подход для долговременного сохранения *ex situ* живых образцов ценного генофонда березы. Сама же коллекция (ювенильность и регенерационная способность, которой поддерживается на достаточно высоком уровне) представляет интерес для решения целого ряда научных вопросов, дает возможность селекционерам востребовать в нужный момент ценный генетический материал, служит основой для массового тиражирования взрослых деревьев при их внедрении в практику.

Выводы

Для получения посадочного материала и создания специализированных плантаций с обычным для карельской березы сроком проявления признаков узорчатости, можно использовать длительное (свыше 18 лет) непрерывное культивирование коллекции клонов по предлагаемой нами методике [2]. Для раннего проявления признаков узорчатости древесины у клона каллусного происхождения (что позволит получать ценную древесину в более сжатые сроки) длительность культивирования не должна превышать один – три года.

Длительное культивирование в условиях *in vitro* можно рассматривать не только как один из современных подходов сохранения *ex situ* коллекций ценных генотипов карельской березы, но и как удобную модель для изуче-

ния природы и механизмов формирования узорчатости древесины, на которые до сих пор нет единого мнения, несмотря на обилие существующих гипотез.

Литература

1. *Ruynanen L., Aronen T.* Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*) // Plant Cell., Tissue and Organ Culture. – 2005. – 83. – P. 21-32.

2. *Chmielarz P., Michalak M.* Cryopreservation of genetic resources of forest tree species // Наука о лесе XXI века. – Гомель : Ин-т леса НАН Беларуси, 2010. – С. 109-112.

3. *Высоцкий В.А.* О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур // Сельскохозяйственная биология.- 1995.- № 5.- С. 57-63.

4. *Hao Yu-Jin, Xiu-Xin Deng.* Occurrence of chromosomal variation and plant regeneration from long-term-cultured citrus callu // *In Vitro Cellular & Developmental Biology* – Plant. – 2002. – Vol. 38. – P. 472 – 476.

5. *Кузнецова О.И., Аи О.А., Гостимский С.А.* Гостимский Изучение влияния продолжительности культивирования каллусов на накопление генетических изменений у регенерантов гороха (*Pisum sativum L.*) // Генетика. – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 684-692.

6. *Smykal P., Valledor L., Rodriguez R., Griga M.* Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* shoot culture of pea (*Pisum sativum L.*) // Plant Cell Rep. – 2007. – Vol. 26, №11. – P. 1985 – 1998.

7. *Сафразбекян С.А., Урманцева В.В., Катаева Н.В.* Роль сахарозы в регуляции морфогенеза каперса *in vitro* // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений – М.: Наука, 1991.- С.192-197.

8. *Концевая И.И.* Длительное хранение микрорастений березы в культуре *in vitro* // Лесоведение. – 2009. – №5. – С. 50-56.

9. *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.

10. *Бутова Г.П., Табацкая Т.М., Скрובהва Л.Л.* Способ микрклонального размножения карельской березы: А. с. N 1597386 (СССР) // Б.И. 1990, N 37.

11. *Табацкая Т.М, Машкина О.С., Щетинкин С.В.* Технология *in vitro* в создании плантационных культур карельской березы // Генетика и селекция – на службе лесу. – Воронеж : НИИЛГиС, 1997. – С. 63-66.

12. *Буторина А.К.* О природе узорчатости древесины у карельской березы // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов. – Воронеж: НИИЛГиС, 1993. С.40 – 47.

13. *Самсонова А.Е., Машкина О.С., Табацкая Т.М.* Физиолого-биохимические аспекты длительного культивирования карельской березы // Достижения и проблемы лесной генетики и селекции : сб науч. тр. — Воронеж, 2010. — С. 53-68 .

Резюме

Показано, что длительное (свыше 18 лет) субкультивирование (с интервалом раз в 6 месяцев) в условиях *in vitro* на питательных средах без гормонов является эффективным подходом сохранения *ex situ* коллекции ценных генотипов карель-

ской березы, а также удобной моделью для изучения процессов морфогенеза, механизмов проявления узорчатости древесины при вегетативном размножении.

Показано, что тривале (більше 18 років) субкультування (з інтервалом один раз на 6 місяців) в умовах *in vitro* на поживних середовищах без гормонів є ефективним підходом збереження *ex situ* колекції цінних генотипів карельської берези, а також зручною моделлю для вивчення процесів морфогенезу, механізмів прояву візерунчатості деревини при вегетативному розмноженні.

It is shown that long-term (over 18) subcultivation (with interval – once every 6 months) *in vitro* conditions on nutrient media without hormones is an effective method for preservation *ex situ* collection of valuable genotypes of Karelian birch. It is also a good model for study of morphogenesis processes, mechanisms of display of figured wood at vegetative propagation.

МЕЛИХОВА Г.И.

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, пгт. Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ

Получение культуры каллуса нередко служит одним из промежуточных этапов клонального микроразмножения многих хозяйственно важных плодовых культур, трудно размножаемых традиционным путём [3]. Одной из таких культур является маслина европейская (*Olea europaea* L.), плоды и масло которой обладают высокой пищевой ценностью. В средиземноморских странах размножение маслины при помощи методов культуры *in vitro* применяется в промышленных масштабах для более чем 50 местных сортов [7].

Коллекция Никитского ботанического сада насчитывает 228 сортов и гибридов маслины, что делает её одной из крупнейших в СНГ. Сорта крымской селекции идеально приспособлены к условиям Южного берега Крыма, отличаются морозостойкостью и ранним сроком созревания плодов [2]. Для разработки высокоэффективных и экономически обоснованных методов микроразмножения этих сортов требуется подробное исследование их морфогенетических реакций на разных этапах культивирования *in vitro*.

Цель нашей работы – выявление морфогенетического потенциала органов и тканей ценных сортов маслины в условиях *in vitro*. В задачи настоящего исследования входил подбор условий, оптимальных для получения и поддержания каллусной культуры этих сортов, а также изучение особенностей их морфогенеза на средах с разной концентрацией регуляторов роста.

Материалы и методы

Объектами исследования служили перспективные сорта маслины из коллекционных насаждений НБС – ННЦ. Два сорта селекции НБС (Никит-

ская и Никитская Крупноплодная), а также один сорт кавказского происхождения – Толгомская.

В качестве эксплантов использовали листья, взятые с микробоггов, культивируемых *in vitro*, а также сегменты микробоггов длиной 0,7-1,1 см. Листья отделяли и надрезали скальпелем по краям, а затем экспланты переносили на агаризованную среду Мурасиге и Скуга [6], дополненную тидиазуроном (ТДЗ) в 5 разных концентрациях – 1-11 мкМ. Субкультивирование эксплантов на свежую питательную среду осуществляли каждые 4 недели.

Пробирки с эксплантами помещали в культуральную комнату с температурой $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000-3000 лк (белый свет). Образовавшийся каллус культивировали на свету либо в темноте.

Обработку результатов экспериментов проводили при помощи методов статистического анализа: методы первичной статистической обработки, однофакторного дисперсионного анализа [1]. В таблицах приведены средние арифметические и ошибки репрезентативности. Повторность опыта была не менее шестикратной.

Результаты и обсуждение

Для получения каллусной культуры маслины в качестве эксплантов могут быть использованы листья, листовые черешки, семядоли, сегменты побега [4, 5]. В наших опытах по индукции каллусообразования из листьев и сегментов побега на средах с тидиазуроном способность эксплантов к морфогенезу зависела от их происхождения. Так, из тканей листового черешка наблюдали более интенсивное образование каллуса, чем из листовой пластинки или стебля, что согласуется с имеющимися литературными данными. Количество центров меристематической активности составляло 1-7 шт. на эксплант.

Итальянские исследователи индуцировали прямой и непрямой органогенез в культуре вегетативных органов сортов Moraiolo, Dolce Agogia и Halkidikis, используя в качестве регулятора роста ТДЗ в концентрациях от 5 до 40 мкМ [5]. Среди испытанных нами вариантов среды каллусогенез в культуре листьев сортов Никитская и Никитская Крупноплодная наблюдали при концентрации 3-9 мкМ, а у сорта Толгомская – 6-11 мкМ. Каллус ярко-зелёной или желтоватой окраски формировался из основания листового черешка, а также в местах разрезов на листовой пластинке. При слишком высоких и слишком низких концентрациях цитокинина в питательной среде листья темнели и отмирали в течении недели от начала эксперимента без признаков морфогенеза. Высокой частотой образования каллуса (100%) обладали листовые экспланты сорта Толгомская на среде, содержащей 11 мкМ ТДЗ (табл. 1).

Таблица 1

Влияние концентрации ТДЗ в питательной среде на морфогенез *in vitro* листьев 3 сортов маслины

Сорт	Концентрация ТДЗ, мкМ	Частота образования каллуса, %	Размеры каллуса спустя 4 недели культивирования, см		Продолжительность сохранения каллусом жизнеспособности, сут.
			диаметр	толщина	
Никитская	1	0	-	-	-
	3	75	0,19±0,03	0,15±0,05	28
	6	75	0,29±0,03	0,21±0,04	28
	9	50	0,41±0,05	0,27±0,02	189
	11	0	-	-	-
Никитская Крупно- плодная	1	0	-	-	-
	3	75	0,60±0,04	0,25±0,04	28
	6	40	0,42±0,03	0,28±0,05	35
	9	50	0,24±0,06	0,16±0,02	28
	11	0	-	-	-
Толгомс- кая	1	0	-	-	-
	3	0	-	-	-
	6	60	0,23±0,03	0,15±0,02	42
	9	70	0,30±0,04	0,25±0,03	42
	11	100	0,32±0,03	0,20±0,02	175

Кроме того, в культуре сегментов микропобега сорта Никитская отмечали образование каллуса на средах, содержавших 3 и 11 мкМ ТДЗ. Каллус формировался в базальной части микропобега, имел округлую форму и ярко-зелёную окраску. Скорость роста каллуса в этих случаях в течении первых 2 месяцев культивирования существенно не отличалась, однако в дальнейшем наблюдали замедление и прекращение его роста на среде, содержащей 11 мкМ цитокинина. Таким образом, оптимальная концентрация ТДЗ для поддержания каллусной культуры, полученной из сегментов микропобега данного сорта, была ниже, чем для каллуса, полученного из листьев. Результаты каллусообразования у сорта Никитская представлены в таблице 2.

Реализация морфогенетических потенций эксплантов зависела также от условий культивирования. При выращивании на свету каллус исследуемых сортов был компактным, зелёной окраски с белыми или желтоватыми участками, в то время как в темноте формировался каллус уплощённой формы, лишённый пигментации. В течение недели происходило интенсивное позеленение каллуса, полученного в темноте, при переносе его на свет

Динамика роста каллусов сорта Никитская разного происхождения

Тип экспланта	Концентрация ТДЗ, мкМ	Диаметр каллуса, см		
		1 месяц	2 месяца	3 месяца
Лист	3	0,19±0,03	-	-
	6	0,29±0,03	-	-
	9	0,41±0,05	0,50±0,04	0,80±0,05
Сегмент побега	3	0,39±0,06	0,51±0,05	0,73±0,08
	11	0,40±0,03	0,45±0,02	0,52±0,04

Разделение каллусных конгломератов на сектора перед переносом на свежую среду приводило к потемнению на месте среза и приостановке их роста, а у сорта Никитская Крупноплодная – к гибели экспланта в течение 3-4 суток.

Ни в одном из случаев органогенеза добиться не удалось. При культивировании на свету у сортов Толгомская и Никитская на поверхности каллуса, контактирующего с агаризованной средой, наблюдали образование шаровидных структур диаметром 2-3 мм, которые далее не дифференцировались. При использовании сегментов микропобега в качестве эксплантов пазушные почки не развивались, и только у сорта Никитская в одном из случаев наблюдали формирование пазушного микропобега с удлинёнными междоузлиями, который спустя 4 месяца культивирования был полностью покрыт каллусом.

Таким образом, дольше всего – 175 суток и более – сохранял жизнеспособность каллус, образовавшийся из листьев и сегментов побега сорта Никитская на среде с 9 мкМ ТДЗ, а также каллусная культура, полученная из листьев сорта Толгомская на среде с 11 мкМ ТДЗ. В остальных случаях спустя 4-6 недель происходило отмирание каллусных клеток, начиная с центра. Поскольку тидиазурон не дал ожидаемого эффекта, необходимо продолжать эксперименты по индукции органогенеза в культуре органов и тканей маслины с применением других регуляторов роста.

Выводы

Способность эксплантов маслины к морфогенезу *in vitro* зависела от генотипа, типа экспланта, концентрации регулятора роста (тидиазурана) в питательной среде и светового режима.

Выявлено, что для получения и поддержания каллусной культуры сорта Толгомская необходима более высокая концентрация ТДЗ, чем для сортов Никитская и Никитская Крупноплодная.

Литература

1. *Лакин Г.Ф.* Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
2. *Мязина Л.Ф.* Состояние генофонда и селекционный потенциал маслины в Никитском ботаническом саду // Проблемы формирования генетических коллекций

плодових, ягодних культур и перспективы их селекционного использования: Мат. XXI Мичуринских чтений, 28-30 октября 2002. – Мичуринск. – 2002. – С. 47-48.

3. Litz R.E., Jarret R.L., Asokan H.P. Tropical and subtropical fruits and vegetables // Tissue culture as a plant production system for horticultural crops / Ed. Zimmerman R. H., Griesbach T. A., Hammerslag F. A., Lawson R. H. – Nijhof: Dortrecht etc. – Netherlands. – 1986. – P. 237-251.

4. Mencuccini M., Corona C., Mariotti D. Plant regeneration and first attempt of *in vitro* genetic improvement of olive (cv. Moraiolo) // Acta Hort. – 1992. – № 300. – P. 261-264.

5. Mencuccini M., Rugini E. *In vitro* shoot regeneration from olive cultivars tissues // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1993. – Vol. 32. – №3. – P. 283-288.

6. Murashige T., Skoog F.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – №3. – P. 473-497.

7. Rugini E., Gutierrez-Pesce P. Genetic improvement of olive // Pomologia Croatica. – 2006. – Vol. 12. – Br. 1. – P. 43-74.

Резюме

Получена каллусная культура трёх сортов *Olea europaea* L. селекции НБС-ННЦ. Показано влияние тидиазурана на каллусообразование в условиях *in vitro*.

Одержана калусна культура трьох сортів *Olea europaea* L. селекції НБС-ННЦ. Показаний вплив тїдіазурону на калусоутворення в умовах *in vitro*.

The callus culture of three *Olea europaea* L. cultivars, bred by NBS-NSC, has been obtained. The influence of tidiazuron on their callusogenesis *in vitro* has been showed.

МИТРОФАНОВА І.В., ІВАНОВА Н.М.

Нікітський ботанічний сад – Національний науковий центр, Україна, 98648
AP Крим, м. Ялта, смт. Нікіта, e-mail: in_vitro@ukr.net

ВИКОРИСТАННЯ РЕТАРДАНТІВ ДЛЯ ЗБЕРЕЖЕННЯ В УМОВАХ IN VITRO ЦІННОГО РОСЛИННОГО ГЕНОФОНДУ

Збереження генофонду рослин сьогодні є світовою проблемою. Потребують збереження не тільки культурні рослини, а й рідкісні та зникаючі види, занесені до Червоної книги, кількість яких з року в рік збільшується. Разом з цим не виключено, що дикі види можуть виявитися в майбутньому дуже необхідними люду або навіть врятувати його від загибелі. Вся діяльність зі збереження видів і сортів рослин базується на цілому ряді програмних документів, прийнятих за останні два десятиліття, таких як «Конвенція про біологічне різноманіття» [1], «Global Strategy Plant Conservation, 2002» [2], «Міжнародна програма ботанічних садів з охорони рослин» [3] та інші.

Основним завданням ботанічних садів у збереженні біологічного різноманіття є комплексне вивчення та збереження генетичних ресурсів шляхом поповнення й підтримання колекцій живих рослин, а також розроблення оптимальних режимів тривалого депонування експлантів, що забезпечують їхню життєздатність і стабільність. Об'єктами колекцій, що

створюються, є цінні й корисні види рослин, а також рідкісні та зникаючі види.

В останні роки широко вивчається дія осмотиків і ретардантів на припинення росту рослин в умовах *in vitro* при їх тривалому збереженні [4-6]. Так, депонування картоплі при низьких позитивних температурах призвело до зниження рівня життєздатності експлантів при культивуванні на поживних середовищах, що містять у своєму складі маніт концентрацією 6% та абсцизову кислоту (АБК) концентрацією 5 г/л порівняно з контролем [7]. Є ряд відомостей про те, що використання маніту при депонуванні рослин *in vitro* спричиняє морфологічні відхилення [8]. Однак комбінування зниженої температури й ретардантів виявилось сприятливим для тривалого збереження ряду сільськогосподарських культур [9].

Метою цієї роботи було вивчення особливості впливу АБК і ССС на експланти декоративних, субтропічних і кісточкових плодкових культур при тривалому депонуванні в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи

Для збереження цінних генотипів декоративних, субтропічних і кісточкових плодкових культур як первинні експланти використовували вегетативні бруньки, мікропагони, соматичні зародки, протокорми і листкові диски безвірусних рослин троянди, орхідей, ломиносу, фейхоа, ківі, аличі, сливи, абрикоса, які культивуються *in vitro*. У роботі дотримувалися загальноприйнятих біотехнологічних методів [10]. В експериментах були використані різні модифіковані поживні середовища: Murashige, Skoog (МС) [11], Gamborg, Eveleigh (B5) [12], Quoirin, Lepeivre (QL) [13] і Кнудсона С (1925) [14]. Для уповільнення ростових процесів у поживні середовища вводили такі інгібітори росту: АБК (виробництво “Sigma”, США) – 5-10 мг/л; хлорхолінхлорид, або Cusocel 720 (ССС) (виробництво “BASF”, Німеччина) – 0,2-1,2 г/л. Попередні дослідження зі збереження в умовах *in vitro* експлантів плодкових і декоративних культур проводили при різному температурному режимі (2-12°C) і відсутності освітлення або при інтенсивності освітлення 3,75 мкМ м⁻² с⁻¹. Для тривалого збереження рослин їх культивували у холодильній камері (при знижені інтенсивності освітлення 3,75 мкМ м⁻² с⁻¹). Рослинний матеріал оцінювали через 3, 6, 12, 24, 36 місяців культивування за допомогою якісних і кількісних характеристик експлантів, що були на депонуванні за варіантами дослідження (життєздатність, довжина мікропагона, кількість міжвузлів тощо). Для опрацювання даних використовували програму STATISTICA for Windows, 6.0 (StatSoft, Inc. 1984-2001).

Результати та обговорення

Вивчення морфогенетичних потенцій експлантів декоративних, субтропічних і кісточкових плодкових рослин показало, що культури органів і тканин мають високу швидкість росту, і для їх нормального розвитку необхідні часті пасажи. Так, плодові культури необхідно субкультивувати на

свіже поживне середовище кожні 15-20 діб. При цьому експланти троянди можна субкультивувати кожні 30-40 діб залежно від генотипу. Відомо, що після пересадки на свіже поживне середовище перед поновленням росту культура входить у лаг-фазу, а після періоду росту (експонентного) переходить у стаціонарну фазу, що викликано вмістом одного або більше поживних речовин, які лімітують ріст. Як у лаг-фазі, так і в стаціонарній фазі культура піддається стресам, і це може призвести до втрати фізіологічної стабільності.

Як речовини, що сповільнюють ріст рослин, нами були використані ретарданти АБК і ССС. В процесі досліджень встановлено залежність зміни кінетики росту і життєздатності експлантів від концентрації ретардантів у поживному середовищі. Так на рисунку 1-2 показані результати застосування АБК.

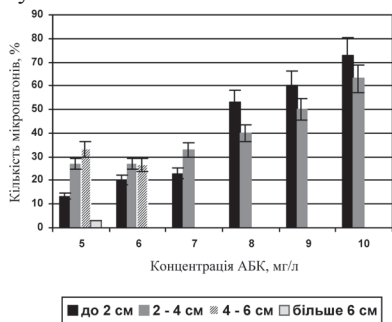


Рис. 1. Залежність зміни кінетики росту мікропагонів ломиносу від концентрації АБК у поживному середовищі при 24-місячному депонуванні *in vitro*

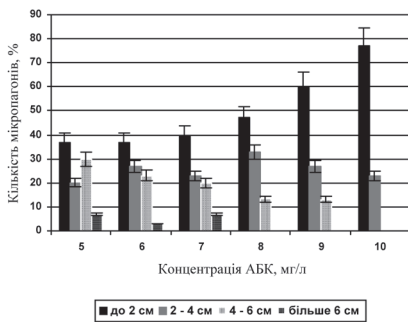


Рис. 2. Залежність зміни кінетики росту мікропагонів троянди від концентрації АБК у поживному середовищі при 24-місячному депонуванні *in vitro*

Оцінювання рослинного матеріалу проводили за кількістю мікропагонів ломиносу та троянди, що зберігаються в холодильних камерах протягом 6-12 місяців і мають певний розмір (до 2 см, 2-4 см, 4-6 см і більше 6 см). Встановлено, що низькі концентрації АБК не ефективні для тривалого збереження експлантів ломиносу і троянди тому, що при них відбувається активний ріст мікропагонів. Додавання в поживне середовище АБК в концентрації 9 і 10 мг/л сприяло вповільненню росту мікропагонів, і кількість життєздатних мікропагонів сягала 60-78%. Поряд із цим, спостерігали індукцію адвентивного пагоноутворення.

Введення в поживне середовище ССС сприяло вповільненню росту експлантів у 2,5-3 рази порівняно з контролем. На рисунках 3-4 показано результати зміни кінетики росту експлантів ломиносу. Введення у поживне середовище 0,8 – 1,2 г/л ССС значно знижувало довжину мікропагонів і кількість

міжвузль. Однак, високі концентрації ССС знижували життєздатність як соматичних зародків, так і мікропагонів. Крім того, було відмічено, що товщина мікропагона також збільшувалася. У зв'язку з цим, у подальших експериментах використовували ССС у концентрації 0,4 г/л.

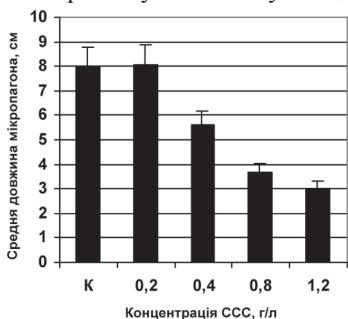


Рис. 3. Залежність росту мікропагонів ломиносу від концентрації ССС в поживному середовищі при 12-місячному депонуванні в умовах *in vitro*

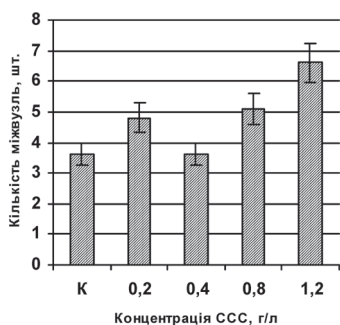


Рис. 4. Вплив концентрації ССС у поживному середовищі на кількість міжвузль у мікропагонів ломиносу при 12-місячному депонуванні в умовах *in vitro*

Поряд з цим, було встановлено, що експланти ломиносу, троянди, фейхоа, ківі розвивали мікропагони довжиною 0,6-3 см, при цьому кількість міжвузль сягала в середньому 4,5 на експлант. Кінетика росту сповільнювалася в 3-4 рази. Мікропагони аличі та абрикоса збільшувалися в 1,2 разу. Високі концентрації ССС (0,8-1,2 г/л) у більшості рослин знижували життєздатність експлантів (табл.).

Таблиця

Життєздатність експлантів (%) декоративних і плодкових культур на поживних середовищах з різними концентраціями ССС

Генотип	Концентрація ССС, г/л					
	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2
Троянда	100	100	100	100	90	80
Ломиніс	100	100	100	100	90	85
Орхідеї	100	100	100	95	90	80
Фейхоа	70	50	30	20	20	15
Ківі	80	70	45	20	15	15
Алича	100	100	90	80	60	50
Абрикос	100	90	80	70	50	30

У цих умовах 80-85% мікропагонів фейхоа і ківі гинули. Найбільш життєздатними виявилися експланти ломиносу, орхідеї і троянди. Навіть при високих концентраціях ССС у поживному середовищі рівень їхньої життєздат-

ності не знижувався нижче за 80-85%. Крім того, додавання в середовище 0,8 г/л ССС активізувало процеси дедиференціації й калусоутворення в базальній частині експлантів. На середовищі, що містить 1,0 г/л ССС, у основі мікропагонів ломиносу і троянди формувалося коріння. Скринінг досліджуваних видів і сортів, що були під впливом низьких позитивних температур і ретарданту ССС, дозволив визначити серед них такі, які мають найбільш високий рівень життєздатності. Було визначено, що вплив стресу проявився у ломиносу, троянди, фейхоа і ківі появою в експлантів антоціанового забарвлення.

Висновки

На основі отриманих результатів можна зробити висновок про ефективність застосування ретардантів у процесі депонування *in vitro* декоративних рослин і плодкових культур. Встановлені оптимальні концентрації ССС у поживному середовищі, при яких рівень життєздатності експлантів досягав 50-100% і кінетика росту значно знижувалась.

Література

1. Конвенция о биологическом разнообразии: Текст и прил. // NEP/CBD/ COP/8/12. – 2006. – 38 с.
2. Конвенция о биологическом разнообразии. Доклад о сохранении растений: Обзор достижений в рамках реализации Глобальной стратегии сохранения растений (ГССР). – Секретариат Конвенции о биологическом разнообразии: Montreal: Canada. – 2009. – 48 с.
3. Международная программа ботанических садов по охране растений // Международный совет ботан. сад. по охране растений: Botanic Gardens Conserv. Intl. – М., 2000. – 57 с.
4. Engelmann F. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources // Acta Horticulture. – 1997. – N 447. – P. 471-475.
5. Withers L.A., Engels J.M.M. The test tube genebank – a safe alternative to field conservation // IBPGR Newsletter for Asia and the Pasific. – 1990. – N 3. – P. 1-2.
6. Митрофанова И.В., Кондратенко О.В. Збереження в культурі *in vitro* мініатюрних троянд / Бюл. Никит. ботан. сада. – 2004. – Вып. 90. – С. 77-80.
7. Lizzaraga R., Huoman Z., Dodds H.J. *In vitro* conservation of potato germplasm at the international potato center // American potato journal. – 1989. – V. 66, N 4. – P. 253-269.
8. Wanas W.H. *In vitro* storage of proliferated rootstock shoot-tip cultures // Annals Agric. Sci. Ain Shams Univ. Cairo. – 1992. – V. 37, N 2. – P. 501-510.
9. Митрофанова И.В. Создание медленно растущих коллекций *in vitro* ценного растительного генофонда в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре // Интродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках: Матеріали Міжнар. наук. конф., Київ, 15-17 вересня 2010 р. – Київ, 2010. – С. 611-613.
10. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V.15, N 3. – P. 473-497.

12. *Gamborg O.L., Eveleigh D.E.* Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* – 1968. – V.46, N 5. – P. 417-421.
13. *Quoirin M., Lepoivre P.* Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus* // *Acta Hort.* – 1977. – V. 78. – P. 437-442.
14. *Knudson L.* Physiological study of the symbiotic germination of orchid seeds // *Bot. Gaz.* – 1925. – V.79, N 5. – P. 341-348.

Резюме

На основі проведених досліджень показано можливість застосування ретардантів АБК і ССС для депонування експлантів декоративних і плодкових культур. Визначено оптимальні концентрації ретардантів у поживному середовищі.

На основе проведенных исследований показана возможность использования ретардантов АБК и ССС для депонирования эксплантов декоративных и плодовых культур. Определены оптимальные концентрации ретардантов в питательной среде.

On the base of investigation the possibilities of retardants ABA and CCC for conservation of explants in ornamental plants, temporal and subtropical fruits have been demonstrated. The optimal retardant concentration in culture medium have been determined.

НОВАК Т.В., ТКАЧУК В.А., БАЛАН О.Д., СУЛИМА Н.М.

*Національний університет біоресурсів і природокористування України
Україна, 03041, м. Київ – 41, вул. Героїв Оборони, 15*

ПРОГНОЗ ЕКОНОМІЧНИХ НАСЛІДКІВ ВИРОЩУВАННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ

Необхідною складовою визначення економічної ефективності в рослинництві є такі показники, як площа вирощування та урожайність. Дані Державного комітету статистики свідчать про стрімкі темпи росту площ вирощування кукурудзи і сої, які мають стабільну позитивну динаміку. Так, посівні площі під соєю у 2010 році становили 1048,0 тис. га, що майже у 8 разів більше порівняно з 1990 р. Посівні площі під кукурудзою в Україні за період 2006-2010 рр. збільшилися з 1720,3 до 2647,7 тис. га [1-3].

У процесі вивчення досвіду вирощування генетично модифікованих культур в зарубіжних країнах було встановлено, що однією із їхніх переваг є зменшення витрат на виробництво. На основі прогнозного аналізу, нами зроблено спробу провести розрахунок можливого економічного ефекту від застосування генетично модифікованих сільськогосподарських культур в Україні. Виходячи з цього, нами було здійснено аналіз собівартості виробництва досліджуваних сільськогосподарських культур відповідно до технологій, що застосовуються в Україні.

Матеріал і методи

Основною представлених розрахунків є дані офіційної статистичної звітності, які були скореговані відповідно до переваг застосування нових технологій. На основі усередненого показника виробничої собівартості за традиційних технологій та очікуваній собівартості при інноваційній техно-

логії (яка передбачає вирощування генетично модифікованих рослин, ГМ) нами проведено порівняння виробничих витрат, що припадають на одиницю площі при вирощуванні кукурудзи на зерно та сої.

Прогноз економічної ефективності вирощування ГМ культур будували на виокремленні трьох технологій вирощування аналізованих культур:

екстенсивній – у підприємствах, які мають недостатню забезпеченість засобами виробництва і використовують традиційні методи вирощування;

інтенсивній – у підприємствах з високим фінансово-технологічним забезпеченням і які використовують сучасні технології, високопродуктивну техніку, прогресивні методи організації праці тощо;

інноваційній – прогнозованій, при можливому вирощуванні ГМ культур

Зроблено розрахунки економічної ефективності впровадження генетично модифікованих культур за чотирма варіантами можливого розвитку подій. Для прогнозних розрахунків прийнято середнє значення площі посівів культур в масштабах України:

1-й варіант – при використанні 10% посівної площі (202,1 тис. га під генетично модифікованою кукурудзою на зерно і 61,2 тис. га – під генетично модифікованою соєю);

2-й варіант – 15 % (303,2 тис. га та 91,8 тис. га відповідно);

3-й варіант – 20 % (404,2 тис. га та 122,4 тис. га відповідно);

4-й варіант – 30 % (606,3 тис. га та 183,6 тис. га відповідно).

Результати і обговорення

При порівнянні виробничих витрат, що припадають на одиницю площі при вирощуванні кукурудзи на зерно та сої (табл. 1), встановлено, що при вирощуванні кукурудзи на зерно можливе зменшення витрат з 2547,7 грн/га до 2527,3 грн/га, а при вирощуванні сої – з 2115,8 грн/га до 2050,3 грн/га. Така економія досягається за рахунок зменшення витрат на оплату праці, засоби захисту рослин та паливно-мастильні матеріали.

Виходячи з того, що економія матеріально-грошових витрат визначена з розрахунку на 1 гектар, загальна її сума залежатиме від розмірів посівних площ. За такою ж методикою кожне сільськогосподарське підприємство може розрахувати в конкретних виробничих умовах економічну доцільність застосування генетично модифікованих культур залежно від технологічних можливостей, площ вирощування, сівозмін, фітосанітарного стану полів тощо.

Дослідженнями встановлено, що на рівень результативного показника (умовний прибуток) впливають урожайність сільськогосподарських культур, ціна реалізації та витрати. При цьому допускаємо, що обидві технології передбачають використання високопродуктивного насіння з жорстким дотриманням технологічних вимог вирощування, які впливають на якість продукції, що значною мірою формує реалізаційну ціну. Але при вирощуванні кукурудзи за інноваційною технологією рівень урожайності буде ви-

Таблиця 1

Порівняльний аналіз виробничої собівартості сої і кукурудзи за традиційними технологіями та очікуваній собівартості при вирощуванні генетично модифікованих культур (інноваційна технологія), грн/га

	Соя		Кукурудза	
	усереднений показник	інноваційна технологія	усереднений показник	інноваційна технологія
Оплата з нарахуваннями	252,8	248,3	247,7	216,4
Матеріальні витрати, у т.ч.:	1770	1659,9	2240,7	2261,4
- насіння і посадковий матеріал	253,56	293,6	443,7	513,3
- міңдобрива	230	230,0	620	680,0
- засоби захисту рослин	568	468	310	312
- ПММ	524,65	375,5	523,5	466,1
- електроенергія	4,3	27,3	40,5	46
- ремонт	64,5	93,3	67	61
- послуги сторонніх організацій	125	172,2	236	183
Амортизація	51,6	93,3	38	31
Інші	41,4	48,8	21,25	18,5
Разом	2115,8	2050,3	2547,7	2527,3

Таблиця 2

Показники економічної ефективності за різних технологій вирощування сільськогосподарських культур

Культури	Технологія	Урожайність, ц/га	Ціна реалізації, грн./т	Вартість продукції, грн./га	Виробничі витрати, грн./га	Виробнича собівартість 1 ц, грн.	Умовний прибуток, грн./га	Розрахунковий рівень рентабельності, %
Кукурудза	Екстенсивна	39	650,0	2535	2493,7	63,941	41,3	1,7
		42	650,0	2730	2493,7	59,374	236,3	9,5
		45	650,0	2925	2493,7	55,416	431,3	17,3
	Інтенсивна	55	750,0	4125	2601,6	47,302	1523,4	58,6
		60	750,0	4500	2601,6	43,36	1898,4	73,0
		70	750,0	5250	2601,6	37,166	2648,4	101,8
	Інноваційна	55	750,0	4125	2527,3	45,951	1597,7	63,2
		60	750,0	4500	2527,3	42,122	1972,7	78,1
		70	750,0	5250	2527,3	36,104	2722,7	107,7

Культури	Технологія	Урожайність, ц/га	Ціна реалізації, грн./т	Вартість продукції, грн./га	Виробничі витрати, грн./га	Виробнича собівартість 1 ц, грн.	Умовний прибуток, грн./га	Розрахунковий рівень рентабельності, %
Соя	Екстенсивна	12,5	2400	3000	2103,2	168,26	896,8	42,6
		14	2400	3360	2103,2	150,23	1256,8	59,8
		16	2400	3840	2103,2	131,45	1736,8	82,6
	Інтенсивна	18	2600	4680	2128,4	118,25	2551,6	119,9
		20	2600	5200	2128,4	106,42	3071,6	144,3
		25	2600	6500	2128,4	85,136	4371,6	205,4
	Інноваційна	18	2600	4680	2050,3	113,91	2629,7	128,3
		20	2600	5200	2050,3	102,52	3149,7	153,6
		25	2600	6500	2050,3	82,012	4449,7	217,0

щим на 15% за рахунок зменшення втрат врожаю від шкідників. Наочне порівняння зростання суми умовного прибутку зображено на рис. 1 і 2.

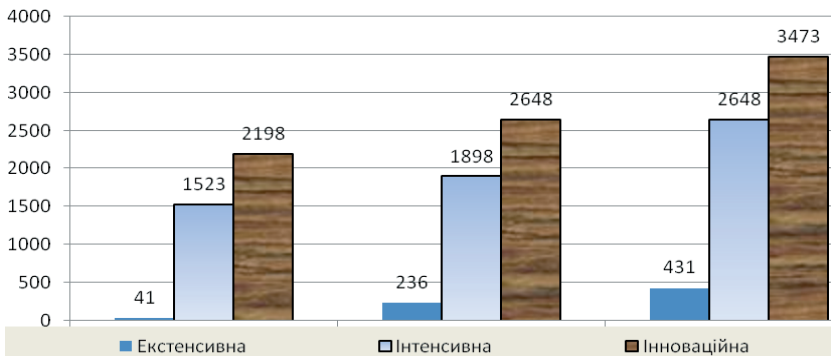


Рис. 1. Прибуток від вирощування кукурудзи за різних технологій, грн/га

Висновки

Встановлено, що при вирощуванні досліджуваних культур збільшуються рівень урожайності та ціна реалізації за умови застосування інтенсивної й інноваційної технологій, витрати зменшуються, умовний прибуток зростає. Таким чином, зміна суми умовного прибутку за різних технологій очевидна, особливо при застосуванні інноваційної технології.

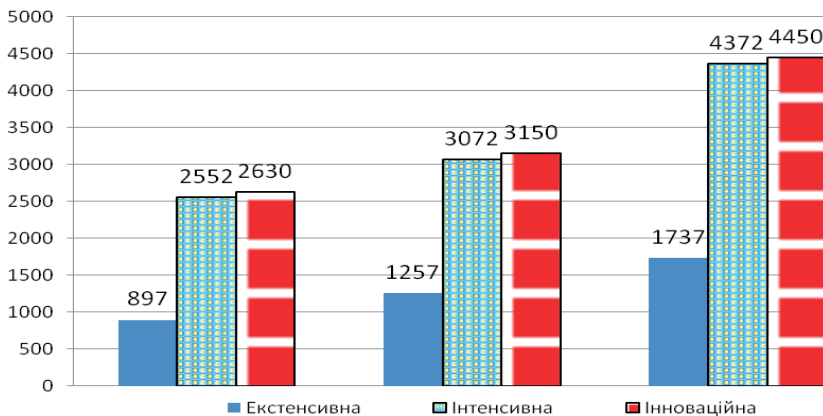


Рис. 2. Прибуток від вирощування сої за різних технологій, грн/га

Література

1. Державний комітет статистики України. Рослинництво України. Статистичний збірник. м. Київ – 2009

2. Каленська С.М., Танчик С.П., Зозуля О.Л., Мокрієнко В.А., Жемойда В.Л. Технологія вирощування та захисту кукурудзи. Практичні рекомендації. – К.: «Колодіг».- 2004.- С. 14-15.

3. Каленська С.М., Танчик С.П., Зозуля О.Л., Мокрієнко В.А., Жемойда В.Л. Технологія вирощування та захисту сої. Практичні рекомендації. – К.: «Колодіг».- 2004.- С. 14-15.

Резюме

Прогнозні дослідження свідчать про те, що використання генетично модифікованих сільськогосподарських культур дозволяє збільшити урожай, зменшити виробничі витрати, підвищити рівень рентабельності.

Прогнозные исследования свидетельствуют о том, что использование генетически модифицированных сельскохозяйственных культур позволяет увеличить урожай, уменьшить производственные издержки, повысить уровень рентабельности.

The forecasting researches prove that utilizing of GM agricultural crops decreases the cost of production and increases the yield and profitability.

ОВЕРЧЕНКО В.В., КЛЮВАДЕНКО А.А., МЕЛЬНИЧУК М.Д.

Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: overv@i.ua

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПРИЙОМИ ОТРИМАННЯ ВИСОКОЯКІСНОГО ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (*HUMULUS LUPULUS L.*)

Першочерговою передумовою одержання високих врожаїв хмелю звичайного (*Humulus lupulus L.*) є отримання і впровадження у виробниц-

тво високоякісного садивного матеріалу з високою сортоспецифічністю та вільного від патогенів, зокрема вірусної природи [1, 2]. Патогени вірусної природи найбільшою мірою поширені на рослинах хмелю, які уражують їх у різних формах [3, 4]. Найвірулентніші штами вірусів, що уражують хміль в Україні, відносять до груп Parvivirus, Nepovirus та Carlavirus. Зовнішні симптоми, які проявляють уражені рослини хмелю дуже різноманітні і можуть бути чітко виражені і зовсім слабкими. Проте деякі рослини і навіть сорти та лінії хмелю є безсимптомними носіями вірусів, що локалізовані у латентній формі. До них відносять латентний вірус хмелю, який є надзвичайно вірулентним і призводить до значних втрат врожаю та погіршення якості шишок хмелю [5, 6].

Метод клонального мікророзмноження переважно розглядається як можливість вегетативного розмноження рослин та їх оздоровлення в умовах *in vitro* [7, 8, 9]. Але коло використання його в останні роки значно розширено для клонової селекції, кріозбереження, створення генобанку рослин та отримання трансгенного матеріалу. Особливо важливим етапом технології вирощування є укорінювання та адаптація до умов хмелеплантацій (*in vivo*). У разі запровадження ефективної біотехнології розмноження можливо прискорити селекційний процес, отримати генетично однорідний і оздоровлений посадковий матеріал, зменшити тривалість ювенільної фази та втрати врожаю хмелю [2, 9].

До нинішнього часу в Україні практично не існувало високоточних і високоефективних молекулярних діагностикумів для детекції та ідентифікації вірусів, які уражують хміль. Особливої уваги привертає питання створення високоточної тест-системи для ідентифікації ЛВХ, якого важко діагностувати із-за відсутності зовнішніх симптомів ураження, надаючи, при цьому, карантинний сертифікат при реєстрації нових сортів хмелю чи при реалізації посадкового матеріалу. Саме тому, вирішення питання молекулярної ПЛР-діагностики ЛВХ відкриває можливості ефективно проводити його діагностику і створювати, як донорні плантації для масового розмноження перспективних сортів, а також якісно проводити реєстрацію нових та інтродукованих сортів хмелю в Україні.

Диференціація і ідентифікація сортів, ліній і гібридів сільсько-господарських рослин є важливим елементом селекції, насінництва та актуальною у захисті авторських прав на сорти. Впровадження молекулярних методів прикладної вірусології і біотехнології, поряд з існуючими методами ідентифікації сортів рослин, дозволяє істотно їх доповнити та скоротити строки ідентифікації сорту за незначної потреби рослинного матеріалу (листки, корені, стебла, тощо), на будь-якій стадії онтогенезу, маючи за пробу мінімальну кількість екстрагованої ДНК рослини.

Метою наших досліджень була діагностика вірусних хвороб, розробка сучасних методів ідентифікації вірусів цінних сортів хмелю (*Humulus lupulus* L.) вітчизняної селекції, вивчення морфогенетичних потенціалів

ініціальних клітин, тканин й органів хмелю в умовах культури *in vitro*, вдосконалення технологій клонального мікророзмноження на безвірусній основі, розробка біотехнологічних підходів сортоідентифікації генотипів хмелю з використанням молекулярно-біологічних маркерів.

Матеріали і методи

Діагностику та ідентифікацію вірусів хмелю проводили в агроценозах Житомирської області на сортах української селекції. Для виявлення спектру чутливих рослин до досліджуваного вірусу, а також специфічних симптомів було проведено біологічне тестування рослинах індикаторах. Для виділення та очищення досліджуваного вірусу використовували молоді листя та молоді пагони, за стандартними методиками [5, 7]. Вивчення морфології вірусних частинок проводили електронно-мікроскопічним методом [11].

Умови стерилізації рослинного матеріалу підбирали залежно від походження експлантату, що вводився, опрацьовували експозицію і концентрацію стерилізуючого агента. Для введення в культуру *in vitro* в якості первинного експлантату відбирали верхівкові бруньки (5-15 мм), міжвузля (15-25 мм), а також бруньки підземних етиольованих пагонів (5-15 мм). Асептичні умови створювали за загальноприйнятими в біотехнології методами [9] і методами, розробленими в проблемній лабораторії фітовірусології та біотехнології НУБіП України.

Морфогенетичних потенціал тканин та органів в умовах *in vitro* хмелю звичайного вивчали на базових живильних середовищах Мурасіге і Скуга (МС) [12] та Уайта [13], які в процесі експериментів модифікували.

Виділення ДНК проводили за методикою [14].

Розподіл продуктів ампліфікації здійснювали на ABI Prism 3130 генетичному аналізаторі. Суміш для капілярного електрофорезу включала 1 мкл розбавленого ПЛР-зразку, 11,5 мкл Hi-Di формаміда (Applied Biosystems) і 0,5 мкл Genescan-350 ROX стандарту (Applied Biosystems), яку аналізували згідно інструкції виробника. Розмір флуоресцентних мічених ПЛР-продуктів (у парах нуклеотидів) вивчали за допомогою комп'ютерної програми «Genescan» та «Genotyper». Експериментальний цифровий матеріал опрацьовували стандартними сучасними статистичними методами з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel.

Результати та обговорення

У результаті обстеження хмільників Житомирської області було виявлено симптоми скручування листя – на сортах хмелю Заграва, Потіївський, Промінь та Слов'янка; хлороз – виявили лише на сорті хмелю Птіївський; міжжилкова мозаїка спостерігалася на Альті, Зміні, Кумирі, Промені та Регенті, енації – на Заграві і Слов'янці, карликовість – на Заграві, відповідно. Візуальна діагностика вірусних хвороб хмелю не завжди дозволяє зробити висновки про вірусну природу патогену. Дослідження безпосередньо зразків сортів Промінь, Заграва та Слов'янка показали, що з перерахованих рос-

лин-індикаторів на kwasолі відмічалися системні некрози деградації листків у відповідь на зараження латентним вірусом хмелю. Під час проведення електронно-мікроскопічних аналізів зразків рослин нових сортів хмелю та рослин-індикаторів у препаратах було виявлено вірусні частки ниткоподібної форми розмірами 630 x 640 x 12 нм з внутрішнім каналом 3,5-3,7 нм, що повністю відповідають характеристикам ВСЛХ. та розмірами 670 x 19 нм із внутрішнім каналом 3,5-3,7 нм. Причому у кожному шостому випадку вірусний патоген був виявлений із рослин хмелю, які зовсім не утворювали зовнішніх симптомів.

Для отримання безвірусного рослинного матеріалу, який у подальшому використовували для клонального мікророзмноження, нами обрано методику виділення апікальної меристеми. Зокрема, запропоновано використання трьох типів меристематичних експлантів, які розподілялися за розмірами: I тип (меристема з 2–3 листовими примордіями) – ~250 до 400 мкм, II тип (меристема з примордіями та частково меристематична зона) – ~400 до 550 мкм, III тип (меристематична зона) – від ~550 до 800 мкм. Отримані нами результати показали, що поєднання методів термотерапії (час експозиції 20 діб за температурі $37 \pm 1^\circ\text{C}$) і виділення апікальної меристеми (меристема з примордіями та частково меристематична зона в 400–550 мкм) дає змогу отримати 75 – 90 % оздоровленого рослинного матеріалу. Нами в серії експериментів досліджено також процеси індукції, розвитку та фізіологічні особливості калюсогенезу хмелю звичайного. Вивчено інтенсивність формування калюсу на різних типах експлантів (міжвузля, листок, стебло) та отримано морфогенний калюс сорту хмелю Гайдамацький із високою регенераційною здатністю. Цитологічним аналізом підтверджено гетерогенну структуру неморфогенного калюсу та виявлено меристематичні зони в морфогенному калюсі хмелю звичайного.

В процесі дослідження індукції ризогенезу показано вплив різних концентрацій фітогормонів, мінеральних та органічних сполук живильного середовища на формування кореневої системи. Доведено, що оптимальним живильним середовищем для укорінення мікропагонів хмелю є середовище з вмістом 0,1 мг/л БАП + 2,0 мг/л ІМК для рослин сорту хмелю Кумир та 0,1 мг/л БАП + 1,5 мг/л ІМК – Гайдамацький та Національний, максимальний відсоток укорінення рослин досягав 100 %. Виявлено залежність частоти коренеутворення від інтенсивності освітлення. Найбільший відсоток укорінення відбувався за інтенсивності освітлення 2500 лк – 95 %, який різко знижувався при підвищенні інтенсивності освітлення. Модифікуючи класичну схему отримання безвірусного садивного матеріалу, нами запропоновано технологічні операції з урахуванням матеріально-технічного забезпечення хмелярських господарств та подальшого розвитку галузі.

Для генетичного аналізу застосовували 10 мікросателітних відомих локусів (11a-59, 7a-82, HIG-A3, HIG-T1, HIG-T5, 3a-88, 5-2, HIG-A4, HIG-A9, HIG-T2). Було встановлено, що 9 із 10 локусів є поліморфними, за ви-

нятком локусу 7a-82, який виявився мономорфним для генотипів хмелю. Проведеним ПЛР аналізом виявлено 45 алелів. Для спрощеного запису генотипів рослин хмелю визначено алелі залежно від їхнього розміру, які позначали латинськими літерами A, B, C, D, E, F, G, де A → найменший за розмірами алель при електрофоретичному розподілі продуктів ампліфікації, літера B відповідає наступному за розміром алелю, G → найбільший фрагмент у мікросателітних локусах 3a-88 та 5-2. У результаті такого кодування можливо створити комп'ютерну базу сортів хмелю української селекції.

Експериментально встановлено, що сорт хмелю Руслан містить 23 алеля, Триумф – 20, Національний – 17, Славянка – 12, Кумир – 15, Промінь- 19, Злато Полісся – 17, Оболонський – 18, Хмелеслав – 14, Альта – 14, Потіївський – 18, Гайдамацький – 21 та Заграва – 18. Для створення комп'ютерного банку генетичних паспортів сортів хмелю української селекції було переведено отримані дані в бінарний вираз. Наявність або відсутність певного алеля позначається як «1» або «0». За таким принципом можливо побудувати генетичний паспорт геному хмелю. Це дозволяє легко ідентифікувати і диференціювати проаналізовані, за даними 10 мікросателітними локусами, сорти та вихідний селекційний матеріал хмелю. Як показав аналіз сортів хмелю за 10 SSR-маркерами кожний представлений генотип має власний і унікальний набір алелів. Це дозволяє чітко розрізнити їх при проведенні SSR-ПЛР аналізу.

Висновки. Розроблена технологія клонального мікророзмноження *in vitro* хмелю звичайного, яку рекомендується використовувати для масового розмноження з метою ефективного оздоровлення та одержання генетично однорідного рослинного матеріалу. Практичні результати з непрямого морфогенезу можуть бути використані при створенні нових селекційних форм та трансгенних рослин хмелю звичайного. ДНК-ідентифікації та диференціації сортів хмелю української селекції на основі 10 SSR-маркерів відкриває нові можливості і дозволяє проводити сортоідентифікацію отриманих безвірусних регенерантів на етапі клонального мікророзмноження, а також дає можливість суттєво скоротити час проведення визначення будь-якого сорту хмелю. Результати досліджень свідчать про високу ідентифікаційну та диференційну здатність розробленої системи генотипування. Запропоновано варіант запису молекулярно-генетичного паспорта генотипу за допомогою бінарних формул, який засвідчує відміни структури ДНК сорту, лінії, гібриду і дозволяє здійснювати їх унікальну ідентифікацію сортів хмелю звичайного.

Література

1. *Бойко А.Л.* Вируси и вирусные заболевания хмеля и розы эфиромасличной. – К.: Наукова думка, 1976. – 148с.
2. *Мельничук М.Д., Ключаваденко А.А., Давиденко О.А.* Отримання безвірусного посадкового матеріалу хмелю (*Humulus lupulus* L.) в умовах *in vitro* // Науковий вісник НАУ. – 2000. – Вип. 29. – С. 47 – 52.

3. Мельничук М.Д., Кожукало В.Є., Оверченко В.В., Смирнова С.О. Методичні підходи по виділенню та очистці карлавірусу хмелю на плантаціях світової колекції в Україні // Аграрна наука та освіта. – 2001. – № 1, Т. 2. – С. 5 – 10.

4. Adams A.N., Barbara D.G. Most range, purification and some properties of hop mosaic virus // Ann. Appl. Biol. – 1980. – Vol. 96. – P. 201 – 208.

5. Adams A.N., Barbara D.G. Most range, purification and some properties of two carlaviruses from hop (*Humulus lupulus*): hop latent American, hop latent // Ann appl. Biol. – 1982. – Vol. 101. – P. 483 – 494.

6. Hataya T., Uchino K., Arimoto R. Molecular characterization of Hop latent virus and phylogenetic relationships among viruses closely related to carlaviruses // Arch. Virol. – 2000. – Vol. 145. – P. 2503 – 2524.

7. Мельничук М.Д., Смирнова С.О., Кожукало В.Є., Оверченко В.В. Діагностика та ідентифікація вірусів хмелю (*Humulus lupulus* L.) новітньої української селекції // Бюлетень Інституту Сільськогосподарської Мікробіології. – 2000. – №7. – С. 37 – 38.

8. Barbara D.J., Adams A.N. Hop latent virus // CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. – 1983. – № 261. – P. 250 – 252.

9. Бутенко П.Г. Культура клеток растений и биотехнология – М.: Наука, 1986. – 285 с.

10. Митрофанова О.В. Вирусные болезни промышленных цветочных культур и биотехнологические приемы их оздоровления: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук : спец. 06.01.11 – РАСХН. – СПб., 1992. – 72 с.

11. Laemmli U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680 – 685.

12. Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – №15. – P. 473 – 497.

13. White Ph.R. A handbook of plant tissue culture. – Lancaster: The jacques catlell press, 1943. – 191 p.

14. Boom R., Soj C.J.A., Salimans M.M. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids // J. Clin Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – P. 495 – 503.

Резюме

Показные биотехнологические подходы идентификации вирусов хмеля, клонального микророзмножения, изучения морфогенетического потенциала органов и тканей хмеля обыкновенного в условиях *in vitro*, определения сортоспецифичности регенерантов и дифференциации генотипов по ДНК-маркерах.

Показані біотехнологічні підходи ідентифікації вірусів хмелю, клонального мікророзмноження, вивчення морфогенетичного потенціалу органів і тканин хмелю звичайного умов *in vitro*, визначення сортоспецифічності регенерантів та диференціації генотипів за ДНК-маркерами.

The following biotechnological approaches identify viruses hop clonal micropropagation, the study of morphogenic potential organ and tissue hop conditions *in vitro*, determination sortospetsyficchnosti regeneration and differentiation of genotypes by DNA markers.

ОПАЛКО О.А.¹, ОПАЛКО А.І.^{1,2}

¹ Національний дендрологічний парк “Софіївка” НАН України

Україна, 20300, Умань, Черкаської обл., вул. Київська, 12А, e-mail: opalko_a@ukr.net

² Уманський національний університет садівництва

Україна, 20305, Умань, Черкаської обл., н/в “Софіївка-5”, e-mail: usau@usau.ic.ch.ua

ПРОБЛЕМИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ТЕРМІНОЛОГІЇ В АГРАРНОМУ ВУЗІ

Успіхи в опануванні навчально-науковою інформацією значною мірою зумовлені рівнем оволодіння студентом науковою термінологією дисципліни, що вивчається. Кожен термін має підпорядковуватись значенню слова межа, тобто обмежувати багатозначність і суб'єктивність та вживатись у чітко обмеженій певній області значень. Усі дослідники будь-якого фаху для визначення ідентичних понять повинні користуватись тільки ідентичними термінами [11]. Дотримання цього правила особливо необхідне для ефективного вивчення генетики, селекції та біотехнології. Недостатнє розуміння значення специфічних термінів найбільше обмежує можливості студентів щодо вивчення біотехнології. Ще гірші наслідки неправильного вживання термінів, що руйнує основи дидактики [8, 9]. Започаткована в 90 роках деякими засобами масової інформації негативна тенденція спотворення біотехнологічної термінології, набула нині масового характеру.

Саме це спонукало дослідити можливості уніфікації біотехнологічної термінології, а також очищення її від псевдонаукового арго-сленгу.

Матеріали і методи

Дослідження виконували у 1980–2010 рр. на кафедрі генетики, селекції рослин та біотехнології Уманського національного університету садівництва зі студентами факультетів «Агрономія» та «Плодоовочівництво і виноградарство». Моніторинг динаміки засвоєння студентами окремих термінів проводили під час виконання різних видів навчальної роботи активованої загальноприйнятими та модифікованими нами дидактичними технологіями [9].

Результати та обговорення

Слово біотехнологія віднедавна асоціюється у широкого загалу з малорозумілою і певною мірою загрозливою аббревіатурою ГМО. Поступово з засобів масової інформації цей журналістсько-побутовий і не надто грамотний сленг став проникати в біотехнологічну науку. Йдеться насамперед про вживання терміну “ГМО — генетично модифіковані організми” у значенні трансгенні організми. У квітні 2010 р. президія Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова на своєму засіданні засудила спроби деяких політиків заборонити використання в Україні так званих генетично модифікованих організмів [3]. Нині термін генетично модифікований організм як живий змінений організм (ГМО) у законодавчих актах України вживається стосовно будь-якого організму, у якому генетичний ма-

теріал був змінений за допомогою штучних прийомів перенесення генів, які не відбуваються у природних умовах [2]. Крім створених рекомбінантними методами генетичної інженерії трансгенних організмів до ГМО зарахували цитоплазматичні й соматичні гібриди, а також отримані внаслідок безпосереднього введення в організм спадкового матеріалу, підготовленого зовні організму, включаючи мікроін'єкції, макроін'єкції та мікроінкапсуляції.

Визнання теорії еволюції живого не може не супроводжуватись автоматичним визнанням того, що все живе від вірусів до рослин, тварин і людини є ГМО як наслідком багаторазових мутацій і рекомбінацій тобто модифікації спадковості і добору краще пристосованих особин з надзвичайного їхнього різноманіття. Людина за перших днів свого існування користувалась продуктами ГМО. За твердженням археологів пшениця була окультурена ще у 8–15 тисячоліттях до нашої ери, а це 10–17, а можливо й 20 тисяч років тому [1]. А у середині минулого сторіччя було оприлюднено результати дослідів з ресинтезу (повторного синтезу) *Triticum aestivum* L. — м'якої пшениці, нашого головного хлібного злаку. Виявилось, що геном 42-хромосомної м'якої пшениці об'єднує три різних геноми — А, В і D, кожен з яких містить по 14 хромосом, а саме: геном А від дикорослої пшениці однозернянки (*T. boeoticum* Boiss.) та два геноми близьких до дикорослої пшениці різних видів егілопса — геном В від *Aegilops speltoides* Tausch і геном D від *Ae. squarrosa* L., який нині визнано за синонім *Ae. tauschii* Coss. Пізніше виводий склад донорів елементарних геномів (і пшениці, і егілопсу) неодноразово уточнювався, однак ідея гексаплоїдного походження пшениці залишилась неспростовною [1]. Наскільки природними способами замішувався цей геномний «коктейль» достеменно невідомо. Мабуть це були спонтанні гібриди з участю нередукованих гамет, що зрідка утворюються внаслідок нерозходження хромосом у мейозі. Однак добре відомо, що видалення пиляків з квітки помідора, чи будь-якої іншої рослини, пінцетом і наступне нанесення м'яким пензликом пилку добутого з квітки іншої рослини (не завжди того самого виду чи навіть роду) не належить до прийомів, що відбуваються «у природних умовах». Тим не менш, усі споживають продукцію сортів гібридного походження без жодних застережень. Споживають продукцію сортів-мутантів, створених методами радіаційного і хімічного мутагенезу, хоча опромінення вихідного селекційного матеріалу і обробка його етиленіномом, синтезованим у не «природних умовах» у 1947 р. Й.А. Рапопортом у Москві та використання інших мутагенів також не належить до природних способів модифікації спадковості.

Використання методів генної інженерії для введення в клітину генів від інших видів, а тим більше отримання алополіплоїдів методами злиття протопластів (соматичної гібридизації) не мають принципових відмінностей від статевої гібридизації. Ці новітні біотехнологічні методи лише прискорюють селекційний процес.

Стосовно безпечності сортів, створених біотехнологічними методами, слід зауважити, що небезпечні сорти можна створити, якщо поставити за мету селекції створення отруйної рослини. Однак такі ж небезпечні сорти можна створити методами традиційної гібридизації. Більше того, у природі існує безліч надзвичайно отруйних рослин і грибів, до створення яких жоден біотехнолог зовсім не причетний. З-поміж них найбільш небезпечні: біла поганка *Amanita phalloides* (Fr.) Secr., болиголов плямистий — *Conium maculatum* L., цикута отруйна — *Cicuta virosa* L., аконіт — *Aconit anthora* L., *A. septentrionale* Koelle, *A. ferox* Wall та інші дикорослі види цього роду, чемериця Лобелієва — *Veratrum lobelianum* Bernh. та ін. Є отруйні кімнатні рослини: азалія — *Rhododendron simsii* Planch, амариліс — *Amaryllis belladonna* L., антуриум — *Anthurium andreanum* Andre, дифенбахія — *Dieffenbachia seguine* (Jacq.) Schott, монстера *Monstera deliciosa* Liebm., більшість видів фікуса *Ficus* spp., види філодендрону *Philodendron* spp. та багато-багато інших [7, 14].

Усі частини такої прекрасної і оспіваної квітки як конвалія звичайна *Convallaria majalis* L. також отруйні [12], отруйний бузок — *Syringa vulgaris* L. [14] та багато ін. Незважаючи на статистику отруєнь грибами і деякими рослинами жодних законів для запобігання їхнього споживання не ухвалено. Тому нагнітання негативної громадської думки щодо ГМО слід вважати не науковою проблемою, а політизовано-комерційною.

Все зазначене свідчить про непевність і навіть некоректність самого терміну ГМО, замість якого можна вживати термін «біотехнологічні сільськогосподарські культури» [3] як узагальнення для трансгенних рослин, виведених методами генної інженерії і соматичних гібридів, отриманих внаслідок злиття протопластів *in vitro*. У наукових публікаціях слід користуватись ustalеними термінами «трансгенні рослин» і «соматичні гібриди».

Отже, у понятті біотехнологія рослин об'єднуються методи культури клітин і тканин рослин з методами молекулярної біології та технікою отримання рекомбінантних молекул ДНК. Вирощування клітин і тканин вищих рослин поза організмом на штучних живильних середовищах у контрольованих людиною умовах дає змогу створювати принципово новий вихідний матеріал для добору, прискорено розмножувати його, виконувати добір на клітинному рівні та індукувати органогенез. Те, що злиття соматичних клітин рослин дає змогу об'єднувати в одній клітині геноми видів і родів із статевого несумісності, значно стимулювало інтерес селекціонерів та біотехнологів до використання цього методу для подолання обмежень в обміні генами, що властиві традиційним методам селекції. Надана внаслідок розвитку генно-інженерних технологій можливість міжтаксонного перенесення генів дає змогу долати так званий «видовий бар'єр», що обмежує поліпшення багатьох цінних властивостей у процесі класичної селекції [4–6, 8].

Перші трансгенні сорти з'явились на світовому ринку на початку 90 років минулого сторіччя. Це були здебільшого трансгенні рослини сої,

кукурудзи, низькоерукового й низькоглюкозинолатного олійного ріпаку та олійного бавовнику.

Нині у світі посівні площі під трансгенними сортами стрімко зростають. У 2009 р. вони досягли близько 140 млн. га, з них майже 50 відсотків припадає на США, по 16 — в Аргентині і Бразилії, близько 6 — в Індії й Канаді і 3 відсотки у Китаї. Це переважно сорти сої — близько 70 млн. га, гібриди кукурудзи — 40, бавовнику — 15, ріпаку — 6 млн. га. До відомого бетакаротинового «золотого рису» [15] додався новий продукт генної інженерії — мультивітамінна кукурудза [13], солодкий помідор Sugardrop з підвищеним вмістом аскорбінової кислоти та ін. Вже більшість країн Євросоюзу і Росія дозволили використання трансгенних сортів. Серед них створений німецькою компанією “BASF” сорт картоплі Аміфлора, що характеризується підвищеним вмістом крохмалю придатного для промислового перероблення. В Росії вже впроваджено 16 трансгенних сортів — серед них картопля, кукурудза, соя, буряк, рис.

Введені в культуру клітини і тканини вищих рослин мають унікальні властивості, що відрізняють їх від культури клітин тварин чи мікроорганізмів. Їх можна вирощувати у вигляді неорганізованої маси, придатної до клонування та здатної переходити від розмноження і росту до синтезу видоспецифічних господарсько-важливих сполук. Разом з цим зберігається можливість, змінюючи склад живильних середовищ, стимулювати органогенез або примушувати ізольовані клітини утворювати ембріоїди і на цій основі — рослини-регенеранти.

Залежно від мети, задля якої селекціонер вдається до методів біотехнології, їх поділяють на дві великі групи: селекційну, яка використовується для індукування мінливості й наступного добору та технологічну, до якої звертаються для прискореного розмноження найцінніших, дефіцитних генотипів; оздоровлення існуючих сортів-клонів; синтезування рідкісних, цінних сполук; збереження генофонду культурних рослин.

Висновок

Поширення журналістсько-побутового і не надто грамотного сленгу з засобів масової інформації в директивні документи і навіть у біотехнологічну науку негативно впливає на ефективність навчального процесу. Завдання викладача вищої школи полягає в упорядкуванні біотехнологічної термінології і доведення її до кожного студента з метою глибшого розуміння і покращення засвоєння фахової інформації не лише з загальної біотехнології, а й спеціальної генетики й селекції, що сприятиме підвищенню якості підготовки фахівців для аграрного сектора економіки і аграрної науки.

Література

1. *Власенко В.А.* Селекція пшениці // Спеціальна селекція польових культур: Навч. посіб. / В.Д. Бугайов, С.П. Васильківський, В.А. Власенко та ін.; за ред. М.Я. Молоцького. — Біла Церква, 2010. — С. 5–32.

2. Закон України Про безпечність та якість харчових продуктів // Документ 771/97-вр, остання редакція від 15.10.2010 на підставі 2436-17, чинний. — Режим доступу: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?page=1&nreg=771%2F97-%E2%F0>

3. *Звернення* президії Українського товариства генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова до Верховної ради України. — 2010. — Режим доступу: <http://utgis.org.ua/mode-static/page-novynu.html>

4. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин: Генетичні та фізіолого-біохімічні основи: Моногр. — К.: Логос, 2005. — 724 с.

5. *Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко Б.О.* Основи біотехнології рослин. — К.: Ей-Бі-Сі, 2000. — 248 с.

6. *Митрофанова І.В.* Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологических систем получения и сохранения декоративных и плодовых культур / И.В. Митрофанова // Актуальні проблеми прикладної генетики, селекції та біотехнології рослин: Зб. наук. праць ДНБС. — Ялта 2009. — Т. 131. — С. 9–22.

7. *Мойсенко Г.* Ядовитые растения. — 2010. — Режим доступу: <http://www.yadflora.narod.ru/>

8. *Опалко А.І.* Використання методів біотехнології // Селекція плодівих і овочевих культур / А.І. Опалко, Ф.О. Заплічко. — К.: Вища шк., 2000. — С. 99–110.

9. *Опалко А.І.* Елементи інтерактивного навчання у викладанні загальної і прикладної генетики у вищих аграрних закладах освіти // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генет. і селекц. ім. М.І. Вавилова; редкол.: ... Кунах В. А. (голов. ред.) та ін. — К.: Логос, 2007. — Т. 1. — С. 587–591.

10. *Опалко А.І., Опалко О.А.* Тлумачник вжитих термінів // Селекція плодівих і овочевих культур. Практикум: навч. посібник / А.І. Опалко, А.О. Яценко, О.А. Опалко, Н.В. Мойсейченко. — К.: Наук. світ, 2004. — С. 267–303.

11. *Опалко О.А., Опалко А.І.* Дидактичні проблеми селекційно-генетичної термінології // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. НАНУ, УААН, АМНУ, УТГіС ім. М.І. Вавилова; Редкол.: ... Кунах В. А. (голов. ред.) та ін. — К.: Логос, 2010. — Т. 9. — С. 489–494.

12. *Atkinson K.J.* Suspected lily-of-the-valley (*Convallaria majalis*) toxicosis in a dog / Kathryn J. Atkinson, Deborah M. Fine, Tim J. Evans, Safdar Khan // Journal of Veterinary Emergency and Critical Care. — 2008. — Vol. 18, Is. 4. — P. 399–403.

13. *Naqvi S.* Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways / Shaista Naqvi, Changfu Zhu, Gemma Farre et al. // Proc. Nat. Acad. Sc. USA. — 2009. — Vol. 106 (19). — P. 7762–7767.

14. *Toxic plants and other natural toxicants* / T. Garland, A.C. Barr (ed.). — N.Y: CABI, 1998. — 608 p.

15. *Ye X.* Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm / X. Ye, S. Al-Babili, I. Potrykus et al. // Science. — 2000, Vol. 287(5451). — P. 303–305.

Резюме

Впорядкування біотехнологічної термінології є одним з визначальних засобів кращого засвоєння студентами агрономічних спеціальностей фахової інформації не лише з загальної біотехнології, а й спеціальної генетики й селекції, що сприятиме

підвищенню якості підготовки фахівців для аграрного сектора економіки і аграрної науки.

Упорядочение селекционно-генетической терминологии является одним из определяющих средств лучшего усваивания студентами агрономических специальностей профессиональной информации не только по общей биотехнологии, но и частной генетике и селекции, что будет способствовать повышению качества подготовки специалистов для аграрного сектора экономики и аграрной науки.

The necessity to coin and standardize of Ukrainian terminology used in biotechnology, and bioengineering of the cultivated plant are discussed. Further perfection of term formation and definition for quick learning scheduled professional information by students will promote to raise the specialist quality for agrarian sector of economic and agrarian science.

ОСТРИКОВА О.В., ФЕДОТОВА И.Э., ХАРХАРДИНА Е.Л.

ГОУ ВПО «Орловский государственный университет»,

Россия, 302026, г. Орел, ул. Комсомольская, д.95, e-mail: ostrikov_au@mail.ru

ОПТИМИЗАЦИЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ ВИШНИ НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ

Изменившиеся погодно-климатические условия Центрального региона России привели к потере адаптивности к абиотическим и биотическим стрессорам ценной косточковой культуры вишни, которая утратила промышленное значение, деревья её сохранились в небольшом объеме лишь в приусадебных насаждениях [4]. Для изменения сложившейся критической ситуации путём реконструкции генома вишни, селекционеры вовлекают в гибридизацию дикие виды подсемейства *Prunoideae*, несущие гены устойчивости к болезням и адаптивности к изменившимся условиям экологической среды [3; 4; 6; 7]. Для ускорения селекционного процесса и повышения его эффективности возникла настоятельная потребность в новых технологиях, позволяющих преодолеть трудности, возникающие при отдалённой гибридизации растений. Среди таких технологий особое место занимает технология микрклонального размножения растений.

Технология клонального микрразмножения позволяет размножать ценные гибридные растения (часто бесплодные или трудно размножаемые традиционными методами вегетативного размножения). В культуре *in vitro* возможно вести селекцию на адаптивность к различным факторам, получать полиплоидные генотипы. Стерильные растения, полученные *in vitro*, являются незаменимыми объектами для дальнейших исследований по разработке прецизионных методов генетической трансформации, которые позволяют переносить в геном программируемых генотипов гены, контролируемые ценные хозяйственно-биологические признаки.

Процесс микроклонального размножения состоит из ряда последовательных этапов, каждый из которых имеет свою специфику [1; 2; 8]. Одним из наиболее ответственных этапов культивирования *in vitro* является этап введения экспланта в культуру. На этом этапе очень важно соблюдать абсолютную стерильность исходного материала. Поэтому особое внимание следует уделять выбору стерилизующего агента, который должен обеспечивать не только высокий выход стерильных эксплантов, но и не наносить повреждений растительным тканям. При правильно и эффективно проведённой стерилизации дальнейшее развитие экспланта будет определяться, прежде всего, составом питательной среды. Установлено, что требования к составу макро- и микросолей, количеству биологически активных веществ в питательной среде значительно различаются не только в зависимости от породы, но и в зависимости от сорта, а иногда даже от клона одного сорта [1; 8].

Исходя из этого, цель наших исследований — оптимизация технологии микроклонального размножения отдаленных гибридов вишни на этапе введения в культуру *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования проводили в лаборатории биотехнологии ГОУ ВПО «Орловский государственный университет» в 2010 – 2011 гг. Культивирование эксплантов осуществляли при температуре 25°C, освещенности 2000 люкс, фотопериоде 16 часов. В качестве эксплантов использовали меристемы верхушечных и боковых вегетативных почек изучаемых объектов (по 30 штук в варианте). В качестве источников минерального питания для эксплантов испытывали среды Мурасиге и Скуга (MS), Нича и экспериментального состава (видоизмененная MS). В качестве испытуемых стерилизующих агентов использовали: Domestos, лизоформин 5%. Концентрация 6-БАП в питательных средах 1 мг/л. В экспериментальную питательную среду добавляли также ГК 0,5 мг/л и ИМК 0,5 мг/л.

Объектами исследований послужили отдалённые триплоидные гибриды ($2n = 3x = 24$), полученные в пределах подрода *Pseudocerasus* от скрещивания районированных тетраплоидных ($2n = 4x = 32$) сортов вишни обыкновенной (материнские формы) — Любская, Шоколадница и диплоидных видов ($2n = 2x = 16$) (отцовские формы) — вишня сахалинская [*C. sachalinensis* (Smidt Fr.) Kom. et Aliss.], в. мелкопильчатая [*C. serrulata* (Lindl.) G. Don], в. инциза [*C. incisa* (Thunb.) Loisel].

Исследования проводили в соответствии с общепринятыми методиками [2; 5].

Результаты и обсуждение

При изучении эффективности действия стерилизующих агентов на исходный растительный материал лучший стерилизующий эффект для большинства введенных эксплантов проявил лизоформин 5% (выход стерильных жизнеспособных эксплантов в среднем составил 83,21%). Только для

формы 01-73 эффективность испытуемых стерилизующих агентов оказалась приблизительно одинаковой (92,22 % стерильных жизнеспособных эксплантов при стерилизации Domestos, 91,11 % — лизоформином 5%).

Установлено, что жизнеспособные экспланты возможно получать на всех исследуемых питательных средах. Для большинства испытуемых эксплантов наиболее оптимальным состав питательной среды оказался у экспериментальной среды (выход жизнеспособных эксплантов в среднем 62,68 %) (таблица 1).

Таблица 1

Выход жизнеспособных эксплантов отдалённых гибридов вишни в зависимости от питательной среды

Гибридная форма (А)	Выход жизнеспособных эксплантов на средах (В), %		
	MS	Нича	экспериментальная
Шоколадница х в. инциза (01-73)	40,00	88,33	73,33
Любская х в. сахалинская (01-31)	30,77	20,00	47,37
Шоколадница х в. инциза (01-70)	73,33	46,43	60,00
Шоколадница х в. серрулата (02-00)	80,00	26,67	70,00
В среднем по средам:	56,03	45,36	62,68
НСР _{(AB)05}	2,34		

Выявлена специфическая отзывчивость исследуемых генотипов отдаленных гибридов вишни на компонентный состав питательных сред. Для гибридной формы 01-73 наиболее подходящей оказалась среда Нича (88,33 % — выход жизнеспособных эксплантов), для гибридных форм 01-70 и 02-00 — среда MS (73,33 и 80,00 % соответственно), для формы 01-31 — экспериментальная среда (47,37 %). Полученные на разных питательных средах жизнеспособные экспланты не все оказались стерильными.

Исследованием совместного влияния стерилизующего агента и компонентного состава питательной среды (таблица 2) установили, что наибольший выход стерильных жизнеспособных эксплантов отдаленных гибридов вишни можно получить при стерилизации лизоформином 5 % в среднем для всех питательных сред (62,87 %), особенно на питательной среде MS (70,39 %).

Самым неудачным для большинства испытуемых эксплантов стало сочетание стерилизующего агента Domestos и питательных сред MS и Нича (25,00 % и 25,83 % соответственно). Выявлена высокая специфичность исследуемых генотипов к действию стерилизующего агента и компонентам питательных сред. Например, абсолютно недопустимыми (0 % стерильных жизнеспособных эксплантов) оказались следующие сочетания стерилизующих агентов с компонентными составами сред: Domestos — со средами Нича и экспериментальной (для гибридной формы 01-70), с MS (для

01-73 и 01-31); лизоформина 5 % с экспериментальной средой (для 01-31). Для большинства исследуемых генотипов максимальное число стерильных жизнеспособных эксплантов было получено на разных питательных средах при стерилизации лизоформином 5 %: на среде Нича для 01-73 (93,33 %) и 01-70 (92,86 %), на экспериментальной среде для 02-00 (86,67 %). Для формы 01-31, напротив, наибольший выход стерильных жизнеспособных эксплантов был получен на экспериментальной среде при стерилизации Domestos (78,95 %).

Таблица 2

Выход стерильных жизнеспособных эксплантов отдалённых гибридов вишни в зависимости от питательной среды и стерилизующего агента

Гибридная форма	Выход стерильных жизнеспособных эксплантов на средах, %					
	при стерилизации Domestos			при стерилизации лизоформином 5%		
	MS	Нича	экспериментальная	MS	Нича	экспериментальная
01-73	0,00	83,33	80,00	80,00	93,33	66,67
01-31	0,00	6,67	78,95	61,54	33,33	0,00
01-70	86,67	0,00	0,00	60,00	92,86	66,67
02-00	13,33	13,33	46,67	80,00	33,33	86,67
В среднем по средам:	25,00	25,83	51,41	70,39	63,21	55,00
В среднем по стерил. агенту:	34,08			62,87		

Таблица 3

Степень развития стерильных жизнеспособных эксплантов отдалённых гибридов вишни при стеблевом органогенезе в зависимости от питательной среды и стерилизующего агента

Гибридная форма	Степень развития стерильных жизнеспособных эксплантов на средах, мм			
	при стерилизации Domestos		при стерилизации лизоформином 5%	
	MS	экспериментальная	MS	экспериментальная
01-73	—	22,67	7,00	13,90
01-31	—	14,39	7,62	—
01-70	7,46	10,50	8,00	12,60
02-00	10,08	10,86	10,08	12,64
В среднем по средам:	8,77	14,61	8,18	13,05

Кроме того, следует отметить, что при культивировании эксплантов на среде Нича наблюдали каллусогенез, в то время как на других испытываемых средах — стеблевой органогенез.

Для выявления закономерностей морфогенеза *in vitro* отдаленных гибридов вишни с учётом их генотипических особенностей, уровня регенерационного потенциала исследовали степень развития эксплантов при стеблевом органогенезе в зависимости от стерилизующего агента и питательной среды (таблица 3) через 8 недель после введения их в культуру. Установлено совместное влияние на жизнеспособность эксплантов компонентов питательных сред и стерилизующих агентов.

Исследованиями выявлено, что в наибольшей степени развитыми оказались экспланты, культивированные на экспериментальной питательной среде независимо от типа стерилизующего агента: в среднем степень развития эксплантов при стерилизации Domestos 14,61 мм, при стерилизации лизоформином 5 % — 13,05 мм. Наиболее развитыми среди испытуемых генотипов оказались экспланты гибридной формы 01-73 (22,67 мм), культивированные на экспериментальной среде при стерилизации Domestos. Интенсивность развития каллуса на среде Нича была приблизительно одинаковой независимо от генотипа и стерилизующего агента. Размеры каллуса колебались около 12,00 x 12,00 мм.

Выводы

Оптимизирована технология микроклонального размножения эксплантов меристем отдаленных гибридных форм, полученных от скрещивания вишни обыкновенной и дальневосточных диплоидных видов на этапе введения в культуру.

На этапе введения в культуру лучшая стерилизация эксплантов большинства генотипов отдаленных триплоидных гибридов вишни достигается при использовании лизоформина 5%, гибридной формы 01-31 — Domestos.

Жизнеспособные стерильные экспланты возможно получать на всех исследуемых питательных средах. При культивировании эксплантов на экспериментальной среде и среде MS индуцируется стеблевой органогенез, при культивировании на среде Нича — каллусогенез.

Выявлена специфическая восприимчивость генотипов отдаленных триплоидных гибридов вишни к компонентам питательных сред и к повреждающему действию стерилизующих агентов. Более интенсивный стеблевой органогенез обеспечивается при культивировании эксплантов на экспериментальной питательной среде при стерилизации Domestos (форм 01-73 и 01-31) и лизоформином 5 % (форм 01-70 и 02-00).

Литература

1. *Высоцкий В.А.* Клональное микроразмножение плодовых растений и декоративных кустарников// Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве: Сб. научн. тр. ВНИИС им. И.В. Мичурина. — Мичуринск, 1989. — С. 3 – 8.

2. *Деменко В.И.* Микроклональное размножение плодовых и ягодных культур // Методические указания к практ. занятиям по плодоводству. — М.: МСХА, 1997. — 35 с.

3. Джигадло Е.Н. Совершенствование методов селекции, создание сортов вишни и черешни, их подвоев с экологической адаптацией к условиям Центрального региона России. — Орёл: ВНИИСПК, 2009. — 268 с.

4. Колесникова А.Ф. Вишня. Черешня. — Харьков: Фолио; М.: ООО «Издательство АСТ», 2003. — 255 с.

5. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами/ Под ред. Е. Н. Джигадло. — Орел, 2005. — 50с.

6. Морозова Т.В. Итоги селекции вишни и черешни во ВНИИ садоводства им. И.В. Мичурина // Основные итоги и перспективы научных исследований ВНИИС им. И.В. Мичурина (1931-2001 гг.): сб. науч. тр. — Т. I. — Тамбов: Изд-во ТГТУ, 2001. — С. 45-53.

7. Федотова И.Э., Колесникова А.Ф. Использование генофонда рода *Cerasus* Mill. для создания устойчивых к биотическим и абиотическим факторам среды сортов и подвоев вишни обыкновенной (*C. vulgaris* Mill.) // Ж. «Учёные записки Орловского государственного университета», — № 2. — 2007. — С. 107-113.

8. Шелифост А.Е., Костышин С.С., Волков Р.А. Микрклональное размножение видов рода *Prunus* //Биотехнология. — 1993. — № 5. — С. 19 – 21.

Резюме

В работе представлены результаты оптимизации технологии микрклонального размножения отдалённых триплоидных гибридов вишни. Выявлены оптимальные варианты сочетания способов стерилизации и питательной среды, обеспечивающие высокую степень развития жизнеспособных эксплантов на этапе введения в культуру.

In work results of optimization clonal micropropagation technology of remote triploid cherry hybrids are presented. Optimum variants of a combination of sterilization ways and nutrient medium, providing a high degree developments of viable explants at introduction to culture stage are revealed.

САМСОНОВА А.Е.¹, МАШКИНА О.С.^{1,2}, ТАБАЦКАЯ Т.М.¹

¹ФГУП НИИ лесной генетики и селекции

Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

²Воронежский государственный университет,

Россия, 394006, Университетская площадь, д.1, e-mail: olga_mashkina@yahoo.com

ФИТОГОРМОНЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ *IN VITRO*

Биосинтез и взаимодействие стимуляторов и ингибиторов роста – одна из важнейших составных частей того комплекса физиолого-биохимических изменений, который определяет ход процесса развития растения, процессов старения и омоложения. Взаимодействуя (прямо или опосредовано) с геномом клетки, фитогормоны могут выполнять роль медиаторов (посредников) в развитии. Рострегулирующие вещества играют ключевую роль в становлении организованной многоклеточной структуры растений. Они

обеспечивают дифференциальное выражение признака в фенотипе. Важным компонентом системы интеграции у растений является индолилуксусная кислота (ИУК). По мнению многих исследователей, в процессе поддержания ауксинового гомеостаза вовлечено множество генов, что указывает на значимость этого фитогормона в развитии. Немаловажное значение имеют и фенольные соединения. Они принимают участие в окислительном метаболизме растений в качестве доноров и активаторов водорода, в биосинтезе индолилуксусной кислоты и в окисляющих ее системах [1-3].

Целью настоящей работы являлось изучение физиолого-биохимических аспектов длительного культивирования *in vitro* карельской березы. В задачу исследований входило определение эндогенных регуляторов роста индольной (ауксины) и фенольной (ингибиторы роста) природы.

Материалы и методы

Объектом исследования являлись растения-регенеранты микроразмноженного клона Ia высокоствольного дерева карельской березы узорчатой формы разной длительности культивирования в условиях *in vitro*: 1 год, 11 и 14 (или 18) лет. Исходный клон каллусного происхождения ежегодно субкультивировали с интервалом раз в 4 – 6 месяцев на питательной среде $\frac{1}{2}$ MS или $\frac{1}{2}$ WPM без гормонов с высадкой растений через год и 11 лет культивирования из пробирочной культуры в питомник. Физиолого-биохимические исследования проведены в 2005 и 2009 гг. В 2005 году общий биологический возраст анализируемых растений (вегетирующих или находящихся в пробирочной культуре) составил 14 лет: 1 год культивирования *in vitro* + 13 лет произрастания в питомнике, 11 лет *in vitro* + 3 года в питомнике, 14 лет *in vitro*. В 2009 году – 18 лет: 1 год культивирования *in vitro* + 17 лет произрастания в питомнике, 11 лет *in vitro* + 7 лет в питомнике, 18 лет *in vitro*. Определение эндогенных регуляторов роста проводили биологическим методом (по росту отрезков coleoptилей пшеницы в длину) с предварительной хроматографической разгонкой эфирных экстрактов [4]. В 2005 году у растений, высаженных в питомник, для анализа использовали пробы, отобранные с трех деревьев (общий образец) каждого варианта. В 2009 году исследования проводили на индивидуальном уровне: анализировали каждое дерево в отдельности. При этом со средней части кроны отбирали по три ветви (общий образец), расположенные с южной стороны. У регенерантов для анализа использовали только общий образец из 10-15 растений.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлены определенные различия в содержании, динамике и балансе рострегулирующих веществ индольной и фенольной природы у растений клона разной длительности культивирования *in vitro* (таблица).

Таблица

Содержание эндогенных регуляторов роста клона Ia карельской березы различного срока культивирования *in vitro*, % к контролю, 2005 г.

Длительность культивирования <i>in vitro</i> , лет	Сроки отбора образцов								
	13.04			6.07			14.11		
	с	и	с/и	с	и	с/и	с	и	с/и
	Растения, высаженные в питомник								
	почки			листья			побеги		
1	23.6 ± 0.70	40.8 ± 1.22	0.577	1.1 ± 0.03	116.8 ± 3.50	0.009	3.2 ± 0.10	84.7 ± 2.54	0.038
11	1.6 ± 0.05	161.4 ± 4.84	0.010	8.6 ± 0.26	61.1 ± 1.83	0.142	8.9 ± 0.27	119.2 ± 3.58	0.074
Растения в культуре <i>in vitro</i> , листья									
14	14.7 ± 0.44	57.7 ± 1.73	0.255	6.4 ± 0.19	82.2 ± 2.46	0.078	0.6 ± 0.02	107.8 ± 3.23	0.006
Растения, высаженные в питомник, побеги									
1	24.0 ± 0.72	52.5 ± 1.58	0.763	4.2 ± 0.13	91.0 ± 2.73	0.047	5.2 ± 0.46	72.8 ± 2.18	0.072
11	14.6 ± 0.44	104.1 ± 3.12	0.140	0.0	92.9 ± 2.78	ст. отс	10.8 ± 0.32	25.6 ± 0.77	0.422
Растения в культуре <i>in vitro</i> , побеги									
14	30.1 ± 0.90	27.0 ± 0.81	1.114	15.3 ± 0.46	73.8 ± 2.91	0.208	2.3 ± 0.07	75.4 ± 2.26	0.038

Примечание: с – стимуляторы; и – ингибиторы; с/и – соотношение стимуляторы/ингибиторы

В апреле (начало ростовых процессов) в условиях 2005 года как в почках, так и в побегах растений, высаженных в питомник после 11 лет культивирования *in vitro*, в отличие от культивируемых 1 год, отмечен значительно больший уровень ингибиторов роста и меньший – ауксинов. Ниже у них и удельный вес стимуляторов (соотношение стимуляторы/ингибиторы) в общем балансе рострегулирующих веществ. У растений, культивируемых в течение одного года, наоборот, содержание и удельный вес ауксинов выше, чем у культивируемых *in vitro* 11 лет. В период интенсивного роста в длину (начало июля) в побегах исследованных растений сохраняется аналогичная картина. Уровень стимуляторов роста и их удельный вес также выше, а ингибиторов – ниже у растений, культивируемых *in vitro* в течение одного года. В ноябре (глубокий осенний покой) уровень ростингибирующих веществ значительно выше (как и в апреле) в почках растений, культивируемых *in vitro* 11 лет. В этот срок у них выше и содержание ауксинов, чем у растений, культивируемых один год. Однако при более высоком содержании ингибиторов, удельный вес ауксинов в общем балансе рострегулирующих веществ в ноябре в почках этих растений остается также бо-

лее высоким, чем у растений, культивируемых один год. Это в определенной степени свидетельствует о том, что физиолого-биохимические процессы, обуславливающие ростовую деятельность растения, протекают у них в осенний период более продолжительное время. Сохраняется в целом аналогичная картина и в побегах. Для побегов в этот срок также характерен более высокий уровень и удельный вес ауксинов у растений, культивируемых *in vitro* в течение 11 лет. У них при этом отмечен более низкий уровень ингибиторов роста.

Таким образом, в условиях 2005 года у растений, высаженных в питомник после одного года культивирования *in vitro*, физиолого-биохимические процессы, обуславливающие ростовую деятельность растения, начинаются и заканчиваются раньше, чем у растений, высаженных в питомник после 11 лет культивирования. Об этом свидетельствует, как показано выше, более высокий уровень и, особенно, удельный вес ауксинов, наблюдаемый у них в весенне-летний период и – меньший в период перехода растений в состояние глубокого осеннего покоя (ноябрь). У растений, высаженных в питомник после 11 лет культивирования *in vitro*, по всей видимости, физиолого-биохимические процессы (образование, передвижение, распределение рострегулирующих веществ, в частности, ауксинов) в конечном итоге иницирующие рост растений, начинаются позже и позже заканчиваются. Повидимому, растения, культивируемые *in vitro* более продолжительное время и менее длительное время находящиеся в полевых условиях, дольше сохраняют в течение годичного цикла роста и развития дерева свойства, присущие более физиологически молодому организму. Однако гормональная ситуация (больший уровень и удельный вес ингибиторов роста), в свою очередь, может свидетельствовать о более физиологически зрелом состоянии этих растений на данном этапе онтогенеза, о чем говорит и способность их к раннему цветению и плодоношению.

Гормональная ситуация в растениях, высаженных в питомник разных сроков культивирования *in vitro* (1 год, 11 лет) и растений, находящихся в пробирочной культуре в течение 14 лет, различна. Для пробирочных растений характерен наиболее высокий уровень и, особенно, удельный вес ауксинов в апреле и июле в побегах и – наименьший в листьях и побегах в осенний период. Это свидетельствует о том, что растения в пробирочной культуре находятся в более физиологически молодом (реювенилизированном, омоложенном) состоянии, чем растения, высаженные в питомник, после одного и 11 лет культивирования *in vitro*. У растений, находящихся в пробирочной культуре, установлены четкие закономерные изменения в содержании и балансе эндогенных регуляторов роста во времени: содержание и удельный вес ауксинов к периоду осеннего покоя постепенно у них снижается, а ингибиторов – возрастает. Это говорит о снижении интенсивности ростовых процессов, хотя условия культивирования остаются неизменными, что является свидетельством генетической обусловленности

данного явления, свидетельством направленного изменения гормональной ситуации, приводящей к торможению ростовых процессов независимо от условий, а сложившейся исторически.

В апреле 2009 года у растений, высаженных в питомник, отмечен индивидуальный характер гормональной ситуации. Тем не менее, направленность баланса рострегулирующих веществ, наблюдаемая в апреле 2005 года, в целом сохраняется. Более четко позволяют отметить эту закономерность средние показатели. Для почек и побегов растений, высаженных в питомник после 11 лет культивирования *in vitro*, в отличие от культивируемых 1 год, характерен, как и в 2005 году, больший уровень и удельный вес ингибиторов роста фенольной природы и меньший – ауксинов. Однако, по сравнению с 2005 годом различия по ростстимулирующим веществам у этих групп растений (1 год культивирования *in vitro* и 11 лет), особенно в почках, менее контрастны. С течением времени, в процессе роста и развития у них происходит постепенное сближение, выравнивание гормональной ситуации. В 2005 году содержание и удельный вес ауксинов в почках растений, культивируемых 1 год *in vitro*, был выше в 14.7 и 5.8 раза соответственно, чем у культивируемых 11 лет. В 2009 году эти различия менее существенны и представлены величинами порядка 1.66 (ауксины) и 1.39 (удельный вес ауксинов) соответственно.

У регенерантов (18 лет культивирования *in vitro*) в мае 2009 года по сравнению с апрелем 2005 года отмечено резкое снижение содержания ауксинов в побегах и исчезновение их в листьях. Это говорит о физиолого-биохимической разнокачественности регенерантов в различные периоды годичного цикла роста и развития, в конечном итоге, обуславливающей различную способность их к морфогенезу, что необходимо учитывать при отборе материала.

Выводы

Морфогенез растений при длительном культивировании *in vitro* регулируется, наряду с другими факторами, определенным сочетанием (балансом) эндогенных регуляторов роста индольной и фенольной природы. Культивирование *in vitro* в течение продолжительного времени (18 лет), как показывает гормональная ситуация, не снизило на данном этапе исследований ростовой и жизненный потенциал растений (пробирочная культура), что позволяет использовать микроразмноженные клоны для различных целей независимо от длительности культивирования.

Литература

1. Гупало П.И. Физиология индивидуального развития растений. – М. : Колос, 1971. – 224 с.
2. Лутова Л.А., Проворов Н.А., Тиходеев О.Н. и др. Генетика развития растений. – СПб.: Наука, 2000. – 539 с.
3. Саратуу Л.П., Кефели В.И. Фенольные соединения и рост растений // Фенольные соединения и их биологическая функция. – М.: 1969. – С.129-135.

4. Кефели В.И., Турецкая Р.Х., Коф Э.М., Власов П.В. Определение биологической активности свободных ауксинов и ингибиторов роста в растительном материале // Методы определения фитогормонов, ингибиторов роста, дефолиантов, гербицидов. – М.: Наука, 1973. – С.20-44.

Резюме

Проведено изучение эндогенных регуляторов роста у карельской березы (узорчатая форма) различной длительности культивирования *in vitro*. Выявлены различия в динамике содержания и балансе рострегулирующих веществ индольной и фенольной природы. Показана их роль в развитии растений при длительном культивировании *in vitro*.

Проведено вивчення ендогенних регуляторів росту у карельської берези (візерунчатая форма) різної тривалості культивування *in vitro*. Виявлена різниця в динаміці вмісту та балансі рістрегулюючих речовин індольної і фенольної природи. Показано їх роль в розвитку рослин при тривалому культивуванні.

Study of endogenous growth regulators in Karelian birch (figured form) of *in vitro* cultivation of different duration was carried out. There were revealed differences in dynamics of content and in balance of growth-regulating substances of indole and phenol nature. Their role in development of plants during long-term cultivation *in vitro* was shown.

САХНО Л.О., КОМАРНИЦЬКИЙ І.К., МАЙСТРОВ П.Д., КУЧУК М.В.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, Д 03680, Київ, МСП, вул. Академіка Заболотного, 148,
e-mail: sakhno2007@ukr.net*

СТВОРЕННЯ РОСЛИН РІПАКУ, СТІЙКИХ ДО ГЕРБІЦИДІВ НА ОСНОВІ ГЛІФОСАТУ, ЗА РАХУНОК ВВЕДЕННЯ СИНТЕТИЧНОГО ГЕНА *EPSPS*

Однією з чотирьох (кукурудза, соя, бавовник) серед комерціалізованих культур, стійких до гліфосату (*N*-фосфометилгліцин), є ріпак [1]. Посівні площі під ріпаком в світі за останні два роки збільшились на 4 млн. га і в 2009 році сягали понад 31 млн. га [2]. Трансгенні сорти ріпаку вирощували в США, Канаді, Австралії, Чилі [3].

За даними FAO в Україні під ріпак у 2009 році було відведено 1млн.13700 га і зібрано 30 тис. т насіння [2].

В країнах ЄС зареєстровано 5 трансгенних подій ріпаку – GT73 (Monsanto), MS8, RF3, MS8xRF3, T45 (Bayer). Подія GT73, заявлена фірмою Монсанто, характеризується стійкістю до гліфосату за рахунок експресії гена 5'-енолпируватшикіматфосфат синтази (*epsp*s) [4]. Дозвіл на її застосування дійсний до 2017 року [5].

Метою нашої роботи було створення нових трансгенних подій ріпаку на основі районованих в Україні сортів з використанням синтетичного гена енолпируватшикіматфосфат синтази для отримання рослин, стійких до гербицидів, діючою речовиною яких є гліфосат.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. В якості вихідного матеріала використовували культивовані в асептичних умовах (температура 24°C, освітлення 4000 – 5000 люкс при 16/8 г (світ/темрява) фотоперіоді) рослини трьох промислових сортів ярого ріпака – Обрій, Титан, Ексголд. Насіння передано ст.н.співробітником відділу селекції і насінництва льону та ріпаку Національного наукового центру «Інститут землеробства УААН» Слісарчуком М.В.

Agrobacterium tumefaciens-опосередкована трансформація ріпака. Трансформацію прекультивованих листових пластинок 3–4-тижневих рослин проводили за розробленою нами раніше методикою [6].

Плазміди і бактеріальний штам. В експериментах використовувалась плазміда pCB133 (рис. 1). В якості селективного задіяний ген *bar*, що надає рослинам стійкості до фосфінотрицину, діючої речовини деяких гербіцидів (BASTA).

Нічну культуру *Agrobacterium tumefaciens* (штам GV3101) нарощували в 20 мл рідкого середовища LB [7], доповненого 50 мг/л карбеніциліна та 100 мг/л рифампіцину, на качалці (180 об/хв) протягом 24 годин в темряві (24°C). Потім агробактеріальну суспензію розводили в 3 рази рідким середовищем для калусоутворення [6] та інкубували за тих же умов ще 3-4 години. Отриману суспензію використовували для інфікування.

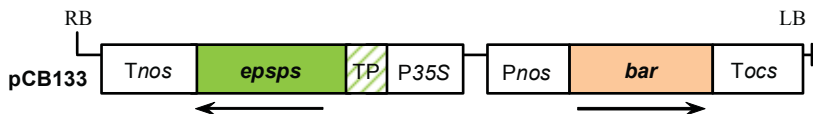


Рис. 1. Схема вектора pCB133: RB, LB- границі Т-ДНК, *Tnos* – термінатор гена нопалінсинтази, *Pnos* – промотор гена нопалінсинтази, *P35S* – промотор гена вірусу мозаїки цвітної капусти, *Tocs*- термінатор гена октопінсинтази, *TP* – транзитний пептид, *epsps* – ген енолпірувілшкіматфосфатсинтази, *bar* – ген фосфінотрицинацетилтрансферази.

ПЛР. Інтеграцію чужорідних генів в рослинний геном визначали за допомогою ПЛР. Тотальну ДНК з ймовірно трансгенних рослин виділяли з листової тканини згідно методики, запропонованої Cheung et al. [8]. Для реакції використовували 40 нг ДНК рослинного зразка, по 0,5 мкМ відповідних праймерів, по 200 мкМ кожного з трифосфатів, 1од. *Taq* ДНК-полімерази, ПЛР реакційний буфер, який мав в своєму складі 50 мМ КСl, 10мМ Tris-HCl (рН 9 при 25°C), 0,1 % Triton X-100 і 2 мМ MgCl₂. Загальний об'єм суміші дорівнював 20 мкл. Для ідентифікації гена *epsps* використовувались праймери 5'-gctgactcctcagtgcaag-3' 5'-tcgaatctagactcatcagg-3', що ампліфікують фрагмент довжиною 489 пн. Ізольована ДНК з нетрансформованих рослин (негативний контроль) і 1 нг плазмідного вектора pCB 133 (позитивний контроль) були ампліфіковані з тими ж праймерами і за тих же умов. Реакцію проводили в ампліфікаторі "Mastercycler personal" ("Eppendorf").

Використовувались наступні профілі: 94° - 1 хв, 35 циклів: 94° – 1хв, 62° – 1хв, 72° – 30 сек, потім 4 хв при 72°. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5%-ном агарозном гелі в трис-ацетатній буферній системі.

Виділення сумарної РНК. Сумарну РНК виділяли з листків рослин, для яких показано наявність цільового гена за допомогою ПЛР, згідно методики [9].

Проведення зворотньої транскрипції (ЗТ-ПЛР). Синтез першого ланцюга кДНК на матриці РНК проводили з використанням набору для проведення ЗТ-ПЛР «First strand cDNA synthesis kit» («Fermentas») за інструкцією фірми-виробника. Для кожної проби РНК проводили дві реакції – з додаванням і без додавання зворотньої транскриптази М-МuLV. Ампліфікацію і аналіз ПЛР-продуктів здійснювали, як описано для вище.

Тестування на стійкість до гліфосату. Для тестування в асептичних умовах стерильний розчин *N*-фосфометилгліцина (2,5 мг/л) додавали до безгормонального поживного середовища після автоклавування. За три тижні оцінювали коренеутворення і загальний стан рослин. В умовах закритого ґрунту проводили оприскування 3-тижневих адаптованих рослин розчином гліфосату, дію препарату спостерігали за тиждень.

Генетичний аналіз. Насіння ріпаку, отримане в результаті самозапилення створених ліній, стерильно пророщували. Проростки тестували на стійкість до фосфінотрицину, додаючи його до поживного середовища, визначаючи розщеплення за цією ознакою.

Результати і обговорення

В результаті експериментів з вектором рСВ133 отримано 17 незалежних фосфінотрициностійких ліній ріпаку трьох промислових ярих сортів, з них 7 ліній на основі сорту Ексголд, 4 лінії на основі сорту Титан, 3 лінії на основі сорту Обрій.

Введення синтетичного гена *epsps* показано за допомогою ПЛР (рис. 2А). Синтез матричної РНК продемонстрований завдяки зворотній ПЛР (рис.2Б).

Відібрані за допомогою молекулярно-біологічних аналізів серед регерованих на середовищах з фосфінотрицином (5 мг/л) лінії ріпаку були розмножені *in vitro* і проаналізовані на стійкість до гліфосату. Вихідні рослини за три тижні жовтіли, коріння не утворювалось (рис.3). Трансформанти розвивались нормально, впливу гербіциду виявлено не було.

Висаджені в умовах теплиці в ґрунт рослини легко адаптувались. За три тижні після висадки в ґрунт була проведена обробка розчином гліфосату (2,5 мг/л, препарат «Ураган Форте»). В результаті обприскування сформоване раніше листя контрольних рослин зів'яло, листочки, що були в процесі формування, набували світло-жовтого кольору. Рослини тестованих первинних трансформантів ліній Bn15/133/2, Bn15/133/4, Bn18/133/1, Bn18/133/2, Bn18/133/11 не мали ознак вододефіциту після обробки гербі-

цидом. Молоді листочки формувались зеленого кольору, листовая пластинка другого від апексу листа розвивалась і набувала за час після обробки майже втричі більшої площі, ніж у контрольних рослин. Одна з аналізованих ліній, Bn15/133/3, загинула після оприскування гліфосатом, що може свідчити про низьку експресію введеного гена *epsps*.

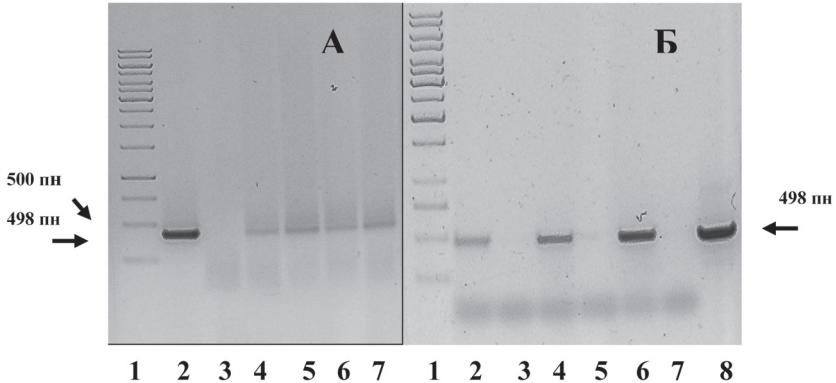


Рис.2. А – Результати ПЛР на наявність гена *epsps* в трансформованих рослинах ріпаку сорту Обрій: 1 – маркер молекулярної ваги; 2 – ДНК вектора рСВ133, 3 – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини ріпаку, 4-7 – незалежні трансгенні лінії Bn18/133. Б – 3Т-ПЛР трансформованих рослин ріпаку: 1 – маркер молекулярної ваги; 8 – ДНК вектора рСВ133, позитивний контроль; 3, 5, 7 – продукти ампліфікації незалежних ліній трансгенних рослин ріпаку після синтезу першого ланцюга ДНК без додавання ревертази (негативний контроль); 2, 4, 6 – продукти ампліфікації тих самих ліній рослин після синтезу першого ланцюга ДНК з додаванням ревертази.

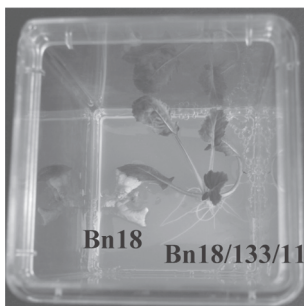


Рис.3. Ріст на безгормональному середовищі з гліфосатом (2,5 мг/л, препарат “Ураган Форте”) рослин контрольної (Bn18) і трансгенної (Bn18/133/1) ліній ріпаку.

З рослин, що витримали обробку гербіцидом, було отримано насіння в результаті самозапилення. Його стерильно пророщували на середовищах з додаванням фосфінотрицина (10 мг/л). У рослин лінії Bn15/133/4 розщеплення за ознакою стійкості до селективного агента не спостерігали, що го-

ворить о встроюванні більш, ніж однієї копії трансгена. Для рослин лінії Bn15/133/2 виявлено розщеплення 3:1, що свідчить про однокопійну вставку чужорідного гена. Стейки до фосфінотрицина проростки T₁ покоління лінії Bn15/133/2 було розмножено *in vitro* і висаджено в теплицю, загалом десять ліній. При аналізі отриманого при самозапиленні насіння виявлено шість гомозиготних ліній за ознакою стійкості до фосфінотрицина. Обробка висаджених в закритий ґрунт рослин двох з цих ліній (T₂Bn15/133/2/3 і T₂Bn15/133/2/5) показала, що вони зберігають ознаку стійкості до гліфосату.

Висновки. Отримано 17 незалежних трансгенних ліній ріпака трьох промислових ярих сортів. Вони поєднують в собі стійкість до гербіцидів на основі фосфінотрицина (BASTA) за рахунок експресії гена *bar* і гербіцидів на основі N-фосфонометилгліцина (Roundup) завдяки функціонуванню синтетичного гена *epsps*.

Робота виконувалась в рамках проекту «Біотехнологічні рослини ріпаку з підвищеною продуктивністю за рахунок експресії гетерологічних генів як сировина для виробництва біодизеля» цільової комплексної програми наукових досліджень НАНУ “Біомаса як паливна сировина” (“Біопалива”) (№ держреєстрації 0110U005296).

Література

1. *Cerdeira A.L., Duke S.O.* The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops: a review // J. Environ. Qual. – 2006. – **35**. – P. 1633 – 1658.
2. <http://faostat.fao.org/site/537/default.aspx#ancor>
3. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/42/executivesummary/default.html>: ISAAA Brief-42-2010: Executive summary.
4. *WO02/36831 Canola event pv-bngt04(rt73) and compositions and methods for detection thereof/ Krieb; Rachel; Zeng; Qingyi* – PCT filed October 22, 2001. PCT pub. Date May 10, 2002.
5. EU register of genetically modified food and feed. Oilseed rape GT73. Art. 8(1) (a),(b) and 20(1)(b) of the Regulation (EC) No 1829/2003 Article 19(3) of Directive 2001/18/EC.
6. Пат. *39205 UA 51 МПК А01Н1/00; А01Н4/00; А01Н5/00; С12Н1/00; С12Н5/00; С12Н15/00*. Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації/ Гочева С.А., Сахно Л.О., Кучук М.В. – Заявл. 03.10.2008. Публ. 10.02.2009, бюл. № 3.
7. *Маніатіс Т., Фріч Е.Ф., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. – 1984. – 521 с.
8. *Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S.* A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // PCR Meths Applics. – 1993. – 3. – P. 69 – 70.
9. *Logermann J., Schell J., Willmitzer L.* Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // Analytical Biochemistry. – 1987. – 163. – P. 16 – 20.

Резюме

За рахунок введення синтетичного гена *epsps* шляхом *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації листових дисків асептичних рослин

отримано 17 ліній ярого ріпаку, створених на основі трьох районуваних сортів (Ек-сголд, Титан і Обрій). Молекулярно-біологічні аналізи показали встроювання гена в ядерну ДНК ріпаку (ПЛР) і його активність на рівні транскрипції (ЗТ-ПЛР). Стійкість рослин до гербіциду Ураган Форте (діюча речовина – *N*-фосфометилгліцин) показана як в умовах *in vitro*, так і при вирощуванні в закритому ґрунті первинних трансформантів, рослин T₁ і T₂ поколінь.

За счёт введения синтетического гена *epsps* путём *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации листовых дисков асептических растений получено 17 линий ярового рапса, созданных на основе трёх районированных сортов (Эксголд, Титан и Обрий). Молекулярно-биологические анализы показали встраивание гена в ядерную ДНК рапса (ПЦР) и его активность на уровне транскрипции (ОТ-ПЦР). Устойчивость растений к гербициду Ураган Форте (действующее вещество – *N*-фосфометилглицин) показана как в условиях *in vitro*, так и при выращивании в закрытом грунте первичных трансформантов, растений T₁ и T₂ поколений.

Seventeen spring canola lines were created on the basis of three varieties (Exgold, Titan and Obrij) as a result of synthetic *epsps* gene introduction by *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of leaf disks from aseptic plants. Molecular-biological analyses confirmed *epsps* gene integration in nuclear DNA of canola (PCR) and his activity at the level of transcription (RT-PCR). Resistance of plants to herbicide Uragan Forte (active substance – *N*-phosphonomethylglycine) shown both in the conditions of *in vitro* and at growing in greenhouse of primary transformants, T₁ and T₂ plants.

СЕКАН А.С., СОРОЧИНСЬКИЙ Б.В., ІСАЄНКОВ С.В.

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України

Україна, Київ, 04123, вул. Осиповського 2-а, e-mail: ehirta3@gmail.com

ДОСЛІДЖЕННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ТРАНСПОРТУ БІЛКІВ У ПРОТОПЛАСТАХ РОСЛИН ТРАНСФОРМОВАНИХ СПЕЦИФІЧНИМИ ДНК GFP ВЕКТОРАМИ

В останні роки в клітинах рослин ідентифіковано багато шляхів сигнальної та секреторної передачі молекул. Однак, не до кінця вивченими залишаються процеси сортування молекул перед початком пізнього ендомембранного трафіку після апарату Гольджі (пост-Гольджі транспорт), визначення шляху яким буде транспортуватись той чи інший об'єкт та роль ферментів при доставці метаболітів до органели призначення. Значна кількість транспортованих молекул в рослинних клітинах спрямовується до вакуолей за допомогою ендомембранного трафіку, який є основним, або іншими, Гольджі-незалежними шляхами [1].

В еукаріотичних клітинах здійснення транспортної функції та локалізації одно- та двомембранних органел, різноманітних надмолекулярних комплексів та забезпечення структурного каркасу цитоплазми відбувається за допомогою динамічного утворення клітини – цитоскелету (ЦС). Рух багатьох органел, таких як компоненти апарату Гольджі (АГ) [2], пероксисоми [3] та мітохондрії [4] вздовж актинових філаментів та мікротрубочок є части-

ною загального явища – активного руху цитоплазми, обумовленого діяльністю цитоскелету. Різноманітність моторних білків, задіяних в транспортуванні внутрішньоклітинних елементів, допомагає і регулює формування та організацію ЦС, забезпечує контроль їх збірки в просторі та часі. Білки, які безпосередньо пов'язані із мономерами та полімерами цитоскелету рослини, є представниками класу малих гуанін-нуклеотид-зв'язуючих та – гідролізуючих білків (ГТФази), що походять із родини Rac/Rho [5] і приймають участь в регулюванні архітектури актинового каркасу. Окрім цього, представники підродина Arg, – Sar, ARF, ARF-подібні ARL ГТФази та ін., приймають участь в процесах формування та дозрівання везикул від ендомембранної системи клітини. ARF ГТФази асоціюються із клатрином, а також СОPI-везикулами, в той час, як формування везикул, вкритих СОPII, ініціюється ГТФазами із підродина Sar [6]. ГТФази ARF та SAR1 контролюють процес формування мембрани в процесі дозрівання везикул. ГТФази SAR1, SEC23 та SEC12 функціонують із залученням цих двох факторів у дріжджів та тварин, але у рослин взаємозв'язок між ГТФазами SEC23 і SEC12 та білками GAP та GEF є ще досі не встановленим [7].

В еукаріотичних клітинах АГ є центральним компартментом для здійснення процесів опосередкованого везикулярного транспорту та одним із основних донорів мембранних компонентів для інших органел клітини, насамперед – для плазмалем та вакуолей. Транспорт везикул, який здійснюється як в напрямку від АГ, так і навколо нього, передбачає наявність точних та комплексних механізмів для забезпечення відокремлення везикул, їх транспортування до місць призначення та злиття із мембранами інших органел. В еукаріотичних клітинах транспорт від АГ здійснюється за допомогою мікротрубочок та асоційованих із ними моторних білків. Апарат Гольджі постійно зосереджений навколо центра організації мікротрубочок, який і підтримує АГ. В клітинах, де цитоскелетні структури не є необхідним елементом для просторового розташування мембран АГ в середині цитоплазми (Protozoa), цей утвір сформований суміжно із сайтами виходу ЕР. В деяких клітинах в проміжках між ЕР та мембранами АГ спостерігається формування перших цистерн, а транспорт метаболітів здійснюється за допомогою невідбиркової дифузії [8]. В клітинах рослин спостерігається подібна організація у взаємозв'язку між ендоплазматичним ретикуломом та апаратом Гольджі, оскільки тут також немає проміжних компартментів між ЕР та АГ, а відстань між цими двома органелами є незначною. Цистерни апарату Гольджі у клітинах вищих рослин не є динамічними, як, наприклад, у більшості мохів, таких як *Chlamydomonas*. Існує багато моделей, за допомогою яких намагаються описати забезпечення зберігання синтезованих білків при перенесенні від ЕР до мобільних елементів Гольджі [9], але жодну з них не можна пов'язати із зворотнім (ретроградним) трафіком від АГ до ЕР.

Везикули, як основний елемент, задіяний у внутрішньоклітинному транспорті, за складом покриву розподіляють на три типи. Перший тип – покриті клатрином везикули (CCV, clathrin coated vesicles), були визначені як найбільш поширені структури в рослинних клітинах. Інші два типи, вкриті коатомерним покривом везикули I та II типу (COPI та COPII). При формуванні транспортних везикул на донорних органелах, окрім основних білків покриву залучаються деякі додаткові білки, кожен з яких є специфічним для забезпечення певного виду транспорту. У випадку синтезу поліпептидів, що формують везикули від апарату Гольджі, відзначено, що різні типи пухирців утворюються в одному із компарментів органели – TGN (trans-Golgi Network), де кожен тип везикул відповідає за відсортовані окремо метаболіти, призначені для різних типів вакуоль, превакуолярних структур або до плазматичної мембрани [10].

Процес транспорту білків включає декілька етапів. Перший етап розпочинається у ендоплазматичному ретикулумі, де білки переміщуються вздовж ER-мембрани до її проміжків, попередньо відсортовуються та відповідно упаковуються у транспортні везикули для подальшої передачі до апарату Гольджі. Згодом, синтезовані молекули передаються через АГ до TGN, де білки, які є призначеними для вакуоль, відсортовуються від білків, призначених для секреції або для локалізації у плазматичній мембрані. Білки, що рухаються в протилежному (ретроградному) напрямку, мають на меті відновлення та перетворення як власної структури так і механізму їх залучення в антероградний транспорт. На шляху перенесення об'єктів між основними компартаментами, залучаються також проміжні утворення, такі як превакуолярна структура (у випадку, якщо вантаж призначений для вакуоль) у рослин.

Об'єкти, які потрапляють всередину клітини шляхом везикулярного ендцитозу, залучаються до ендосомальних везикул та прямують до TGN чи повертаються назад, до плазматичної мембрани. Молекули, які направлені на перероблення, при потрапленні до превакуолярного компартменту, змішуються із вантажем антероградного трафіку, що також прямує до вакуоль. Виходячи з факту двонаправленості руху везикул між органелами, виникає необхідність окремого пакування вантажу у різні везикули із відповідними покривами. Після синтезу, модифікації або потраплення на ER поліпептиди рухаються далі за напрямком секреторного шляху. Білки, призначені для АГ, відсортовуються у різні субдомени в ER, де концентруються, пакуються та доставляються до поверхні мембрани під контролем малих ГТФаз SAR1. Перед етапом пакування об'єкти перенесення обов'язково походять перевірку за допомогою системи контролю якості ER білків (ERQC, ER protein quality control), яка сортує, зберігає та елімінує нестандартні форми поліпептидів [11].

На перших етапах пост-Гольджі ендомембранного транспорту рослинний TGN, на відміну від тварин та дріжджів, залучається не лише у сек-

реторний трафік, а й виступає в ролі ранньої ендосоми. Рослинні клітини містять множинні мультівезикулярні тільця (МВТ), які виконують функцію превакуолярних компартментів, що є аналогом тваринних пізніх ендосом. Загалом, пост-Гольджи ендосомальний транспорт виконується за схемою TGN/рання ендосома, або МВТ/превакуолярний компартмент/пізня ендосома та вакуоля. Рослинні клітини можуть мати додаткові компартменти внутрішньоклітинного транспорту, які важко ідентифікувати, наприклад, АДФ рибозильований фактор-GEF (ARF-GEF) GNOM, що не локалізуються в TGN або в МВТ. Після виходу із апарата Гольджі та перенесення до TGN об'єкти перенесення сортуються для подальшого транспорту до цільових органел.

Пізній транспорт (перенесення вантажу у пост-Гольджи ендомембранній системі) після виходу із TGN виконується за допомогою CCV. При дозріванні везикул відбувається активація ARF ГТФаз, які приймають участь в контролюванні вакуолярного типу трафіку білків до літичних вакуолей. В процесах зв'язування, доставки та злиття мембран везикул із цільовою органелою також приймають участь RAB ГТФази, їх регулятори, ефектори та білки родини SNARE, так звані «стикуючі» білки. Ці білки представлені на везикулах та цільових мембранах і здійснюють механізм розпізнавання, приєднання та проникнення перенесених молекул в середину цільової органели. У *Arabidopsis thaliana* знайдено та проаналізовано великі родини білків RAB та SNARE, залучених у процес пізнього транспорту [12]. Деякі білки після виходу із TGN здатні обминати превакуолярні компартменти на шляху до вакуоль. Білки, які переносяться альтернативним шляхом є упакованими у везикули, де на поверхні знайдені адаптерні комплекси білків III типу – специфічні послідовності, характерні для CCV, але у даному випадку залучаються у процес формування коатомерних покривів. Під час транспорту альтернативним шляхом білки не проходять такі органели як апарат Гольджі. Такі білки не мають канонічних сигнальних послідовностей, а у випадку оброблення клітин хімічними інгібіторами (наприклад, брефелдином А) не припиняють рух секреторного шляху. «Некласична» секреція є загальною для всіх еукаріотів, включаючи рослини, хоча ще й не до кінця зрозуміла.

Зараз є розробленими методи детального дослідження везикулярних популяцій в клітинах, які базуються на аналізі протеому та метаболому рослин, які дозволять пояснити механізм роботи цих органел. В останні роки методи протеоміки були успішно використані для характеристики білкового складу таких органел, як мітохондрії, хлоропласти, апарат Гольджі та вакуолі. Було ідентифіковано білковий склад в окремих везикулах за допомогою протеомного аналізу [13]. Проте, аналіз специфічних везикул за допомогою методів протеоміки є все ще у стадії розвитку і залишається ряд невирішених завдань, таких як ідентифікування та розподілення об'єктів вантажу потребує розроблення везикуло-специфічних методів. Виникає складність

із виділенням та накопиченням везикул у великих кількостях, а отже й ампліфікування білків – зростає значення чутливості методів підібраних методів. Протеомний аналіз повинен бути паралельним із метаболомним для визначення частки метаболітів, асоційованих із білковим вантажем, окремо транспортованих метаболітів та точне місце їх доставки.

Для дослідження внутрішньоклітинного ендосомального транспорту білків ми пропонуємо дослідити роль цитоскелету у альтернативному та основному трафіках за допомогою трансформованих протопластів рослинних клітин специфічними ДНК векторами із флуоресцентними GFP (Gene Fluorescence Protein) маркерами до окремих органел клітини із подальшим інгібуванням цитоскелетних структур за допомогою таких стабілізуючих та деполімеризуючих агентів мікротрубочок, як таксол та орізолін. Наступним етапом експерименту планується за допомогою конфокальної скануючої мікроскопії дослідити механізм транспорту новосинтезованих мічених GFP білків, специфічних до таких органел, як ендоплазматичний ретикулум, апарат Гольджі, протеїнзберігаючі та літичні вакуолі, а також GFP конструкції, що кодують білки, характерні для АГ-незалежного трафіку. Запропонований підхід на нашу думку дозволить дослідити та проаналізувати альтернативні шляхи транспорту білків у клітинах рослин та зрозуміти механізми цього процесу.

Література

1. *Zouhar J, Rojo E.* Plant vacuoles: where did they come from and where are they heading? *Curr Opin Plant Biol.* 2009, Vol. 12, p. 677–684
2. *Boevink P, Oparka K, Cruz SS, Martin B, Betteridge A, Hawes C.* Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 1998, Vol.15, p. 441–7
3. *Mathur J, Mathur N, Hülskamp M.* Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiol* 2002, Vol.128, p. 1031–45.
4. *Van Gestel K, Kohler RH, Verbelen JP.* Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules. *J Exp Bot.* 2002, Vol.53, p. 659–67.
5. *BurrIDGE K, Wennerberg K.* Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004, Vol.116, p. 167–79.
6. *M.J. Paul, L. Frigerio* Coated vesicles in plant cells / *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2007, Vol. 18, p. 471–478
7. *Sato K, Nakano A:* Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett* 2008, Vol. 581, p. 2076-2082
8. *Lippincott-Schwartz J.* Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics. *Curr.Opin.Cel. Biol.* – 1998, V.10, p. 52 – 59.
9. *Hanton SL, Bortolotti LE, Renna L, Stefano G, Brandizzi F:* Crossing the divide — transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plants. *Traffic* 2005, 6:267-2
10. *Batley, N.H., James, N.C., Greenland, A.J., and Brownlee, C.* Exocytosis and endocytosis. *Plant Cell* 1999, Vol.11, p. 643–659.

11. *Ceriotti A.* Waste disposal in the endoplasmic reticulum, ROS production and plant salt stress response. *Cell Research*, (2011) :1 – 3

12. *Hanton SL, Chatre L, Matheson LA, Rossi M, Held MA, Brandizzi F.* Plant Sar1 isoforms with near-identical protein sequences exhibit different localisations and effects on secretion. *Plant Mol Biol* 2008, Vol. 67, p. 283-294.

13. *Rosado A., Raikhel N.V.* Understanding Plant Vacuolar Trafficking from a System Biology Perspective. *Fut Perspect Pla. Biol.* 2010., Vol. 154, p. 545 – 550.

Резюме

Процесу транспорту метаболітів у клітинах рослин приділяється велика увага, однак, багато питань все ще залишаються не з'ясованими. Одним із таких питань є участь альтернативних (що не проходять крізь апарат Гольджі) шляхів перенесення білків. Пропонується дослідити та проаналізувати роль елементів цитоскелету у формуванні альтернативних шляхів внутрішньоклітинного транспорту.

It has received much attention to the processes of the intracellular traffic in plant cell, however many questions are still remained to be determined. One of the main problems is how the mechanisms of alternative pathway proteins traffic (which does not pass through the Golgi apparatus) are working. The main aim of this article is to study and analyze the role of cytoskeletal elements in the formation of alternative routes of intracellular transport.

Процесу транспорту метаболітів в растительных клетках уделяется большое внимание, хотя много вопросов все еще остаются невыясненными. Один из таких вопросов – участие альтернативных (которые не проходят через аппарат Гольджи) путей перенесения белков. Предлагается исследовать и проанализировать роль элементов цитоскелета в формировании альтернативных путей внутриклеточного транспорта.

**СЕМЕНОВА В.А., КАРПЕЧЕНКО К.А., КАРПЕЧЕНКО Н.А.,
ЗЕМЛЯНУХИНА О.А.**

*ФГУП Научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции (НИИЛГуС),
Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: victoria.semenova@gmail.com*

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ DAPHNE CNEORUM L. (DAPHNE JULIA K.-Pol.) В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Метод клонального микроразмножения имеет преимущества перед традиционными способами размножения. Это получение генетически однородного посадочного материала, свободного от вирусов; высокий коэффициент размножения растений, трудноразмножаемых традиционными методами; возможность проведения работ в течение круглого года и некоторые другие. Метод заключается в способности развиваться по генетической программе, присущей данному растению, и образовывать новые органы (почки, побеги, корни), из которых в дальнейшем регенерируют полноценные растения.

Выбор *Daphne sneorum* L. (*Daphne julia* K.-Pol.) в качестве объекта исследования продиктован необходимостью сохранения вида, занесенного в Красную Книгу Российской Федерации. Данный вид относится к редким эндемикам флоры России. В Воронежской области он весьма успешно интродуцирован в Ботанический сад Воронежского госуниверситета.

В результате детального анализа литературных данных не было обнаружено работ по микрореклональному размножению *D. julia*.

Целью работы было создание безвирусной коллекции клонов *Daphne sneorum* L. (*Daphne julia* K.-Pol.) для сохранения ценных генотипов охраняемого растения *in vitro* и ускорения процесса воспроизведения трудно размножающегося вида. Для ее достижения выполнялись следующие этапы:

1. Выявление оптимального метода стерилизации;
2. Оптимизация питательных сред, необходимых для достижения максимальной скорости роста;
3. Индукция ризогенеза.

Материалы и методы

Характеристика объекта исследования

Исследования проводились на *Daphne sneorum* L. (*Daphne julia* K.-Pol.) (Волчегоднике боровике, или Юлии). Данное растение относится к семейству *Thymelaeaceae* (Волчниковые), насчитывающее в своем роду около 50 листопадных, полу- и вечнозеленых видов, обитающих в Европе, Азии и Северной Африке (Маевский П.Ф., 2006).

Типичным ареалом обитания указанного растения являются горы средней и южной Европы. На территории Центрального Черноземья изредка встречается в Курской и Брянской областях в степях, по степным склонам с меловой подпочвой, меловыми обнажениями, реже по борovým пескам. Экология данного растения такова – это низкорослый вечнозеленый кустарничек, редко превышающий 20 см высоты. В диаметре до 2 м, с ветвями, покрытыми темно-бурой корой. Листья кожистые длиной 0.8-2 см, многолетние, кожистые, обратнойцевидные, сверху темно-зеленые, снизу сизоватые, собраны на верхушке ветвей в розетки. Цветет в мае – июне, после разворачивания листьев розовыми или вишнево-розовыми зонтиковидными соцветиями на верхушке ветвей. Иногда возможно повторное цветение во второй половине лета изредка белыми цветками, до 1 см длиной. В зонтиковидном на длинном цветоносе соцветии собрано по 6-20 цветков, источающих сильный, приятный (ванильный) аромат. Цветы покрывают куст почти полностью. Плоды-костянки – кожистые, желто-бурого цвета. Растет медленно, прирастая за год на 3-7 см. Светолюбив. Зимостоек. Произрастает в ряде ботанических садов (данное растение было нам любезно предоставлено Ботаническим садом Воронежского государственного университета).

Размножают *D. julia* свежесобранными семенами либо полуодревесневшими черенками, которые укореняют в первой половине лета. Пересадку волчегодники переносят тяжело.

В сентябре двухлетнее растение *D. julia* из открытого грунта было переведено в условия произрастания с закрытой корневой системой с контролируемыми условиями температурного и светового режимов. Было выявлено, что оптимальной температурой для роста дафны является 26°C выше нуля, а также стандартные световые условия (16-часовой фотопериод). Спустя 3 месяца можно было наблюдать обильно цветущее растение с множеством ювенильных побегов.

Дальнейшая работа проводилась с верхушечными (ювенильными) побегами *D. julia*. По достижении длины 3-5 см от них отрезали апикальную часть и стерилизовали.

Стерилизация растительного материала.

С целью получения жизнеспособных эксплантов дафны были проведены 3 варианта обработки верхушечных (ювенильных) участков стебля. Начальной стадией первых двух вариантов являлась 20-минутная промывка проточной водой для удаления сапрофитной микрофлоры. Последующие стадии включали: в первом варианте стерилизацию обработку мертиолятом (0.015%) и бытовым отбеливателем «Белизной» (4%); во втором варианте – этиловым спиртом (96%). Третий вариант стерилизации включал обработку только 96% этиловым спиртом. После стерилизации экспланты отмывали стерильной дистиллированной водой в течение 10 мин. на качалке.

Концы проростков подрезали, нарезали на отрезки с 3-4 междоузлиями и помещали в стерильные контейнеры на питательные среды MS и ВТМ, различающиеся по количественному составу макросолей и сахарозы, гормонов и активированного угля.

Субкультивирование

Субкультивирование, микрочеренкование и укоренение проводили на питательных средах вышеуказанного состава.

Результаты и обсуждение

В НИИ лесной генетики и селекции работы по микроклональному размножению ведутся с начала 80-х годов прошлого столетия. В результате многолетних исследований проведено успешное размножение карельской березы, осины, разных тополей, дуба черешчатого, ивы. Кроме древесных растений, сохраняемых в виде длительно культивируемых растущих коллекций, сотрудниками лаборатории генетики размножены и сохраняются более 160 сортов петуний, 15 сортов калибрахоа, нескольких десятков сортов сенполии, картофеля, каламондин и другие культуры.

При микроклональном размножении дафны мы столкнулись с проблемой витрификации растительного материала, как на начальных, так и на более поздних этапах клонирования. Было предположено, что явление связано со стерилизацией первичных эксплантов. Поэтому на первой стадии работы исследовались различные варианты получения стерильных растений. Так, было показано, что при стерилизации мертиолятом в сочетании с «Белизной» наблюдается 100%-ная витрификация растений, они практически

ки не растут и со временем погибают. Аналогичное явление наблюдалось и при стерилизации, включающей удаление сапробитов путем длительного промывания проточной водой с последующей обработкой неразбавленным этиловым спиртом. И только третий вариант стерилизации – кратковременное погружение растений в 96% спирт – оказался оптимальным для *D. julia*. При этом растения давали 100% выживаемость и полное отсутствие витрификации. Данные представлены в таблице. Данный факт позволяет предположить, что удлинение процедуры приводит к излишнему обводнению растений и, как следствие, вызывает процесс витрификации эксплантов *D. julia*.

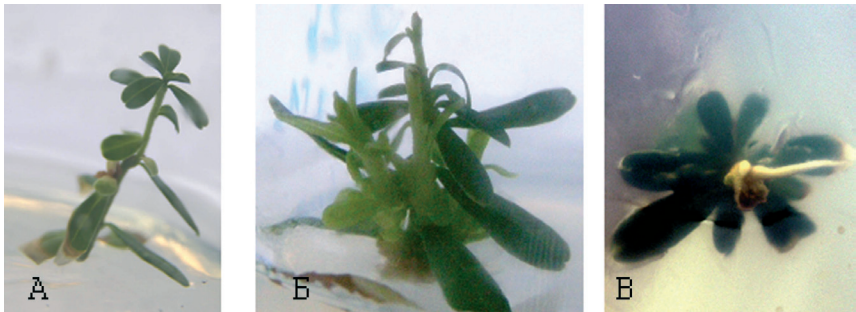
Стандартная методика микроклонального размножения требует использования гормонов роста хотя бы на первых стадиях введения эксплантов в условия *in vitro*. Не избежали таких исследований и мы. Так, с целью удлинения пробирочных растений и увеличения коэффициента мультипликации была использована низкосолевая среда ВТМ, дополненная 0.2 мг/л БАП и 0.1 мг/л ГА₃. После разрастания базальной части экспланта начинается рост адвентивных побегов по типу куста, достигающий в течение 3 недель количества 3-5 штук на микрорастение. Побеги изолируют и помещают либо на безгормональные среды, либо на дальнейшее размножение на ВТМ, дополненную вышеуказанными гормонами (рис.).

Таблица

Влияние метода стерилизации и состава питательных сред на процесс витрификации *D. julia*

Состав питательных сред	Метод стерилизации		
	Длительная промывка проточной водой с дальнейшей обработкой:		Стерилизация только 96% спиртом
	мертиолятом + безлизой	96% спиртом	
MS	100% витрификация	100% витрификация	0% витрификация
½ MS	100% витрификация	100% витрификация	0% витрификация
¼ MS	100% витрификация	100% витрификация	0% витрификация
½ ВТМ 0,2 БАП + 0,1 ГА ₃	100% витрификация	100% витрификация	0% витрификация

Предыдущий опыт работы позволил также использовать для микроклонального размножения среду MS без гормонов роста для оптимизации условий выращивания и снижения появления соматклональной изменчивости. Использовались среды с уменьшенным вдвое или вчетверо количеством макросолей и сахарозы с добавлением или без 0.3% активированного угля (рис.).



А – экплант на среде $\frac{1}{4}$ MS; В – экплант на среде BTM, дополненной 0.2 мг/л БАП и 0.1 ГА₃; С – начало корнеобразования на безгормональной среде $\frac{1}{4}$ MS

Рисунок – Культивирование *D. julia* на средах разного состава

Было обнаружено, что, во-первых, удлинение растений на безгормональных средах превышает их рост на среде с гормональными добавками. Во-вторых, элонгация на среде $\frac{1}{4}$ MS превышает рост на $\frac{1}{2}$ MS. Максимальный месячный прирост на данной среде составил 2-3 см, что в несколько раз превышает величину прироста в условиях открытого грунта. После удлинения микрочеренки разрезали на 1-2 см сегменты и помещали на среды того же состава (рис.).

Укоренение экплантов происходило спонтанно в течение 3 недель на всех типах безгормональных сред: с активированным углем или без него, на $\frac{1}{2}$ или $\frac{1}{4}$ по макросолям MS (рис. 1).

Необходимо отметить, что экпланты, содержащие верхушечную точку роста росли несколько медленнее, по сравнению с экплантами, не имеющими последней. Часто наблюдалось явление апикального усыхания, характерное для размножения дуба черешчатого. Поэтому для лучшего размножения дафны необходимо использовать первичные экпланты с отрезанным апексом.

Выводы

Предложенный способ микроклонального размножения дафны выгодно отличается отсутствием гормонов роста на всем протяжении цикла и сниженным содержанием сахарозы в питательных средах, что способствует уменьшению риска возникновения соматоклональной изменчивости и удешевлению процесса тиражирования больших объемов растения. Размножение *D. julia* осуществляли в культуре стеблевых ювенильных экплантов.

Изучение особенностей введения в культуру *in vitro* *D. julia* К.-Pol. имеет большое значение и по другим причинам. Вот лишь некоторые из них: данное растение относится к редким эндемикам флоры России, занесенным в Красную Книгу РФ. Кроме того, оно содержит различные соеди-

нения (включая биологически активные вещества), которые находят широкое применение, например в фармакологии (Alev Tosun, 2006).

Применение метода микроклонального размножения позволит решить актуальную проблему сохранения и быстрого воспроизведения *D. julia*. Авторами разработан выбор первичных эксплантов, их 100%-ная стерилизация, длительное микрочеренкование и укоренение на относительно дешевых безгормональных питательных средах.

Литература

1. *Маевский, П.Ф.* Флора средней полосы европейской части России, 10-е издание / П.Ф. Маевский // М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 600 с.

2. *Tosun, A.* Chemical constituents and biological activities of *Daphne L. Species* / Alev Tosun // J. Fac Pharm. – 2006. – V.35, N1. – P. 43-68.

Резюме

Предложен полностью безгормональный способ микроклонального размножения кустарничка, занесенного в Красную Книгу РФ, – *Daphne sneorum L.* (*Daphne julia K.-Pol.*). Выявлено, что методика стерилизации существенно влияет на процесс витрификации и дальнейшего размножения стеблевых эксплантов. Подобран оптимальный состав питательных сред для максимальной элонгации, увеличения коэффициента мультипликации и укоренения растений.

Заявлено повністю безгормональний спосіб мікроклонального розмноження кустарничка, занесеного в Червону Книгу РФ – *Daphne sneorum L.* (*Daphne julia K.-Pol.*). Виявлено, що методика стерилізації дуже впливає на процес вітрифікації та подальшого розмноження стеблових експлантів. Підбрано оптимальний склад поживних середовищ для максимальної елонгації, підвищення коефіцієнта мультиплікації та укорінення рослин.

Proposed the way to completely without hormonal micropropagation of bushes included in the list of protected by the Federal Endangered Species Act of the Russian Federation – *Daphne sneorum L.* (*Daphne julia K.-Pol.*). Revealed that the method of sterilization significantly affects the process of vitrification and further multiplication of the stem explants. Choused the optimal composition of nutrient media for the maximum elongation, increase in the coefficient multiplication and rooting of plants.

СЛЕПЯН Л.И., КАУХОВА И.Е., ГРОМОВА О.Н., КУЗЬМИНА Н.В

Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия.

Россия. 197347 Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14, e-mail: plcell@spcpa.ru

К ИСТОРИИ БАНКА КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЙ ХИМИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКАДЕМИИ

В биотехнологии решение задач по созданию принципиально новых лекарственных препаратов с заданными свойствами, возможно путем создания комплексных программ, предусматривающих объединение ученых и специалистов различных специальностей. Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия (СПХФА) является одним

из старейших высших учебных заведений в РФ, выпускающих специалистов для фармацевтической и микробиологической промышленности. Возможно поэтому в 1961 г под руководством проф. Адель Федоровны Гаммерман и чл. корр. АН СССР Раисы Георгиевны Бутенко в ЛХФИ была организована одна из первых в СССР группа по культивированию *in vitro* клеток ценных и редких лекарственных растений. Ими явились женьшень *Panax ginseng* С.А. Меу. и тропическое растение раувольфия *Rauwolfia serpentina* Benth. Женьшень, потому что его целебные свойства известны уже более 4000 лет, в природе женьшень практически истреблен и внесен в “Красную книгу”, а раувольфия не растет на территории России, но содержит ценные алкалоиды, из которых получают лекарственные препараты, поступающие в Россию только по импорту.

В 1961 г благодаря коллекции растений семейства аралиевых проф. И.В. Грушвицкого в Ботаническом саду РАН, Спб. в ЛХФИ впервые были получены штаммы не только женьшеня, но панакса пятилистного *Panax quinquefolius* L., японского женьшеня *P. japonicus* L., а в дальнейшем (1985 г.) другого растения из семейства аралиевых полисциаса папоротниколистного *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey [1].

В 1989 г в ЛХФИ впервые из клеток женьшеня был получен первый биотехнологический препарат “Биоженьшеня, настойка” и доказано в клинике, что препарат обладал стимулирующим и тонизирующим действием, свойственным женьшеню, но также оказывал антидиабетический и гепатопротективный эффекты.

Из биомассы клеток раувольфии д. фарм. наук А.Г. Волосовичем и проф. С.А. Мининой были получены ценнейший препарат аймалина и его производного – N –пропилаймалинбромид, который обладал противоритмическим эффектом [2]. Для 80-х годов это были первые не только в России, но и в мире биотехнологические лекарственные препараты, прошедшие не только клинические испытания, но имеющие промышленные производства на территории СССР.

В конце 80-х начале 90-х годов пришла перестройка, стали самостоятельными государствами многие республики, закрылись цеха, гибли штаммы и коллекции. Однако, в СПХФА коллекцию не только сохранили, но и получили новые штаммы. Используя клетку, как модель живой системы, были получены селективные штаммы женьшеня, панакса пятилистного и полисциаса, содержащие, ценный микроэлемент германий. Впервые из биомассы селективного штамма женьшеня был получен препарат ПАНАК-СЕЛ[®] и проведены его доклинические и клинические испытания в ведущих клиниках Москвы и Санкт-Петербурга. Исследованиями было подтверждено, что препарат помимо адаптогенных свойств, обладал высокой иммуномодулирующей активностью, связанной с индукцией γ -интерферона, оказывал стойкий антиканцерогенный и гепатопротекторный эффекты. Это был второй не только в России, но и в мире лекарственный препарат, получен-

ный на основе биотехнологии клеток женьшеня. В 2003 г препарат ПАНАСЕЛ[®] был награжден Дипломом и Золотой медалью Министра промышленности, науки и технологий РФ.

Учитывая особенности технологии культивирования селективных штаммов и, свойства шрота, в СПХФА был получен растительный энтеросорбент ПАНАСОРБ[®], который прекрасно выводил из организма не только радиоактивный стронций, но также свинец и ртуть. ПАНАСОРБ[®] награжден ДИПЛОМОМ и ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ им. И.И. Мечникова за практический вклад и укрепление здоровья нации.

Панакс пятилистный, произрастающий в Канаде, является одной из основных культур, составляющих главную статью экспорта в этой стране. Этому растению посвящаются Международные Конгрессы и Симпозиумы (Канада, 1994., Ю. Корея, 2002, 2005 и 2008, Гонк-Конг, 1999гг). Штамм панакса пятилистного сохранен в банке коллекции СПХФА и с ним проводятся исследования.

В последние годы особый интерес на международном рынке БАД представляет так называемый “красный” женьшень, обладающий большей биологической активностью особенно в профилактике онкологических заболеваний. В СПХФА получен Патент РФ на “красную” биомассу не только женьшеня, но и панакса пятилистного и др. штаммов. Препараты из “красной” биомассы, обладая большей биодоступностью, действуют в меньших дозах, оказывая высокий антималярийский эффект [3]. На симпозиуме в Ю. Корею и Гонк-Конге были представлены доклады от академии об антиканцерогенном действии этих препаратов и приведены клинические данные, подтверждавшие антиканцерогенный эффект этих препаратов. Установлен механизм антиканцерогенного действия ряда метаболитов “красного” женьшеня. Таким образом, сегодня имеются убедительные доказательства высокой не только адаптогенной, иммуномодулирующей, но и противораковой активности препаратов и продуктов на основе корней и биомассы клеток женьшеня и панакса пятилистного.

Штаммы культур клеток растений являются прекрасной моделью живой биосистемы, на которой можно моделировать новые технологии и получать клетки, которых нет в природе. Так, в СПХФА впервые были получены клетки женьшеня, которые содержали биологически активные вещества березы, солодки, календулы и исландского мха.(4). Впервые было показано, что в клетках женьшеня и других штаммов содержится один из активных антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутаза (СОД), которую ранее получали только из животного сырья [5]. На селективных штаммах женьшеня и американского женьшеня проведены исследования по разработке природоохранной технологии и замене химических макро- и микросолей, входящих в состав питательных сред, на новые экологически безопасные водорастворимые соли, полученные из фосфатных стекол. Работа оригинальная и аналогов не имеет и защищена патентом РФ [6]. В лабо-

ратории совместно с ФУГП “Научно-исследовательским институтом синтетического волокна“ (г. Тверь) впервые проведены эксперименты по получению шовного (операционного) материала и трансплантатов в состав, которых включена биомасса селективных штаммов женьшеня. Работа защищена Патентом РФ и также не имеет аналога[7].

На сегодняшний день в банке коллекции культур лекарственных растений находится 17 штаммов, среди которых штамм юкки великолепной *Yucca gloriosa* L. источник стероидных гликозидов, макротомии красящей *Macrotomia euchroma* (Royle) Pauls – продуцент нафтохиноновых пигментов и другие, в том числе три селективные клеточные линии женьшеня, панакса пятилистного и полисициаса, культивируемые на питательных средах без нитрата аммония и стимулятора роста кинетина.

Уникальность штаммов СПХФА заключается не только в длительности их существования в коллекции, но и в стабильности штаммов-продуцентов. Стабильность, или надежность, в данном случае можно рассматривать как вероятность функционирования биологической системы в изменяющихся условиях среды и времени. Способность биосистемы (комплекса клеток *in vitro*) восстанавливать повреждения или ликвидировать их последствия и составляет сущность надежности системы. Можно предположить, что старение растительных клеток при их длительном культивировании *in vitro* имеет в своей основе те же причины, что и при естественном старении организмов. В любой живой биосистеме есть свободные радикалы, которые с возрастом накапливаются и препятствуют нормальной работе макромолекул.

Исследование активности ферментов антиоксидантной системы (СОД, каталазы, пероксидазы) в длительно культивируемых штаммах, как маркеров системы их физиологического состояния, является одним из основных направлений исследований. Изучение указанных биохимических особенностей в длительно культивируемых клетках различных штаммов и связь физиологического состояния клеток с их метаболизмом это следующее направление, по которому проходит наблюдение за стабильностью штаммов-продуцентов.

Сегодня в лаборатории разрабатываются как новые технологии культивирования с учетом безопасной экологии, так и проводятся поисковые принципиально новые способы получения медицинских конструкций (трансплантатов и шовного материала), препаратов с пролонгированным спектром действия – микрокапсул, биогелей и сублингвальных пленок.

В настоящее время штаммы растительных клеток, как модель биосистемы, используют для оценки экологической и медицинской безопасности в случаях применения различных наноматериалов.

Таким образом, можно сказать, что банк штаммов лекарственных растений это не только коллекция клеток ценных видов растений, но также прекрасная модель биосистемы, позволяющая решать как важнейшие гео-

ретические вопросы жизнедеятельности клетки, так и служит базой для отработки новых биотехнологий, начало которым в СПХФА было положено чл. корр. Р.Г. Бутенко

Литература

1. *Слепян Л.И.* Банк штаммов лекарственных растений сегодня и его перспективы в биотехнологии XXI века// Фармация из века в век. Биохимические, микробиологические исследования: сб. тр. научно-практической конференции. Ч.1V.- СПб.2008. –С.80-84.

2. *Воллосович, А.Г.* Культура ткани раувольфии как продуцент противоаритмических алкалоидов: автореф. дис. ...док. фарм. наук : 15.00.02 / А.Г. Воллосович, СПХФИ. – СПб.,1992.- 36 с.

3. Патент № 2238317 РФ, МПК⁷ C12 N 5/04, А 61 К 35/78. Способ получения активного комплекса на основе культивируемых клеток растений семейства аралиевых.

4. Патент № 2131924 РФ, МПК 6 С 12 N 5/04. Способ получения биомассы женьшеня.

5. Патент № 2136300 РФ, МПК А 61 К 35/78. Способ выделения активного комплекса из биомассы клеток женьшеня.

6. № 2308484 РФ, МПК ⁷ С 12 N 5/04. Способ получения биомассы клеток растений

7. Патент № 2239420 РФ, МПК ⁷ А 61К 9/70, А 61 F 9/007. Биологически активный трансплантат .

Резюме

SPCPA is the oldest research centre RF in the field of cultivation of cells medicinal plants and research of the preparations on their basis. Bank of cells have the 17-th strains of rare and valuable plant species. Some of the strains from plants of Araliaceae had been received thanks to Dr.R.G. Butenko. SPCPA have experience in sphere of development and creation of new medicinal preparations on their basis.

СЛОБОДЯН С.О., ГРИЦАЙ Р.В., ОЛІЙНИК Т.М., БЕЛОШИЦЬКА Н.Й., ТАРАЩЕНКО Н.І., СІДАКОВА О.В.

Інститут картоплярства НААН України, Україна, 07853, Київська обл., Бородянский р-н, смт. Немішаєве, вул. Чкалова 22, e-mail: upri@visti.com

ОТРИМАННЯ ТРАНСФОРМОВАНИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВЕКТОРНИХ КОНСТРУКЦІЙ МЕТОДОМ ПЛР

У світі і надалі набуває бурхливого розвитку ринок генетично модифікованих організмів, зокрема, генетично модифікованих рослин (ГМР). ГМР – це рослини, у геном яких введено додаткову генетичну інформацію (чужорідні гени). Одержання таких рослин сприяє створенню нового покоління ГМ-сортів сільськогосподарських культур, стійких до гербіцидів, патогенів і шкідників, посухи, низьких та високих температур, засолення та закислення ґрунту тощо. Це дає змогу значно скоротити пестицидне на-

вантаження на навколишнє середовище, підвищити фотосинтез рослин та поліпшити засвоєння поживних речовин з ґрунту [1].

Використання трансгенних технологій наприкінці ХХ століття революціонізувало сільське господарство Північної Америки та ряду країн Азії. Протягом останніх років трансгенні культури ріпаку, сої, бавовни, кукурудзи, цукрових буряків, картоплі та інших рослин, стійкі до гербіцидів, комах-шкідників і фітовірусів культивуються вже в багатьох країнах [2]. Впровадження таких технологій дало можливість не тільки підвищити врожайність сільськогосподарської продукції, але і поліпшити економічні показники країн .

У 1997-1998 рр. в Україні було розпочато випробування ГМ сортів картоплі стійких проти колорадського жука, створених компанією “Монсанто”. У 1998 р. розпочато випробування цукрового буряку, стійкого проти гліфосату (“Новартіс Сіде”/“Монсанто”) та кукурудзи, стійкої проти шкідливих комах (“ДеКалб”/“Монсанто”). У цьому ж році розпочато польові випробування кукурудзи, стійкої проти фосфіотрицину (Авентіс Кроп Сайенс), ярого та озимого ріпаку, стійкого проти фосфіотрицину (Авентіс Кроп Сайенс), та цукрового буряку, стійкого проти глюфосінату (KWS/Авентіс Кроп Сайенс) [3].

М. Колесник, керівник аналітичного департаменту Консалтингово-го агентства “ААА” стверджує, що перші трансгенні культури потрапили до України близько п’яти років тому. За її підрахунками в нинішньому році в нашій країні частина сої біотехнологічного походження може скласти приблизно 50%, кукурудзи — 30–40%, цукрового буряка — не більше 10%. Крім того, на полях може вирощуватися незначний відсоток генномодифікованої картоплі. “Підвищені урожаї сої і кукурудзи за останні роки в Україні — пряме слідство використання Вt-культур”, — вважає експерт. До даного списку ГМ-рослин, що вирощують українські аграрії потрібно також додати ріпак.

Використання генно-інженерних рослин стало незворотнім процесом. Тому необхідною умовою для випуску й комерціалізації будь-якої ГМ-культури є всебічна оцінка ризиків. Такі великі світові виробники і споживачі генетично модифікованої продукції, як США та Канада керуються у своїй правовій політиці стосовно ГМО концепцією істотної еквівалентності, згідно з якою ГМ-культура співставляється з її традиційним аналогом, що вже має певну передісторію безпечного використання.

Подібні підходи покладено в основу політики біобезпеки стосовно ГМО і в країнах Латинської Америки. Водночас європейські країни у своїй регуляторній політиці керуються принципом перестороги, відповідно до якого випуск ГМ-рослин у навколишнє середовище можливий лише за умови прийняттого рівня ризику. Звідси ГМ-рослини вважаються потенційно небезпечними доти, поки не доведена їх повна безпечність. Така методоло-

гія оцінки ризиків має певний елемент невизначеності, тому рішення ухвалюються з метою мінімізувати або запобігти можливі ризики.

Система біобезпеки в Україні проходить етап становлення, і в найближчий час є реальні перспективи для цивілізованого вирішення проблеми регулювання і обігу ГМО.

Вперше ідею про необхідність ідентифікації генетично модифікованих і біологічно чистих продуктів було висунуто в Конвенції ООН по біологічній різноманітності у грудні 1993 р. Ця ідея була підтримана пізніше, у рамках рішення Картахеньського протоколу з біологічної безпеки, що був підписаний більш ніж 130-ти країнами світового співтовариства 29 січня 2000 р. у Монреалі. Були розпочаті дослідження по відпрацюванню методології більш повної і точної ідентифікації генетично модифікованих організмів та вироблених з них продуктів, що потрапляють у канали міжнародної торгівлі [4].

Виходячи з цього постає актуальним питання розробки методичних підходів у створенні генетично-модифікованих рослин та детекції трансгенних конструкцій.

Матеріали і методи

В роботі використовували штами *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 та p72X векторні плазмиди яких містять гени дефензину та білку оболонки X-вірусу картоплі, в якості маркерного – ген стійкості до канаміцину *npt-2*. Дані штами любязно предоставлені нам Всеросійським науково-дослідним інститутом сільськогосподарської біотехнології згідно договору про науково-творчу співпрацю.

Культуру бактерій вирощували на рідкому середовищі LB, яке додатково містило 50 мг/л канаміцину [5]. Культивування проводили на качалці при 28 °С до досягнення *log*-фази (густина 10⁹ клітин/мл).

Вихідним матеріалом для трансформації слугували пробіркові рослини картоплі (*Solanum tuberosum*) сортів: Тирас, Щедрик, Луговська, Косень, Забава, Левада селекції Інституту картоплярства НААН.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили на ампліфікаторі “Eppendorf” у режимі: початкова денатурація – 4 хв за температури 94°C; 35 циклів: 45 с за 92 °С, 1 хв за 60 °С, 1 хв за 72 °С; термінальна елонгація – 7 хв за 72 °С.

Реакційна суміш об’ємом 25 мкл містила: 1х ПЛР-буфер, 0,4 мМ dNTP, 2 од. Tag-полімерази, 40–60 нг плазмідної ДНК, 2,5 мМ MgCl₂, 10 рМ праймера-1 (*nptI*-1), 10 рМ праймера-2 (*nptI*-2), 10 рМ праймера-1 (35S-1), 10 рМ праймера-2 (35S-2), (всі реактиви «Fermentas»).

ДНК з агробактеріальних штамів виділяли згідно методики [8], а ДНК з пробіркових рослин картоплі – згідно методики [7] з власною модифікацією.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 1,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мл), про-

тягом 2 годин, при напрузі 3 В/см довжини гелю. Для фотографування використовували цифрову фотосистему. Розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркера молекулярної маси GeneRuller 100 bp (“Fermentas”) та комп’ютерної програми BioTest Color (Росія).

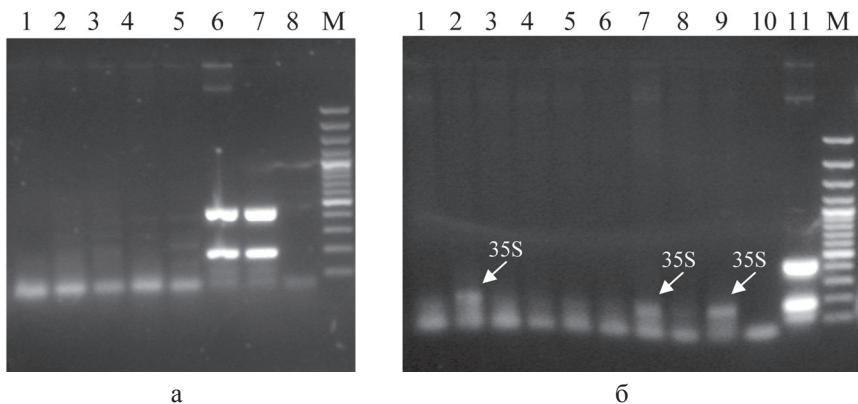
Результати і обговорення

Трансформацію штамми *Agrobacterium tumefaciens* проводили використовуючи експланти листа, стебла, корінців, та диски мікробульб. Експланти поміщали в чашку Петрі, додаючи свіжу нічну культуру бактерій, розбавлену в 3-6 раз живильним середовищем “рідкий амінопептид” без канаміцину. Кокультивували експланти на модифікованому середовищі MS, в темряві. Після кокультивації надлишок бактерій видаляли за допомогою фільтрувального паперу, а експланти переносили на середовище для калусоутворення та пізніше морфогенезу, що містило 50 мг/л канаміцину. Отримані рослини, переносили на середовище для вкорінення (без антибіотиків), а потім проводили кінцеву оцінку канаміцин (КМ) – резистентності за розвитком кореневої системи і пагонів. Лінії, що отримали низький бал Км-стійкості (від I до 3) вибраковували. Регенеранти, що отримали в результаті оцінки на селективних середовищах більше 5 балів використовували в подальших дослідженнях.

В результаті трансформації отримано 53 КМ – резистентні лінії, серед них: сорту Забава – 10, Косень – 6, Левада – 11, Луговська – 11, Тирас – 8, Щедрик – 7.

Ідентифікацію генетичних конструкцій в трансформованих рослинах здійснювали за допомогою ПЛР із праймерами до маркерного гену *nptII* та 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти [6]. Отриманий електрофоретичний трек кожного зразка для аналізу порівнювали із треком продукту ампліфікації плазмідної ДНК *A. tumefaciens*, що використовували в якості позитивного контролю.

За результатами ПЛР трансформованих рослин з праймерами до генів 35S та *nptII*, ампліконів останнього в гелі не виявлено (мал.2 а,б). Ідентифіковано продукт ампліфікації довжина якого 191 п.н., що дає підставу говорити про наявність гену 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти у ліній картоплі сортів: Щедрик, Косень, Тирас (мал.2б). Дані лінії попередньо можна вважати трансформованими. Функціональний стан 35S промотору буде оцінено в процесі випробувань ліній в умовах закритого ґрунту.



Мал. 2. Результати ампліфікації з праймерами до генів *nptII* та *35S*:

а:

- а: 1. 1б Щед (1);
- 2. 1б Щед (4);
- 3. 1б Щед (5);
- 4. 1б Щед (6);
- 5. 1б Щед (9);
- 6. – 7 – позитивні контролю
(*A. tumefaciens*);
- 8. негативний контроль;
- М – маркери молекулярної маси.

- б: 1. 7б Щед (1);
- 2. 13 Щед (6);
- 3. 9б Щед (1);
- 4. 8б Луг (1);
- 5. 1ст Щед (6);
- 6. 5б Лев (5);
- 7. 5бст Кос (4);
- 8. 2б Лев (9);
- 9. 5б Тир (4);
- 10. негативний контроль;
- 11. позитивний контроль
(*A. tumefaciens*).

Висновки

Таким чином, нами відпрацьовано умови агробактеріальної трансформації рослин картоплі *in vitro* та проведення ПЛР-аналізу для детекції генетичних конструкцій, що містять гени *nptII* та *35S*. За результатами ПЛР нами відібрано трансформовані лінії сортів картоплі Щедрик, Косень, Тирас, які підлягатимуть подальшому вивченню.

Література

1. Генетично модифіковані рослини: проблеми та перспективи: доповіді наукової конференції (Київ, 5 листопада 2002 р.) / Національна академія аграрних наук України, Інститут цукрових буряків, Українське товариство генетиків та селекціонерів ім. М.І. Вавілова. – К.: Інститут цукрових буряків НААНУ, 2003. – 155 с.
2. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко Б.О. Основи біотехнології рослин. – К.: Нац. агр. ун-т. – 2000. – 248 с.
3. Блюм Я.Б., Сорочинський Б.В. Біотехнологія рослин: сучасний виклик для України. // Насінництво. – 2009 р. – №7. – С. 12-17.

4. Мельничук М.Д., Дубін А.В., Спиридонов В.Г., Мельничук С.Д. Детекція та ідентифікація трансгенів у генетично модифікованих рослинах на прикладі Вt-картоплі. // Мікробіол. журн. – 2002. – Т. 64., № 3. – С. 26-32.

5. Методические указания по получению трансформированных растений картофеля. – М. – 1995. – 15 с.

6. Vollenhofer S., Burg K., Schmidt S., and Kroath H. Genetically modified organisms in food screening and specific detection by polymerase chain reaction // J. Agric. Food Chem. – 1999. – V. 47. – P. 5038–5043.

7. Дрејнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений. / Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. – М.: Мир. – 1991. – С. 236 – 276.

8. Rapley Ralph. The nucleic acid protocols handbook. – Totowa: Humana Press Inc. – 2000. – 1002 p.

Резюме

У статті висвітлено результати роботи із створення генетично модифікованих ліній картоплі шляхом агробактеріальної трансформації. Для ідентифікації генетичних конструкцій використовуваних векторних плазмід відпрацьовано умови мультиплексної полімеразно-ланцюгової реакції. За результатами ПЛР відібрано лінії картоплі для подальшого випробування в умовах закритого ґрунту.

В статті отражены результаты работы по созданию генетически модифицированных линий картофеля путем агробактериальной трансформации. Для идентификации генетических конструкций используемых векторных плазмид отработаны условия мультиплексной полимеразно-цепной реакции. По результатам ПЦР отобраны линии картофеля для дальнейшего испытания.

The article highlights the work of creating of genetically modified forms of potatoes by agrobacterial transformation. A multiplex polymerase chain reaction with primers to the nptII gene and 35S-promoter was applied for identification of vector plasmids used. A lines of potatoes were selected for further trial according to PCR results.

СОЛОДЯНКИН А.С., ГЕРИЛОВИЧ А.П.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Украина, 61023, Харьков, ул. Пушкинская, 83, e-mail: alex_solod@mail.ru

ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ МАРЕКА, СКОНСТРУИРОВАННОЙ НА ОСНОВЕ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА И ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАМОНИЯ БРОМИДА, НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК КУРИНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И ОРГАНИЗМ КУР

Одно из приоритетных направлений исследований в области разработки профилактических средств при вирусных заболеваниях животных и человека – конструирование и испытания эффективных превентивных средств нового поколения, в частности – ДНК-вакцин [1,2,3]. Суть таких методов заключается в использовании участков генома, отвечающих за син-

тез протективных антигенов вирусов для трансформации клеток организма вместо слабовирулентных или ослабленных вирусов с целью активации механизмов иммунного ответа. Применение таких схем профилактики значительно снижает вирусный пресс в популяциях животных и уменьшает риск появления новых форм возбудителей, которые могут образоваться в процессе мутагенеза [4]. Среди наиболее распространенных векторов, составляющих основу средств генной терапии в настоящее время, используют адено-, ретро-, – герпесвирусы и бактериальные плазмиды. Использование плазмидных векторов является наиболее дешевым и безопасным способом трансформирования клеток в организм, но есть сложности с их доставкой в клетки-мишени. Для транспорта плазмидных векторов используют следующие схемы: введение нативной ДНК, бомбардировка клеток частицами золота из ионной пушки и транспортировка в искусственных мембранных конструкциях – липосомах [5]. Последняя схема, по мнению ряда авторов, является достаточно перспективной, учитывая относительную низкую себестоимость, отсутствие цитотоксических эффектов и возможность адресной доставки генов в клетки с различными маркерами главного комплекса гистосовместимости [6]. При использовании геносом наиболее распространенным катионным компонентом является диолеил фосфатидилэтаноламид (ДОФЕ). Основным недостатком геносом, содержащих ДОФЕ, является их высокая себестоимость – 375 \$ за один грамм вещества-носителя у производителя (фирма Avanti®, США). Альтернативным направлением при ДНК вакцинации является использование синтетических катионных мицелл [7], в частности цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ). Учитывая это, целью данной работы было исследование возможности и перспектив применения липосомальных нанокомплексов, включающих ЦТАБ, в качестве катионного компонента для доставки плазмидной ДНК в ткани кур и определения безвредности и токсичности кандидат-вакцины против болезни Марека на их основе.

Материалы и методы

В качестве плазмидной ДНК использовался плазмидный вектор pUC_gV, несущий промоторный участок γ -интерферона курицы и участок гена гликопротеина gV вируса болезни Марека (рис. 1).

Концентрацию ДНК определяли путем спектрофотометрии с последующим расчетом по формуле 1.

$$C_{\text{ДНК}} = A \times E \times P, \quad (1)$$

где А – оптическая плотность раствора при длине волны 260 нм; Е – 50 мкг / мл (при такой концентрации оптическая плотность раствора ДНК при длине волны 260 нм равна одной оптической единицы); Р – кратность разбавления исследуемого раствора.

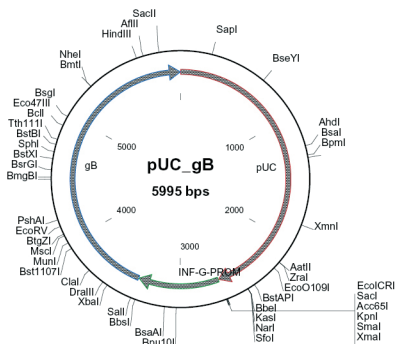


Рисунок 1. Карта плазмиды pUC_gB, носителя гена гликопротеина В ВБМ

Согласно формуле 2 нами были рассчитаны концентрации ФХ и ЦТАБ, необходимые для получения 1 мл липосом (концентрация 10 мМ, молярная доля ЦТАБ 0,2%, 1% и 2,5%).

$$m_1 = m_{tot} \frac{f_1 M_1}{f_1 M_1 + (1 - f_1) M_2} \quad (2),$$

где m_{tot} – общая масса липидов f_1 – необходимая молярная доля мицелл; M_1 – молекулярная масса мицелл; M_2 – молекулярная масса фосфолипидов.

Для проверки стерильности полученных наноконструктив по 20 мкл смеси высевали на 5 мл МПБ. После инкубации в течение 24 ч при температуре 37 ° С учитывали бактериальный рост.

Первичнотрипсинизированную культуру клеток куриных фибробластов выращивали на покровных стеклах 12x24 мм с добавлением 2 мл ростовой среды 199 с содержанием 10% сыворотки крови КРС. Трансформацию клеток проводили путем введения 30 мкл суспензии липосом непосредственно в среду. Общая экспозиция при обработке культур клеток с геномами составила 24 и 48 часов. По окончании экспозиции клетки окрашивали поликлональными кроличьими антителами против вируса болезни Марекка мечеными ФИТЦ. Оценивали интенсивность флуоресценции трансформированных клеток, выраженную в проценте флуоресценции монослоя. Для испытания ФХ-ЦТАБ-ДНК комплексов на безвредность и токсичность было сформировано 2 группы (по 10 голов) цыплят. Иммунизацию первой группы проводили путем инъекции плазмидного вектора pUC_gB в пятикратной дозе (550 нг плазмидной ДНК, смешанную с 10 мМ раствором ФХ-ЦТАБ с молярным содержанием ЦТАБ 2,5% из расчета 150 мкл на голову). Птице контрольной группы был введен физиологический раствор в том же объеме. По окончании опыта, на 40 день после введе-

ния компонентов вакцины, всех цыплят были усыплены хлороформом, декапитуированы и обескровлены. При проведении патологоанатомического вскрытия оценивали макроскопические изменения в организме привитых цыплят и цыплят контрольной группы.

Результаты и обсуждение

При исследовании стерильности полученных наноконплексов, бактериального роста на среде обнаружено не было, что свидетельствовало о пригодности препарата для испытания *in vitro* и *in vivo*.

Прежде чем начать исследование эффективности препарата на модели животных, нами была проведена проверка его экспрессирующих свойств. Для этого ДНК-вакцина была испытана методом трансфекции культур клеток.

В результате проведения люминесцентной и световой микроскопии монослоя трансформированных культур первиннотрипсинизованных куриных фибробластов, после обработки мечеными ФИТЦ поликлональными антителами к вирусу болезни Марека, был отмечен четкий уровень флуоресценции в клетках, обработанных геносомами, по сравнению с контролем. Характер флуоресценции в клетках, трансформированных геносомами с 0,2 и 1%-ной молярной долей ЦТАБ, визуальнo не различался. В отрицательных контролях наблюдался слабый фон неспецифической флуоресценции.

Наличие четкой флуоресценции свидетельствовало о экспрессию гена гликопротеина В и способности промоторного участка активировать транскрипцию генов в клетках кур.

При экспозиции в течение 48 ч отмечали повышение количества отдельных клеток с яркой флуоресценцией в сравнении с экспозицией в течение 24 ч. Морфологически монослой был однородным, мест деградации культуры отмечено не было, что. В среднем количество трансформированных клеток составляло до 30% монослоя.

Интенсивность флуоресценции клеток после трансформации геносомами

Концентрация ЦТАБ	Время экспозиции, номер повтора					
	24 часа			48 часов		
	1	2	3	1	2	3
0,2 %	++	+	++	+	++	++
1 %	++	++	+	++	+	++
Контроль	-	-	-	-	-	-
+ – флуоресценция 0%-25% монослоя ++ – флуоресценция 25%-50% монослоя +++ – флуоресценция 50%-75% монослоя ++++ – флуоресценция 75%-100% монослоя						

Отсутствие ярко выраженных цитопатических свойств образцов ДНК-вакцины в форме геносом на клеточных тест-объектах, дало основания

продолжить проверку формы препарата в разрезе доклинических испытаний. Руководствуясь критериями контроля качества вакцин против болезни Марека согласно требованиям МЭБ, нами была введена пятикратная доза препарата суточным цыплятам.

На протяжении всего срока наблюдения за группами цыплят, погибло по две головы в контрольной и опытной группах в течение первых 10 суток от начала эксперимента. При патологоанатомическом вскрытии установлено, что причиной гибели был дефект инкубации.

По физиологическому развитию цыпленка опытной и контрольной между собой не отличались, хорошо поедали комбикорм, нормально развивались и набирали массу.

По результатам вскрытия специфических изменений, характерных для болезни Марека, токсического или туморогенного влияния в опытной группе отмечено не было. Нервные стволы не имели изменений. Легкие, почки и сердце не имели изменений и характеризовались правильной анатомической формой. Печень и селезенка имели нормальный размер, на разрезе изменений выявлено не было. Стенка железистого желудка была без утолщений. Такие же результаты были зафиксированы в контрольной группе птицы.

Выводы

1. По результатам проведенных цитологических исследований прототипа ДНК препарата на основе вектора рUC_gV и ФХ-ЦТАБ показано, что разработанная конструкция на 1-2 сутки после обработки первичнотрипсинованих куриных фибробластов вызывает эффективную трансформацию с экспрессией гена gV в клетках на фоне отсутствия цитопатогенного воздействия.

2. Исследования *in vivo*, показали, что введение ДНК-вакцины против болезни Марека цыплятам в дозе 550 нг не вызывает макроскопических изменений в нервной ткани и органах иммунной системы и не оказывает выраженного токсического воздействия на организм птицы.

Литература

1. Liu M.A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future // *Immunol Rev.* 2011 Jan; 239(1):62-84.
2. Redding L, Weiner DB. DNA vaccines in veterinary use // *Expert Rev Vaccines.* . – 2009 . – Sep; 8(9):1251-76.
3. Воробьев А.А., Егорова Н.Б., Захарова Н.С., Курбатова Е.А., Семенов Б.Ф., Гинцбург А.Л., Народицкий Б.С., Семенова И.Б., Зверев В.В., Киселевский М.В. Прогноз в области создания вакцин нового поколения для вакцинопрофилактики и вакцинотерапии инфекционных и неинфекционных болезней // *Пульмонология.* . – 2005. – № 6 с. 16-36.
4. Black J.L., Genome projects and gene therapy: gateways to next generation biological weapons // *Milit. Med.* – 2003. – Vol.108, № 11. – P864-871
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — Москва: Мир, 2002. — 589 с.

6. Кривцов Г.Г., Жданов Р.И. Адресная доставка функциональных генов в генотерапии с помощью углеводов-содержащих векторов // Вопр. Мед. Химии. – 2000. – Т.46. – №3. – С. 246 – 255.

7. He X, Jiang L, Wang F, Xiao Z, Li J, Liu LS, Li D, Ren D, Jin X, Li K, He Y, Shi K, Guo Y, Zhang Y, Sun S. Augmented humoral and cellular immune responses to hepatitis B DNA vaccine adsorbed onto cationic microparticles // J Control Release – 2005 – Oct 3;107(2):357-72.

Резюме

Целью настоящей работы было исследование возможности применения липосомальной ДНК-вакцины против болезни Марека в форме комплекса ФХ-ЦТАБ-ДНК. Результаты опытов показали отсутствие выраженных токсических и цитопатических воздействий.

Метою цієї роботи було дослідження можливості застосування ліпосомальної форми ДНК-вакцини проти хвороби Марека у формі комплексу ФХ-ЦТАБ-ДНК. Результати дослідів показали відсутність вираженого токсичного та цитопатичного впливу.

The aim of the present work was to study the possibilities for using of liposomal DNA vaccines against Marek's disease as a complex of PC-CTAB-DNA. The experimental results showed absence of the marked toxic and cytopathic effects.

СТУПКО В.Ю., ЗОБОВА Н.В.

*ГНУ Красноярский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный 66,
e-mail: scentr@pisem.net*

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИИ *IN VITRO* ФОРМ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ УСТОЙЧИВЫХ К ЭДАФИЧЕСКИМ СТРЕССАМ

Яровая пшеница является ведущей продовольственной культурой в Красноярском крае, ее посевные площади составляют более половины от всех зерновых, возделываемых в регионе. Формирование урожая и качества зерна пшеницы в лесостепи Красноярского края зависит от сортовых особенностей и условий произрастания. Среди лимитирующих факторов, сдерживающих получение высоких и устойчивых урожаев, выделяются неблагоприятные физико-химические свойства почв, главными из которых является низкая обеспеченность питательными веществами в сочетании с повышенной кислотностью и наличием почв с солонцеватыми пятнами. В связи с этим возникает острая потребность в создании сортов, способных нормально развиваться в таких условиях и формировать стабильные урожаи.

Одним из приемов повышения эффективности селекции и ускорения процесса создания адаптивных сортов может служить культура изолированных растительных тканей – экологичная методика, использующая природные резервы соматической изменчивости растений (Zairi et al., 2003).

Нами с использованием методов биотехнологии, в Красноярском НИИ-ИСХ были развернуты работы, направленные на создание сортов мягкой яровой пшеницы с повышенной адаптивностью с использованием селективных сред в каллусной культуре *in vitro* (Ступко, 2008; Ступко и др., 2008).

Материалы и методы

Отбор регенерантов осуществляли в два этапа – на средах пролиферации и регенерации каллуса, в каллусной культуре пшеницы на среде МС в присутствии стрессоров (NaCl и рН 4.0) по технологии авторов (Ступко и др., 2008). Сравнительную физиологическую оценку солеустойчивости регенерантов и их родительских форм проводили рулонным методом (Удовенко, 1974), кислотоустойчивости – в чашках Петри с ежедневной заменой растворов (Ступко, Киреева, 2008). Опытные варианты содержали раствор хлорида натрия в концентрации 1,68% или дистиллированную воду с рН 3,0 и, в качестве контроля, – с рН 5,6. Исследуемыми параметрами служили длина и сырая масса побегов и корней. Объектами исследования служили полученные на засоленной и нейтральной средах регенеранты от селекционных линий КС-1607 и Минуса (родительские формы), созданных в КНИИСХ.

Результаты и обсуждение

В данной работе проведена оценка эффективности отбора поколения R1 четырех регенерантов, семенной материал которых имелся в достаточном для этого количестве, в физиологических тестах в сравнении с родительскими формами.

При выращивании проростков в присутствии высоких концентраций NaCl (1,68%) регенеранты, полученные с засоленной среды (РС), от селекционной линии КС-1607 имели в целом больший ростовой потенциал в сравнении с остальными формами (таблица). Они выделялись по массе корней, побегов и растений в целом как в контрольных, так и в стрессовых условиях (рис. 1). При этом по длине органов они значительно не отличались от родительской формы, но имели более разветвленную корневую систему и толстые стебли, то есть лучше сформированный габитус растения. Ростовой параметр регенеранта, полученного с контрольной среды (РН), были значительно ниже остальных образцов.

Вероятно, корректно было бы сравнивать солеустойчивые регенеранты (РС) именно с РН(КС-1607), поскольку эти образцы выращены в одинаковых условиях светокультуры *in vitro*, в то время как зерна родительского генотипа получены в поле. При этом прослеживается явное превосходство форм, прошедших отбор, над неотселектированной линией (РН), что делает особенно заметной эффективность отбора стрессоустойчивых форм *in vitro* на селективной среде с повышенным содержанием NaCl в сравнении с контрольными условиями. Тем не менее, и регенерант с нейтральной среды является ценным селекционным образцом, поскольку величина падения его показателей в стрессовых условиях в сравнении с контрольными значи-

тельно меньше, чем у родительской формы, что говорит о его высокой стабильности.

Таблица

Изменение ростовых параметров родительской формы и ее регенерантов в присутствии высоких концентраций NaCl (1,68%) в сравнении с нейтральным фоном в лабораторных условиях

Параметры	KC-1607		PH(KC-1607)		PC(KC-1607)1		PC(KC-1607)2	
	К	NaCl	К	NaCl	К	NaCl	К	NaCl
Длина корней, мм	142	46,7 ^a	106 ^б	37,6 ^{аб}	147	52,8 ^a	131 ^б	45,0 ^a
Длина побега, мм	117	79,8 ^a	104 ^б	53,5 ^{аб}	112	76,6 ^a	104 ^б	56,0 ^{аб}
Масса растений, мг	98,8	74,8 ^a	102	53,9 ^{аб}	145 ^б	85,3 ^{аб}	141 ^б	68,9 ^a
Масса корней, мг	39,3	32,0	45,2 ^б	22,4 ^{аб}	80,3 ^б	36,5 ^a	78,6 ^б	33,9 ^a
Масса побегов, мг	59,5	42,8 ^a	56,2	31,5 ^{аб}	64,8 ^б	48,8 ^{аб}	62,6	35,0 ^{аб}

Примечание: а – существенные различия между контрольными и селективными условиями ($P < 0,05$); б – существенные различия между родительской формой и регенерантом ($P < 0,05$)

Исследование кислотоустойчивости регенеранта, полученного от сорта Минуса на среде с низкой pH (4,0), еще ярче продемонстрировало эффективность отбора *in vitro*. Во всех исследованных условиях регенерант превзошел родительский генотип в 4-5 раз по конечной длине и массе побега и целых растений (рис. 1).

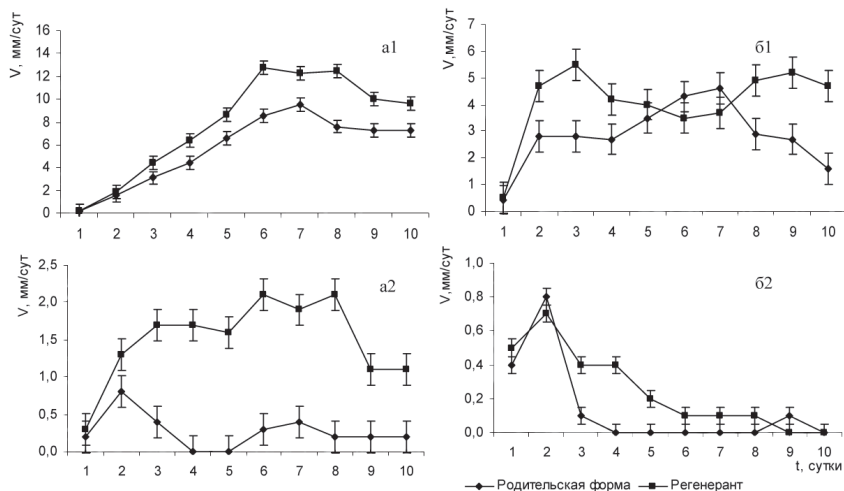


Рис. 1. Скорость элонгации побегов (а) и корней (б) проростков пшеницы сорта Минуса и ее регенеранта в контрольных условиях (1) и в стрессовых (2) (V, мм/сут).

Используемая нами методика оценки кислотоустойчивости (Ступко, Киреева, 2008) позволила проследить, в том числе, и динамику роста образцов, что выявило еще более разительные отличия регенеранта от родительской формы. Уже на вторые сутки прорастания скорость элонгации корней регенеранта в контрольных условиях в 1,6 раза превышала таковую у проростков родительской формы. При pH 3,0 данное соотношение было достигнуто на 8 сутки.

Скорость роста побегов в стрессовых условиях регенеранта временами превышала показатели родительской формы более, чем в 5-10 раз, различаясь аналогичным образом в контроле в 1,3 раза. Данное соотношение достигало своего максимума на 8 сутки во всех исследованных условиях за счет увеличения скорости роста регенеранта и падения скорости элонгации побегов родительской формы.

Рост корней родительского генотипа прекратился в стрессовых условиях уже на 4 сутки, в то время как регенерант сохранял ростовую активность до 8 суток включительно. В контрольных условиях спад в скорости роста обеих форм наметился на 3 сутки.

Поскольку скорость роста побегов в исследуемый период была неравномерна, логично рассмотреть относительный прирост органов за сутки (рис. 2).

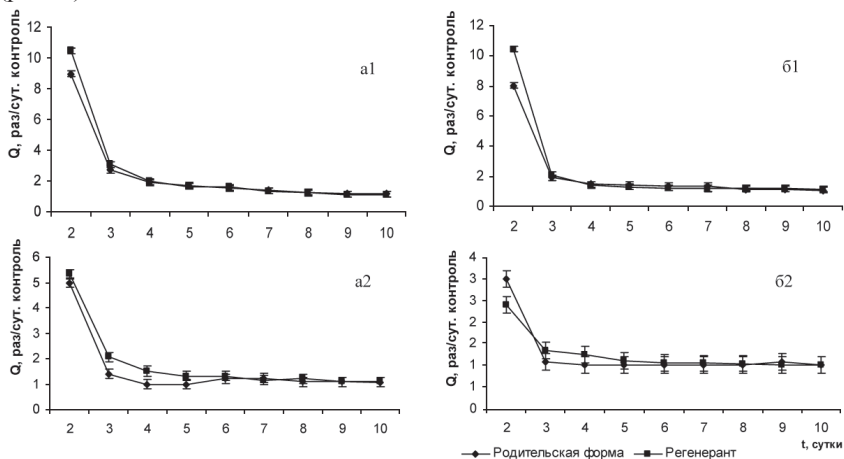


Рис. 2. Темпы элонгации побегов и корней проростков пшеницы сорта Минуса и ее регенеранта (Q в раз/сут) (Обозначения см. рис. 1)

С этой точки зрения наиболее значительные различия между образцами отмечались только в первые 3-5 суток, где явное преимущество по темпам увеличения длины побегов во всех исследованных условиях и, корней – в контрольных, имел регенерант (рис. 2). Всё выше сказанное свидетель-

ствуется о наличии у регенеранта признаков толерантности к высоким концентрациям H⁺.

Обращает на себя внимание и значительное превосходство всех исследованных стрессоустойчивых регенерантов над родительскими формами в нейтральных условиях. Большую часть пахотных земель всё же составляют нейтральные фоны, где данная особенность может стать решающей при выборе селекционного образца.

Различия в реакции опытных образцов (регенерантов) можно объяснить как внутрисортным полиморфизмом, так и соматоклональной изменчивостью, которая считается основой отбора *in vitro* форм, устойчивых к абиотическим факторам (Vajji et al., 2004). Поскольку в исследованиях задействован семенной материал регенерантов первого поколения, то есть семенного потомства пробирочных растений, разномуженного в условиях светокультуры в отсутствии стрессовых воздействий, то можно сделать заключение о сохранении признака устойчивости, по крайней мере, в следующем за процедурой отбора поколении. Последнее говорит о наличии именно соматоклональной изменчивости в культивируемой нами каллусной культуре, а не временных проявлений полиморфизма генов.

Выводы

Полученные данные свидетельствуют об эффективности разработанной технологии в отношении повышения стрессоустойчивости форм мягкой яровой пшеницы. В комплексе с селекцией на продуктивность разработанная технология позволит значительно увеличить скорость селекционного процесса на этапе выявления перспективных образцов. Появляется возможность быстрого получения чистых линий. При этом работу можно вести круглогодично, легко контролировать условия отбора и элиминировать неконтролируемые погодные факторы.

Литература

1. Ступко В.Ю. Подбор уровней давления селекционирующих факторов для отбора стрессоустойчивых форм мягкой яровой пшеницы *in vitro* // «Молодые ученые – науке Сибири»: сб. ст. молодых ученых. Вып. 3. Ч. 1 / Красн. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2008. – с. 80-83.
2. Ступко В.Ю., Зобова Н.В., Сурин Н.А. Подбор условий для создания стрессоустойчивых форм мягкой яровой пшеницы *in vitro* // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – Новосибирск: ООО ИПФ “Агрос”. – 2008. – №6 (168). – с. 20-26.
3. Ступко В.Ю., Киреева А.В. Подбор условий селекции и тестирования кислотоустойчивых форм мягкой яровой пшеницы // Сборник тезисов международной научно-практической конференции молодых ученых «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых» (Новосибирск, 17-18 апреля 2008 г.). – с. 185-188
4. Удовенко Г.В., Олейманова Т.В., Кожушко Н.Н. и др. Методика диагностики устойчивости растений (засухо-, жаро-, соле- и морозоустойчивости). – Л.: ВИР. – 1974. – 74 с.

5. Bajji M., Bertin P., Lutts S., Kinet J.-M. Evaluation of drought-resistance-related traits in durum wheat somaclonal lines selected *in vitro* // Australian Journal of Experimental Agriculture. 2004. V.44. P.27-35.

6. Zairi I., Chlyah A., Sabounji K., Tittahsen M., Chlyah H. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – V. 73. – No. 3. – pp. 237-244.

Резюме

В физиологических лабораторных тестах показана высокая устойчивость к засолению и закислению среды линий-регенерантов, сформировавшихся на селективных средах, что подтверждает эффективность отбора, проведенного в культуре калусных тканей.

У фізіологічних лабораторних тестах показана висока стійкість до засолення і закислення середовища ліній-регенерантів, що сформувалися на селективних середовищах, що підтверджує ефективність відбору, проведеного в культурі калусних тканин.

High tolerance to soil salinity and acidity of regenerants created on selective media was showed in physiological tests. So the effectiveness of *in vitro* selection conducted was confirmed.

¹СУПРУН С.М., ¹ДОНЧЕНКО Г.В., ²ХАРКЕВИЧ Е.С., ²ПАВЛИЧЕНКО А.К.,
¹СТЕПАНЕНКО С.П., ²КУРЧЕНКО И.Н., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.

¹Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины

Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: sst@biochem.kiev.ua

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

Украина, Д 03680, Киев, ул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: elenakharkevich@ukr.net

КОМПЛЕКСНЫЙ ГРИБНОЙ ПРЕПАРАТ: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ

Микромицеты перспективны для использования в сельском хозяйстве, медицине, рациональном природопользовании [1 – 3]. Разработаны биотехнологии получения липидов, пищевых волокон на основе хитин-глюканового комплекса, фармакологических препаратов, биологически активных добавок пищевого и кормового применения [4, 5]. В Украине биотехнологии получения биологически активных веществ на основе микробиологического синтеза развиты слабо. Так, известно производство кристаллического бета-каротина с использованием гриба-продуцента *Blakeslea trispora*, бактериального кормового препарата “Липрот” со значительным содержанием лизина.

Цель наших исследований: разработка биотехнологии получения витаминно-протеинового препарата на основе селекционированных штаммов-продуцентов витаминов, коферментов и белка; изучение его действия на различные группы животных.

Материалы и методы

Для получения витаминно-протеинового препарата путем совместного культивирования селекционированы штаммы грибов *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011 и *Mycelia sterilia* ИМВ F-10014. Штаммы депонированы и хранятся в Украинской коллекции микроорганизмов (Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины). Микромицеты выращивали на синтетической питательной среде Чапека с мелассой (1% по р.в.) в качестве источника углерода. Посевной материал (инокулят) выращивали в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об/мин в течение 24 часов. Ферментацию проводили путем периодического культивирования в колбах или в производственных условиях с использованием ферментационного аппарата (1,2м3) в ПП БТУ Центр (г. Ладыжин). Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1,0–1,5 атм. в течение 30 мин и засевали 5%-ным инокулятом. Продолжительность культивирования в лабораторных условиях составляла 62 часа, производственных – 41–42 часа. По разработанной нами технологии с использованием термической обработки получено две формы препарата: порошкообразная и жидкая. В биомассе и препарате определяли содержание протеина, витаминов, аминокислот [6]; убихинон Q10 – спектрофотометрически с предварительным хроматографическим разделением компонентов неомыляемых веществ [7]. Содержание хитина в биомассе исследованных штаммов определяли по разности количеств N-ацетилглюкозамина после гидролиза 2 N и 6 N HCl [8], в пересчете количества глюкозамина на хитин с использованием коэффициента 1,17 [9, 10].

Витаминно-коферментный препарат был протестирован на белых мышах, дубовом шелкопряде, рыбах и перепелах. Проведено тестирование порошкообразной формы препарата на лабораторных мышах (3 группы по 7 особей). Длительность экспериментов составляла 21 сутки. Животные, содержащиеся на стационарном рационе вивария, получали биопрепарат из расчета 0,36 г/особь для 1-й подопытной группы и 1,8 г/особь для 2-й группы. Контролем служили мыши, которые содержались на стандартном рационе вивария. Для оценки влияния биопрепарата общепринятыми методами определяли потребление корма и воды, выживаемость, показатели периферической крови (количество лейкоцитов, эритроцитов, лейкоцитарная формула, свертываемость крови) и биохимические тесты: уровень белка в сыворотке крови и ее фракциях, активность сывороточной холинэстеразы, содержание аммиака в ткани мозга, а также исследовалась морфоструктура внутренних органов [11]. Гусениц дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* G.-M. обрабатывали препаратом в разведении (1:20) несколько раз в течение 28 дней. Корм контрольных гусениц в те же периоды обрабатывали водой. Для обработки икры карпа *Ciprinus carpio* L., полученной от одной самки, однократно использовали грибной препарат, разведенный водой (1:1), который вносили в объеме, равном объему икры, за 1 мин до окончания оплодотворения сухим способом. В контроле в процессе инкубации

применялась профилактическая антисапролегниозная обработка фиолетовым “К”. В комбикорм для опытной группы перепелов (45 самцов и 45 самок), начиная с 14 дня, вводили такое количество порошкообразного препарата, которое позволило повысить уровень протеина в комбикорме на 1,5%. Длительность опыта составляла 28 дней.

Результаты и обсуждение

Нами были селекционированы штаммы микроскопических грибов разных родов – продуценты белка и витаминов. Изучение физиолого-биохимических особенностей, а именно характеристик роста, биосинтеза протеина, витаминов, антагонистических свойств позволило отобрать культуры для совместного культивирования с целью получения кормовой и пищевой добавки – *Fusarium sambucinum* – продуцент комплекса витаминов и *Mucelia sterilia* – продуцент протеина, лизина и триптофана. Скорость роста изученных культур была относительно высокой – $0,35 \text{ ч}^{-1}$, что свидетельствует о технологичности культур и перспективности их промышленного использования (рис.1).

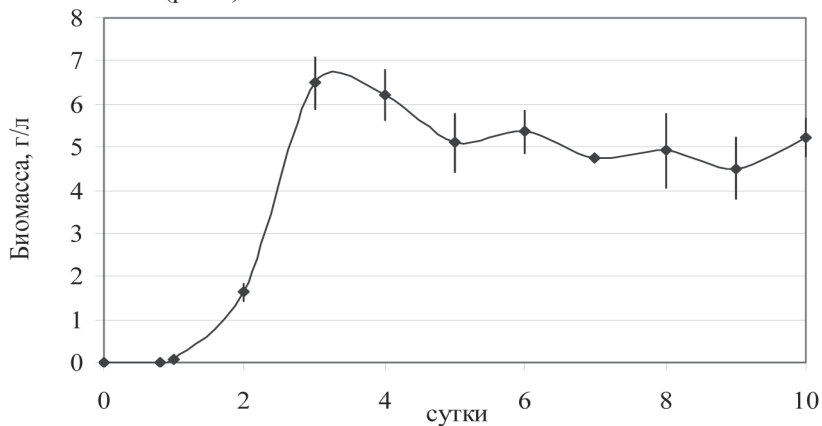


Рис. 1. Рост *Fusarium sambucinum* на синтетической среде.

Нами отработаны условия их совместного культивирования и, согласно регламенту, наработаны партии препарата. В результате совместного культивирования в 2-3 раза возрастало содержание исследуемых витаминов и количество протеина в препарате, при этом сокращались сроки ферментации до 40–42 часов.

Разработанная технология предполагает получение различных форм грибного препарата (порошкообразной и жидкой). Витаминно-протеиновый препарат характеризуется высоким содержанием протеина (52,0-54,0%), липидов (4,4-4,6%), витаминов (в мкг/г: тиамин (B1) – 25,0-30,0; пантотеновой кислоты (B5) – 1250,0-1400,0; никотиновой кислоты (B3) – 800,0-1200,0; биотин (B7) – 18,0-20,5; убихинона (Q10) – 28,0-32,0; каро-

тиноидов –9700-12000; НАД – 450-600; витамина Е – 38,0-40,0; хитина – 7,2-7,8%; а также содержит эссенциальные жирные кислоты и микроэлементы. Жидкая форма препарата представлена в таблице.

Таблица

Характеристика жидкой формы препарата, полученной на основе штаммов *Fusarium sambucinum* и *Mycelia sterilia*

Показатель	Количество
1. Тиамин, мкг/л	20–30
2. Пантотеновая кислота, мкг/л	2500–3500
3. Никотиновая кислота, мкг/л	4500–5200
4. НАД, мкг/л	4200
5. Смесь незаменимых аминокислот, мкг/л	25,0–30,0
6. Жирные кислоты	Олеиновая, линоленовая, арахидоновая
7. Ионы металлов	Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺ , Fe ³⁺

Полученный препарат испытан в опытах на лабораторных мышах, шелкопряде, икре карпа и перепелах. В эксперименте с мышами установлено, что при введении в корм биопрепарата общее состояние мышей было удовлетворительным, корм они поедали полностью, водопотребление обычное. Выживаемость животных в подопытных группах составила 100%, т.е. была выше, чем в контроле. Темпы прироста массы тела не имели межгрупповых различий. Результаты исследований периферической крови свидетельствуют о том, что уровень гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов у подопытных мышей находилось в пределах физиологической нормы. При исследовании лейкоцитарной формулы установлено преобладание лимфоцитов и сегментоядерных форм. Зафиксированное снижение палочкоядерных форм лейкоцитов можно расценивать как положительный фактор. Количество тромбоцитов сохранялось без изменений. Включение в экспериментальные рационы биопрепарата приводило к некоторому снижению уровня альбуминов у подопытных животных по сравнению с контрольными величинами и повышению γ -глобулиновой фракции сывороточных белков. Также отмечено снижение (в 2,85 раза) количества аммиака в ткани мозга мышей, получавших препарат из расчета 1,8 г/особь и идентичность уровней данного метаболита азотистого обмена с контролем в ткани мозга мышей в другом варианте опыта.

Использование препарата способствовало значительному повышению жизнеспособности гусениц – на 14,8%; массы кокона и шелковой оболочки до 11,2% и 12,8%, соответственно, позволяет защищать полезных насекомых от инвазивных (микроспориоз дубового шелкопряда) и экзогенных инфекций (ядерного полиэдроза).

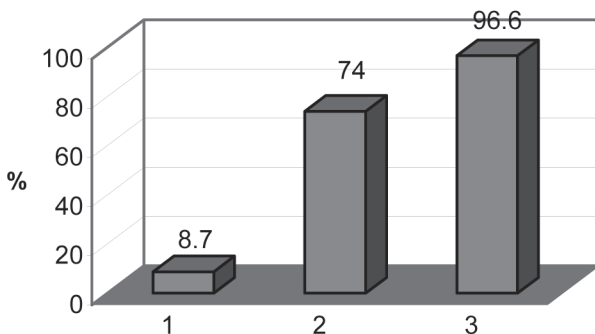


Рис. 2. Действие препарата на выживаемость икры и выход личинок карпа: 1 – контроль 1 (без обработки), 2 – контроль 2 (со стандартными методами обработки), 3 – обработка препаратом.

При обработке икры карпа биопрепаратом выход личинок из подопытной икры составил около 100%, тогда как выход в контроле не превышал 74%. Данный биопрепарат повышает, во-первых, процент выхода личинок из икры, снижает их пораженность сапролегниозом; во-вторых, увеличивает стойкость личинок, вышедших из обработанной биопрепаратом икры (рис 2.). В опыте с перепелами отмечено повышение массы молодняка начиная с 21 дня, а к 28 суткам их живой вес особей составлял $124,5 \pm 1,1$ г (в контроле – $116,6 \pm 1,5$ г).

Выводы. Использование совместного культивирования двух штаммов микромицетов позволило сократить сроки ферментации и повысить содержание биологически активных веществ в препарате. Применение биопрепарата не только повышало выживаемость животных, физиологические и производственные показатели шелкопряда и рыб, но также защищало их от ряда заболеваний. Результаты испытания грибного препарата позволяют прогнозировать возможность использования его в животноводстве, а также для получения на его основе лекарственных средств.

Литература

1. *Wainwright M.* Novel use for fungi in biotechnology / *Chem. Ind.* – 1990. – №2. – P. 131 – 134.
2. *Hobbs Ch.* Medicinal mushrooms an exploration of tradition healing and culture. – Botanica press. Santa Cruz, C.A. – 1995. – 251 p.
3. *Феофилова Е. П., Немцев Д. В., Терешина В. М., Козлов В. П.* Полиаминосахариды мицелиальных грибов: новые биотехнологии и перспективы практического использования // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1996. – Т. 32, № 5. – С. 483 – 492.
4. *Patent WO 97/22686 GB, C12N 1/08.* Fungal food / *Naylor T.W., Williamson T., Trinci A.P.J., Robson G.D., Wiebe M.G. ; Zeneca limited, GB/GB, Locke T.J.* – PCT/GB96/03046 ; 16.12.95 ; 26.06.1997.
5. *Пат.* 26091 Україна, А 61 К 35/84; А 23 L 1/054. Основа для одержання препарату, який впливає на тканинний обмін і модулює процеси імунітету в біоло-

гічних системах та біологічно активна харчова добавка “Міпро-віт” / Е.С. Горшіна, Л.О. Ісаакян, Д.П. Качалай, М.А. Макарова, М.М. Скворцова; заявл. 10.12.97; опубл. 30.04.99, Бюл. №2.

6. *Методы экспериментальной микологии.* Справочник. / [И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др.] ; под ред. В.И. Билай. – К. : Наук. думка, 1982. – 550 с.

7. *Донченко Г.В.* Биохимия убихинона Q. – К.: Наукова думка, 1988. – 297 с.

8. *Johnson A.R.* Improved method of hexosamine determination // *Anal. Biochem.* – 1971. – V. 44, № 2. – P. 628 – 635.

9. *Костина А.М., Бабицкая В.Г., Лобанок А.Г.* Хитин мицелиальных грибов рода *Penicillium* / А.М. Костина // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1978. – Т. 14, вып. 4. – С. 586 – 593.

10. *Петрушко Г.М., Калужный М.Я.* Хитин дрожжеподобных организмов рода *Candida* // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1971. – Т. 7, № 6. – С. 637 – 642.

11. *Фердман Д.Л., Сопін Е.Ф.* Практикум з біохімії. – К.: Радянська школа, 1952. – 234с.

Резюме

На основе совместного культивирования селекционированных штаммов микромицетов *Fusarium sambucinum* и *Mycelia sterilia* получен протеиновый препарат с высоким содержанием витаминов, коферментов и других биологически активных веществ. Проведенные испытания препарата на животных свидетельствуют о возможном применении его в качестве кормовой и пищевой добавки.

На основі сумісного культивування селекціонованих штамів мікроміцетів *Fusarium sambucinum* та *Mycelia sterilia* отримано протеїновий препарат з високим вмістом вітамінів, коферментів та інших біологічно активних речовин. Випробування препарату, що були проведені на тваринах, свідчать про можливість його використання як кормової та харчової домішки.

The protein preparate with high content of vitamins, coenzymes and other biologically active substances was obtained on the base of joint cultivation of micromycetes strains of *Fusarium sambucinum* and *Mycelia sterilia*. The results of preparate testing on animals prove possibility of its effective application as animal breeding and fodder premix.

**ТАШИРЕВ А.Б.¹, БЕРЕГОВАЯ Т.В.², РОМАНОВСКАЯ В.А.¹,
РОКИТКО П.В.¹, МАТВЕЕВА Н.А.¹**

¹*Институт микробиологии и вирусологии им. академика Д.К. Заболотного НАН Украины, Украина, Киев, ул. Заболотного, 156, e-mail: victoriaroman@ukr.net*

²*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко. Украина, Киев, проспект академика Глушкова, 2, корпус 12*

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЛАНИНОВ ИЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ АНТАРКТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

В зоне внутреннего островного шельфа Антарктического полуострова экосистемы подвержены одновременному воздействию целого комплекса экстремальных факторов. К ним относятся высокие дозы УФ радиации,

циклическое «замораживание-оттаивание», высушивание, резкие перепады суточных температур, абразивное действие ветров и т. д. На острове Галиндез расположены клифы – вертикальные скалы высотой 10-12 м, круглогодично свободные от снега. Поэтому на микробные ценозы клифов в максимальной степени действуют указанные экстремальные факторы. Повышенный уровень УФ радиации приводит к природной селекции пигментированных микроорганизмов в данных экосистемах и к гиперсинтезу у них пигментов, как ответной защитной реакции [3, 5, 8]. Защитные пигменты микроорганизмов (каротины, меланины и флавины) представляют собой биологически активные вещества, перспективные для промышленных биотехнологий. Цель работы – селекционировать антарктические микроорганизмы – продуценты биологически активных веществ для создания медицинских препаратов.

Материалы и методы

Объектом исследования служили антарктические микроорганизмы, изолированные из образцов чёрных накипных лишайников, отобранных на вертикальной скале. Скала расположена на биогеографическом полигоне (Украинская станция Академик Вернадский, остров Galindez, западная Антарктика) и покрыта мощной биоплёнкой обрастания. Микроорганизмы выделяли на агаризованных питательных средах: NA – «Nutrient Agar» (фирма HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.), CA – сусло агар, и минеральной среде MM [2] с метанолом (0,5 об.%) в качестве источника углеродного питания. Для количественного учёта десятикратные разведения образцов рассевали на эти среды и инкубировали при 15-20°C (5-15 суток). Для выделения чистых культур использовали доминирующие в образцах микроорганизмы.

Выделение микробных пигментов из клеточной биомассы угольно-чёрных дрожжей проводили методом щелочной экстракции [4, 7], их свойства определяли, как приведено в [4]. Каротиноиды в микробной биомассе определяли хроматографическим и спектрофотометрическим методом. УФ облучение антарктических микроорганизмов проводили по методике, описанной в [3]. Чтобы сравнить чувствительность к УФ различных монокультур, на дозовых кривых, представляющих зависимость количества выживших клеток от доз УФ, вычисляли: ЛД₉₀ – дозу УФ, при которой погибает 90% клеток, ЛД_{99,99} – дозу УФ, при которой погибает 99,99% клеток.

Цитопротекторное действие меланина изучали в условиях острого и хронического стресса. Острые нейро-дистрофические поражения в слизистой оболочке желудка крыс вызывали методом нервно-мышечного напряжения по Селье. Хронические нейро-дистрофические поражения в слизистой оболочке желудка крыс вызывали методом 24-часового иммобилизационного стресса. Содержание основных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов определяли в гомогенате слизистой оболочки желудка крыс спектрофотометрическим методом, ТБК-активных продуктов по реакции с тиабарбитуровой кислотой и Шифовых оснований

– флюорометрическим методом. Экспрессию эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) в слизистой оболочке желудка изучали методом Вестерн блот. Уровень метаболита оксида азота NO_2^- определяли с помощью реактива Грисса. Концентрацию кортизола в крови определяли иммуно-ферментным методом.

Результаты и обсуждение

В экстремальных биотопах Антарктики нами проведен скрининг пигментированных микроорганизмов. В результате показано, что в наскальных антарктических биотопах частота их встречаемости, а также общее количество и биоразнообразие значительно выше, чем в других антарктических биотопах. Из биоплёнок обрастания стационарных точек мониторинга на клифе «Скалодром-2» выделены пигментированные микроорганизмы. Микроорганизмы представлены (клеток/г образца): розовыми и оранжево-жёлтыми формами бактерий (до 10^7), а также красными и чёрными дрожжами (до 10^5). Нами установлено, что пигментированные микроорганизмы антарктических скал высокоустойчивы к УФ радиации. Летальная доза УФ облучения для розовых штаммов *Methylobacterium* превышала 300 Дж/м^2 , для угольно-чёрных дрожжей – $500\text{-}800 \text{ Дж/м}^2$, для красных дрожжей – $1200\text{-}1500 \text{ Дж/м}^2$.

Из изолированных бактерий и дрожжей экстрагированы пигменты. Проведен детальный хроматографический и спектрофотометрический анализ пигментов штаммов *Methylobacterium*. Показано, что их каротиноиды представлены преимущественно ксантофилами. Количественное содержание каротиноидов у *M. extorquens* составляло $0,23 \text{ мг/г}$ сухого веса. Подобраны условия для эффективной экстракции пигментов из клеток розово-окрашенных штаммов *Methylobacterium*. Красные антарктические дрожжи являются продуцентами β -каротина и перспективны для использования в биотехнологии.

Особый интерес для биотехнологий имеют антарктические угольно-чёрные дрожжи *Exophiala nigra* с точки зрения промышленного получения меланина. Поэтому из четырёх штаммов *Exophiala nigra* были экстрагированы пигменты и изучены их свойства. Установлено, что при культивировании в жидком солодовом сусле (рН 5.5–6.0) эти штаммы синтезируют водонерастворимый внутриклеточный угольно-чёрный пигмент. В супернатанте пигмент отсутствовал. Пигмент антарктических штаммов *Exophiala nigra* нерастворим в воде, однако растворялся в щёлочи. В органических растворителях (эфир, ацетон, хлороформ, бензол, н-бутанол) пигмент нерастворим. В этаноле нерастворим, или слабо растворим. В тетрагидрофуране (растворитель так называемых меланоидинов) пигмент не растворялся. Угольно-чёрные пигменты не растворялись в конц. HCl, однако они растворялись в других конц. кислотах (H_2SO_4 и HNO_3). В разбавленных кислотах пигмент не растворялся. По комплексу вышеуказанных специфических

тестов экстрагированные пигменты подобны меланину, синтезируемому *Nadsoniella nigra* var. *hesuelica* 365 [4] и *Cladosporium* sp. 396 [1, 6]. Характер УФ-спектров различных фракций угольно-чёрного пигмента штаммов *Exophiala nigra*, растворённых в NaOH (0.5 N) и аммиаке (2%) практически не отличались. Максимальное поглощение находилось в области 220-230 нм. Спектр поглощения пигмента в видимой области (400-800 нм) имел форму практически прямой линии (без резкого снижения). Аналогичные спектры показаны ранее для меланинового пигмента *Nadsoniella nigra* [4].

Оптимизированы условия биосинтеза меланинового пигмента антарктических угольно-чёрных дрожжей *Exophiala nigra*. Выход меланина оценивали как количество АСМ меланина, синтезированного 1 г АСМ биомассы (АСМ – абсолютно сухая масса). Установлено, что у исследованных антарктических штаммов выход меланина составлял от 6 до 10 % АСМ клеток

Изучено влияние меланина на нейро-дистрофические поражения в слизистой оболочке желудка крыс, вызванные хроническим иммобилизационным стрессом. Меланин оказывал выраженное цитопротекторное действие на слизистую оболочку желудка крыс, что проявлялось в уменьшении количества и площади нейро-дистрофических поражений, вызванных методом иммобилизационного стресса. Меланин усиливал экспрессию белка eNOS в слизистой оболочке желудка крыс, подвергшихся воздействию хронического стресса, что приводило к увеличению генерации оксида азота, в результате чего возрастала концентрация в крови его метаболита NO_2^- . Таким образом, одним из механизмов антистрессового влияния меланина состоит в увеличении продукции оксида азота, которому принадлежит важная роль в цитопротекции. Блокатор рецепторов активации пролиферации пероксисом гамма GW9662 устранял защитное действие меланина на образование язв и массивных кровоизлияний в слизистой оболочке желудка крыс, подвергшихся воздействию хронического стресса, что является свидетельством того, что цитопротекторные свойства меланина в условиях стресса частично обусловлены стимуляцией рецепторов активации пролиферации пероксисом гамма. Таким образом, механизм антистрессового влияния меланина обусловлен антиоксидантными свойствами меланина, стимуляцией рецепторов активации пролиферации пероксисом гамма, усилением экспрессии eNOS, а также уменьшением концентрации в крови гормона стресса кортизола, уровень которого резко возрастает под влиянием стресса.

Выводы

В экстремальных биотопах Антарктики проведен скрининг пигментированных микроорганизмов, высокоустойчивых к УФ радиации. Летальная доза УФ облучения для розовых штаммов *Methylobacterium* превышала 300 Дж/м², для угольно-чёрных дрожжей – 500-800 Дж/м², для красных дрожжей – 1200-1500 Дж/м²

По комплексу специфических химических тестов пигменты угольно-чёрных дрожжей идентичны меланину, что подтверждается также характером их УФ-спектров и спектров поглощения в видимой области.

Селекционированы антарктические микроорганизмы – продуценты каротинов и меланинов. У дрожжей *Exophiala nigra* оптимизированы условия биосинтеза меланина. Выход меланина составлял от 6 до 10 % сухой биомассы.

Меланин, синтезируемый *Exophiala nigra*, может использоваться для создания лекарственных средств, относящихся к группе стресс-адаптогенов, обладающих цитопротективными свойствами, в т.ч. и по отношению к язвенно-эрозивным поражениям желудка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального антарктического научного центра Государственного агентства по вопросам науки, инноваций и информации Украины

Литература

1. Жданова Н.Н., Свищук А.А., Шмыгун М.П., Бондарь А.И. О защитном действии пигмента, выделенного из гриба *Cladosporium* sp. // Микробиология. – 1970. – vol. 39, №4. – С. 603-607.
2. Романовская В.А., Столяр С.М., Малащенко Ю.Р. Распространение бактерий рода *Methylobacterium* в различных экосистемах Украины // Микробиол. журнал. – 1996. – vol. 58, № 3. – С. 3-11.
3. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Черная Н.А. Устойчивость к УФ излучению микроорганизмов, изолированных из наскальных биотопов Антарктики. Микробиол. журнал. – 2010. – Т. 72, № 3. – С. 8-14.
4. Рубан Е.Л., Лях С.П., Хрулева И.М., Титова И.А. Меланиновые пигменты *Nadsoniella nigra* // Известия АН СССР. Сер. Биол. – 1969. – № 1-3. – С. 134-148.
5. Таширев А.Б., Романовская В.А., Шилин С.О., Черная Н.А. Скрининг дрожжей-продуцентов меланина в наземных антарктических биотопах. Микробиол. журнал. – 2010. – Т. 72, № 1. – С. 3-10
6. Шмыгун М.П., Жданова Н.М., Свищук А.А. Про належність темного пігменту *Oidiodendron cerealis* до меланіну // Микробиол. журн. – 1975. – Т. 37, № 6. – С. 700-702.
7. Bainbridge B.W, Bull A.T., Pirt S.J., Rowley B.I. Trinci A.P.J. Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolizing cultures of *Aspergillus nidulans* // Trans. Brit. Soc. – 1971. – vol. 56, № 3. – P. 371-385.
8. Tashyrev O.B. Complex researches of structure and function of Antarctic terrestrial microbial communities // Ukrainian Antarctic Journal (Ukrainskyj antarktychnyj zhurnal ISSN 1727-7485). – 2009. – № 8. – P. 228-242.

Резюме

В екстремальних біотопах Антарктики проведено скринінг пігментованих мікроорганізмів, стійких до УФ радіації. Селекціоновано продуценти каротинів і меланінів. У дріжджів *Exophiala nigra* оптимізовано умови біосинтезу меланіну. Вихід меланіну складав від 6 до 10 % сухої біомаси. Меланін *Exophiala nigra* може використовуватися для створення лікарських засобів, що відносяться до групи стрес-адаптогенів, які мають цитопротективні властивості, в т.ч. і по відношенню до виразково-ерозійних порушень шлунку.

В экстремальных биотопах Антарктики проведен скрининг пигментированных микроорганизмов, устойчивых к УФ радиации. Селекционированы продуценты каротинов и меланинов. У дрожжей *Exophiala nigra* оптимизированы условия биосинтеза меланина. Выход меланина составлял от 6 до 10 % сухой биомассы. Меланин *Exophiala nigra* может использоваться для создания лекарственных средств, относящихся к группе стресс-адаптогенов, обладающих цитопротективными свойствами, в т.ч. и по отношению к язвенно-эрозивным поражениям желудка.

Screening of resistant to UV radiation pigmented microorganisms was carried out in extreme biotopes of Antarctic Region. Producers carotins and melanins have been selected and conditions of biosynthesis of melanin for yeast *Exophiala nigra* have been optimised. The melanin yield – from 6 to 10 % of a dry biomass. Melanin of *Exophiala nigra* can be used for creation of stress-adaptogen drugs, possessing cytoprotective properties.

ФОМЕНКО Т.И., МАЛЮШ М.К.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»,

Беларусь, 220012, Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: fomenko_ti@mail.ru

МОРФОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛЮПИНА

Бобовые культуры имеют важное хозяйственное и экологическое значение. В мировом земледелии выращиваются несколько видов люпина: *L. albus* L., *L. pilosus* Murr., *L. atlanticus* Gladst., *L. mutabilis* Sweet, *L. luteus* L., *L. angustifolius* L. В Беларуси ведутся работы по селекции этой культуры, направленные на создание сортов с высоким содержанием белка и масла, а также устойчивых к биотическим и абиотическим факторам внешней среды [1]. Наряду с широко применяемыми методами традиционной селекции все шире используются биотехнологии получения трансгенного люпина, позволяющие за счет расширения источника генов за пределы пула, предоставляемого в случае половой гибридизации, получать растения с целенаправленно измененным геномом и новыми хозяйственно-ценными признаками. Достижения в области модификации генома растений стали возможны благодаря исследованиям по культивированию клеток растений *in vitro* для получения целого растения [2]. Наличие видовых и сортовых особенностей морфогенных процессов у бобовых в культуре *in vitro* и необходимость отбора сортов, обладающих высоким морфогенным потенциалом, объясняет актуальность разработки метода регенерации растений применительно к конкретному виду и сорту люпина. Исследования по расширению диапазона генотипов внутри видов, используемых для получения регенерантов *in vitro*, являются актуальными, так как способны внести значительный вклад в улучшение трансформационных систем, что важно для селекционного процесса с использованием современных биотехнологий.

Материалы и методы

Люпин – многолистный (*Lupinus polyphyllus*), многолетний (*L. perennis*), желтый (*L. luteus*), узколистый (*L. angustifolius*) сортов Липень, Прывабны, Верас, Митан, Миртан, Першацвет. Семена сортов люпина узколистого получены из РУП «НПЦ НАНБ по земледелию». Введение люпина в культуру *in vitro* проводили, используя ткань проростков или незрелые зародыши. Для получения проростков семена стерилизовали 70% этанолом, 0,1% диацидом и промывали стерильной водой. Использовали 3-4 дневные проростки люпина. Из проростков стерильно вычленили экспланты гипокотилей и семядольных узлов и помещали на среды культивирования с различным содержанием регуляторов роста. Экспланты незрелых зародышей извлекали из незрелых бобов и стерилизовали 5 мин в 0,1% растворе диацида с последующей промывкой стерильной водой и помещали на питательные среды МС с различным содержанием регуляторов роста. Культивирование эксплантов проводили при температуре 25°C, освещенности 3 тыс. лк и 16-часовом световом периоде.

Результаты и обсуждение

Изучение бобовых *in vitro* направлено на выявление видов с высоким уровнем органогенеза в культуре ткани. Анализ работ по культуре тканей и клеток бобовых показывает видовое и сортовое разнообразие материала, широкую вариабельность состава питательных сред и эксплантов [3]. Однако накопленный не столь обширный фактический материал по культуре видов люпина *in vitro*, и в том числе люпина узколистого, не позволяет дать однозначного ответа об оптимальном составе питательных сред для получения каллусо – и морфогенеза конкретных генотипов.

Нами изучены особенности развития различных тканей люпина в культуре *in vitro* с исследованием возможности регенерации растений методами прямого и непрямого морфогенеза. Каллусогенез и регенерацию растений исследовали у четырех видов люпина: многолистный (*Lupinus polyphyllus*), многолетний (*L. perennis*), узколистый (*L. angustifolius*) и желтый (*L. luteus*). На эксплантах листа, эпикотила, гипокотила и семядолей исследовали влияние ИУК, 2,4-Д, БАП, α -НУК и кинетина на инициацию каллуса и скорость его пролиферации в интервале концентраций гормонов 0,5-5 мг/л. По способности к каллусообразованию на эксплантах листа и гипокотила при использовании среды, содержащей α -НУК, 2,4-Д, БАП (по 1мг/л каждого гормона), виды люпина можно расположить в следующий убывающий ряд: многолистный, узколистый, желтый, многолетний. Инициация каллуса быстрее проявлялась на тканях эпикотила и гипокотила по сравнению с тканями листа и семядолей. Побегообразование было получено на каллусной ткани гипокотила люпина многолистного. Растения люпина многолистного, полученные в культуре *in vitro*, нормально развивались при переносе в почву [4].

Непрямой органогенез, который считается трудно достижимым для большинства видов семейства бобовых, получен нами только для люпина многолистного. Люпин узколистный, как показали наши исследования, характеризуется менее выраженным морфогенным потенциалом, что подтверждает трудность получения для этого вида непрямого органогенеза. Однако люпин узколистный представляет интерес для селекции и возможности применения современных технологий, требующих исследований особенности проявления морфогенного потенциала у сортов этого вида, что явилось целью наших исследований.

Анализ развития эксплантов гипокотилей, семядолей и семядольных узлов люпина узколистного сорта Миртан на средах МС показывает тканевую зависимость развития эксплантов. Активный стеблевой морфогенез с частотой 100% наблюдали у семядольных узлов всех исследованных сортов на среде МС в диапазоне концентраций 1-6 мг/л БАП при оптимуме 2-4 мг/л и в пассированной культуре 1-2 мг/л БАП. При культивировании гипокотилей получен прямой органогенез с невысокой частотой от 10 до 20% с усилением морфогенной реакции при увеличении концентрации цитокинина в среде культивирования и небольшим количеством побегов (1-2 побега на эксплант). Отмечена тенденция развития укороченных побегов при увеличении концентрации БАП до 6 мг/л. Ткань семядольного узла проявляет более активный прямой стеблевой органогенез по сравнению с тканью гипокотилей. Оценка морфогенного потенциала более широкого спектра сортов люпина узколистного (Верас, Прывабны, Митан, Липень, Першацвет) с использованием в качестве эксплантов гипокотилей и семядольных узлов 3-4-х дневных проростков на средах культивирования, содержащих БАП от 1 до 6 мг/л, также показала оптимальный уровень развития побегов на средах, содержащих 2 – 4 мг/л БАП. Развитие стеблевого морфогенеза на семядольных узлах сортов Верас, Прывабны, Митан, Липень Першацвет к четвертой неделе культивирования для исследованных сортов составило 100%. Частота стеблевого морфогенеза для гипокотилей исследованных сортов к четвертой неделе культивирования находилась в диапазоне 11-23% (с максимумом у сорта Митан). Результаты исследований показали, что сорта Митан и Першацвет обладают наиболее высоким морфогенным потенциалом [4].

Регенеранты люпина узколистного сортов Верас, Прывабны, Митан, Липень, полученные на средах инициации, содержащих 2 мг/л БАП, 0,2 мг/л α -НУК или 2 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК после культивирования в течение двух недель на среде элонгации МС, содержащей 0,1 мг/л БАП, пассировали на среду укоренения, содержащую 1 мг/л ИМК. Регенеранты исследованных сортов Верас, Прывабны, Липень, полученные из семядольных узлов и гипокотилей, не проявили корнеобразования. Наблюдали образование корней только у сорта Митан. Частота ризогенеза для регенерантов сорта Митан была невысокой и составила ~5%.

Исследована возможность получения органогенеза и соматического эмбриогенеза из ткани незрелых зародышей люпина узколистного. Получение растений путем соматического эмбриогенеза позволяет решить вопрос укоренения для тех видов, у которых этот процесс идет с большими затруднениями, как например у люпина.

Культура ткани незрелых зародышей люпина узколистного сортов Миртан, Першацвет и Липень показала перспективность получения прямого стеблевого органогенеза из меристематических тканей с использованием среды МС, содержащей 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК. При использовании каллусогенных сред с преобладанием ауксинов наблюдали развитие каллуса, однако возможность использования полученной каллусной ткани для развития непрямого морфогенеза ограничена из-за сложности вторичного органогенеза в культуре ткани люпина. Исследована зависимость активности морфогенной реакции незрелых зародышей сортов Першацвет, Миртан, Прывабны, Митан и Верас от концентраций БАП в среде культивирования. Отмечена концентрационная зависимость по числу развития побегов у всех исследованных сортов, так, при концентрации 1 мг/л БАП и 0,2 мг/л α -НУК на экспланте развивалось 3-5 побегов, а при концентрации 4 и 6 мг/л БАП число побегов достигало 15. Проведенная оценка развития незрелых зародышей сортов люпина узколистного на морфогенных средах с различным уровнем цитикинина позволила сделать вывод о большей перспективности использования сортов Митан и Першацвет для получения морфогенных ответов в культуре *in vitro*.

Соматические эмбриоиды на эксплантах семядолей незрелых зародышей люпина узколистного сорта Митан были получены на среде МС, содержащей 5 мг/л 2,4-Д, 0,25 мг/л кинетин. Получение эмбриоидов является начальным этапом эмбриогенеза, за которым следует процесс созревания и превращения их в регенеранты. Эти стадии развития представляют собой сложные процессы и требуют дальнейших исследований. Хотя частота процесса для сорта Митан невелика, однако интересен сам факт возможности достижения соматического эмбриогенеза у люпина узколистного. Важен отбор из исследованных нами генотипов более отзывчивого в наших экспериментальных условиях сорта к индукции соматического эмбриогенеза, что для данного вида является несомненным успехом.

Укоренение регенерантов люпина узколистного является сложной проблемой, что отмечалось исследователями уже в ранних работах по культуре люпина *in vitro*. Нами показано, что из видов люпина многолистный (*Lupinus polyphyllus*), многолетний (*L. perennis*), узколистный (*L. angustifolius*), желтый (*L. luteus*) укоренение получено только у люпина многолистного [5]. Для люпина узколистного, развитие корней у которого в культуре *in vitro* крайне затруднено, особенно с увеличением количества пассажей, исследователи предприняли успешные попытки укоренения трансгенных регенерантов путем прививки на проростки соответствующего сорта. Сниже-

ние концентрации солей в среде культивирования до ½ МС и уменьшение содержания БАП до 0,1 мг/л позволило нам повысить процент укоренения регенерантов до 80-100% в первом пассаже с наилучшими результатами для сорта Митан.

Физиологические и анатомические характеристики растений, полученных в культуре *in vitro*, определяют необходимость постепенной акклиматизации к условиям *ex vitro*. Процесс адаптации растений к условиям почвы или заменяющего ее субстрата, является важным этапом в технологиях культивирования *in vitro*, и эта стадия продолжает оставаться узким местом при работе с растениями многих видов. Для адаптации культуральных растений к измененным условиям влажности *ex vitro* культуральные сосуды приоткрывали для уменьшения относительной влажности, а затем регенеранты переносили из культуральных сосудов в искусственную почву Биона (являющуюся торговой маркой ионообменного субстрата, разработанного в Институте физико-органической химии НАН Беларуси). Подросшие регенеранты переносили в почву, высаживая в горшки, и культивировали в условиях теплицы, где растения развивались, вступали в фазу цветения и завязывали семена.

Выводы

Значимость работы состоит в оценке морфогенетического потенциала сортов люпина узколистного в культуре *in vitro* и разработке метода получения регенерантов для генетической трансформации, разработке метода укоренения регенерантов, а также достижения эмбриогенеза в культуре *in vitro*.

Литература

1. *Купцов, Н.С.* Будущее люпина – маслично-белковые сорта / Н.С. Купцов // Проблемы и пути повышения эффективности растениеводства в Беларуси: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию образования Института земледелия, Минск, 2007.- С.186-187.
2. *Chandra, A.* Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview / A.Chandra, D. Pental // Current Science. – 2003. –Vol. – 84, № 3 – P. –381-387.
3. *Pniewski, T.* *In vitro* micropropagation of four lupin species / T. Pniewski, J. Kapusta, A.B. Legocki // Acta Physiologiae Plantarum. – 2002. – Vol. 24, N. 4.- P.417-424.
4. *Фоменко, Т.И.* Сортовые особенности морфогенеза в культуре *in vitro* люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) / Т.И. Фоменко, М.К. Малюш // Сб. науч. трудов: Земледелие и селекция в Беларуси.- Жодино. – 2007.- № 43. – С. 382-393.
5. *Решетников, В.Н.* Каллусогенез люпина (*Lupinus*). Биохимическая характеристика каллусной ткани / В.Н. Решетников, Т.И. Фоменко, М.К. Малюш // Вестн НАНБ. –1999. – № 4. – С.5-11.

Резюме

Исследован морфогенетический потенциал видов и сортов люпина узколистного в культуре *in vitro* и разработан метод получения и укоренения регенерантов и адаптации растений к условиям *ex vitro*.

The *Lupinus* species and *Lupinus angustifolius* cultivars morphogenetic potential *in vitro* culture was investigated. The method of regenerants obtaining and rooting was developed and plant adaptation method to *ex vitro* conditions was proposed.

**ШЕЛУДЬКО Ю.В.¹, ГЕРАСИМЕНКО И.М.¹, КАЗАНЦЕВ А.А.¹,
СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.¹, МАЗУР М.Г.¹, ВЯЧЕСЛАВОВА А. О.²,
ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.², КУЧУК Н.В.¹**

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, ул. Заболотного 148, г. Киев, 03680, Украина; e-mail: ysheludko@ukr.net

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина 3, г. Москва, 119991, Россия

СОЗДАНИЕ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИХЕНАЗЫ *CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM* ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В РАСТЕНИЯХ

Гетерологическая экспрессия генов фармацевтических белков в растениях позволяет получать рекомбинантные белки с необходимыми посттрансляционными модификациями и корректной четвертичной структурой, не загрязненные бактериальными токсинами и опасными для человека патогенами вирусной и прионной природы. Главным препятствием при использовании генетически модифицированных растений для биотехнологического производства белков обычно является низкий уровень накопления целевого продукта. Это может быть обусловлено позицией интеграции трансгена, влиянием на экспрессию на различных стадиях внутриклеточных систем регуляции, а также действием протеиназ на конечный продукт [1,2].

Использование эффективных промоторов и сигналов внутриклеточной локализации позволяет во многих случаях значительно повысить уровень транскрипции и стабильность рекомбинантного белка [1]. Кроме того, было показано, что трансляционное слияние целевого гена с последовательностью некоторых белков-носителей позволяет значительно увеличить стабильность конечного продукта [3-5]. С другой стороны, слияние генов целевого и репортерного белка в одной рамке считывания является удобным подходом для детекции рекомбинантных белков и селекции высокопродуктивных линий. Выбранный нами репортерный белок термостабильная лихеназа *Clostridium thermocellum* [6], кодируемый геном *licB*, имеет ряд важных преимуществ, в частности возможность определения его активности после температурной денатурации собственных ферментов растения [7] и отсутствие влияния на физиологическую активность целевого белка [8-10]. Мы проводили успешную экспрессию генов ацил-липидных десатураз цианобактерий, слитых с геном термостабильной лихеназы, и получили данные о наличии физиологической активности обоих белков

[9-10]. Таким образом, использование экспрессионно-селекционной системы, включающей гибридный ген целевого белка и репортерного белка термостабильной лихеназы, позволяет одновременно с накоплением целевого продукта проводить мониторинг его количества.

Целью нашей работы было осуществить трансляционное слияние последовательностей различных целевых генов (фармацевтических белков (человеческого соматотропина и интерферона альфа) и репортерных белков GFP и RFP) с последовательностью репортерного белка термостабильной лихеназы с образованием гибридного гена, экспрессировать полученные гены в клетках растений и провести анализ функциональной активности и стабильности в растительных клетках полученных гибридных продуктов.

Материалы и методы

При выполнении стандартной процедуры реакционная смесь для ПЦР объемом 20 мкл содержала 100 нг плазмидной ДНК, прямой и обратный праймеры в концентрации 0,5 мкМ, нуклеозидтрифосфаты в концентрации 0,5 мМ, 1 ед. *Taq* ДНК полимеразы в соответствующем буфере (Helicon, Россия). Реакцию проводили в следующих условиях: 5 мин 94°C → 35х (30 сек 94°C; 45 сек 55°C; 1 мин 72°C) → 5 мин 72°C.

Промежуточное клонирование осуществляли в вектор pGEM-T easy (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя. В работе использовали рестриктазы и T4 ДНК лигазу фирмы Fermentas (Литва) с соответствующими буферами и штамм *E. coli* XL1Blue.

Транзientную экспрессию полученных конструкций проводили в растениях *Nicotiana excelsior* как описано ранее [11]. Анализ активности GFP и термостабильной лихеназы в экстрактах ткани растений проводили в соответствии с описанными протоколами [10-11]. Предокрашенный маркер молекулярной массы белковых молекул (Fermentas (Литва)) был использован для SDS-PAGE.

Результаты и обсуждение

Для создания гибридных генов последовательности, кодирующие целевые и репортерный белки были амплифицированы методом ПЦР с использованием матричных плазмид, указанных в табл. 1.

Таблица 1.

Плазмиды, использованные для амплификации генов.

Кодирующая последовательность	Плаزمида
Зеленый флуоресцентный белок (GFP)	pICH5290 [12]
Интерферон α 2b человека	pICH17311 [13]
Соматотропин человека	pICH11731 [13]
Термостабильная лихеназа	pBISN-licBM3 [14]

Полученные в результате ПЦР фрагменты ДНК были клонированы в вектор pGEM-T easy. Ген *licBM3*, кодирующий делетированный вариант термостабильной лихеназы, был вырезан с помощью эндонуклеаз рестрик-

ции *XhoI* и *PstI* и лигирован в вектора, содержащие целевые гены, гидролизированные этими ферментами. Образовавшиеся гибридные гены были вырезаны с помощью эндонуклеаз рестрикции *NcoI* (частичный гидролиз) и *XbaI* и лигированы в вектора pICH5290 или pICBV16 [15] под контроль промотора 35S РНК ВМЦК и терминатора гена нопалинсинтазы (Рис. 1). Полученные генетические конструкции были трансформированы в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101.

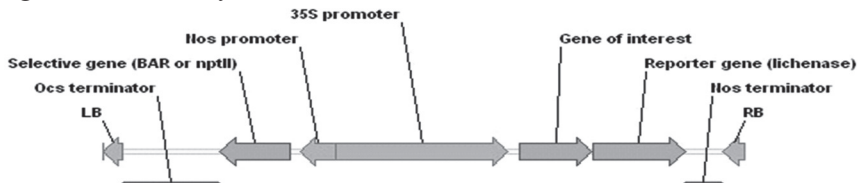


Рис. 1. Схема Т-ДНК генетических конструкций для экспрессии в растениях гибридных генов. – целевые гены GFP (pNPB0017), интерферона $\alpha 2b$ человека (pNPB0018) и соматотропина человека (pNPB0025).

Для анализа функциональной активности гибридного белка проводили *Agrobacterium*-опосредованную транзientную экспрессию созданных гибридных генов в растениях *N. excelsior*. Лихеназная активность была обнаружена во всех экстрактах ткани *N. excelsior* после инфильтрации агробактериями, содержащими вектора pNPB0017 (GFP::лихеназа), pNPB0018 (интерферон::лихеназа) и pNPB0025 (соматотропин::лихеназа). Типичный пример реакции показан на рисунке 2а. SDS-PAGE экстрактов нативного и гибридного GFP, полученных после транзientной экспрессии соответствующих генов в *N. excelsior* (Рис 2б,в) показал наличие флуоресценции гибридного белка и отсутствие детектируемых продуктов его гидролиза. Анализ функциональной активности гибридных генов фармацевтических белков будет проведен в ближайшее время.

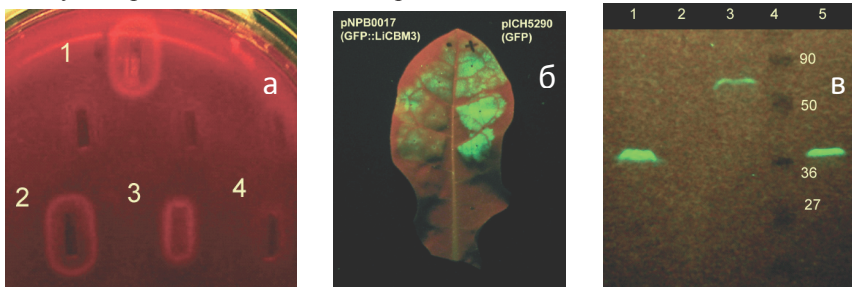


Рис. 2. Анализ функциональной активности гибридного белка GFP::LicBM3 (pNPB0017). а) Определение активности термостабильной лихеназы в экстрактах ткани *N. excelsior* после транзientной экспрессии: 1) растение *N. tabacum*, трансформированное гибридным геном desC-licBM3 [10] (положительный

контроль); 2) растение *N. excelsior*, инфильтрованное рNPB0017; 3) растение *N. excelsior*, инфильтрованное рBISN-licBM3 (положительный контроль); 4) растение *N. excelsior*, инфильтрованное рICH5290 (отрицательный контроль). б) Транзистентная экспрессия нативного (слева) и гибридного (справа) GFP в листе *N. excelsior* на четвёртый день после инфильтрации. в) SDS-PAGE экстрактов нативного и гибридного GFP, полученных после транзистентной экспрессии соответствующих генов в *N. excelsior*: 1) экстракт ткани после инфильтрации рICH5290; 2) экстракт ткани после инфильтрации рBISN-licBM3 (негативный контроль, ген термостабильной лихеназы); 3) экстракт ткани после инфильтрации рNPB0017; 4) маркер молекулярной массы белков; 5) стандартный GFP, экспрессируемый в *Escherichia coli*.

Выводы. Созданы генетические вектора для экспрессии в растениях, в которых выполнено трансляционное слияние последовательностей различных целевых генов (человеческого соматотропина, интерферона $\alpha 2b$ и репортерных белков GFP и RFP) с последовательностью репортерного белка термостабильной лихеназы с образованием гибридного гена. Во всех гибридных продуктах показано наличие лихеназной активности. Анализ функциональной активности белков GFP::LicBM3 и RFP::LicBM3 показал наличие флуоресценции в составе гибридного продукта.

Работа выполнялась в рамках договора о творческом научно-техническом сотрудничестве между Институтом общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН и Институтом клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ и при поддержке НАНУ, грант УкрИНТЕИ № 011 0U006061 и ДФФД грант F40.4/021.

Литература

1. *Streatfield, S.J.* (2007) Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants. *Plant Biotechnol J* **5**: 2-15.
2. *Benchabane, M., C. Goulet, D. Rivard, L. Faye, V. Gomord and D. Michaud* (2008) Preventing unintended proteolysis in plant protein biofactories. *Plant Biotechnol J* **6**: 633-48.
3. *Barros, L. M., R. H. Curtis, A. A. Viana, L. Campos and M. Carneiro* (2003) Fused RolA protein enhances beta-glucuronidase activity 50-fold: implication for RolA mechanism of action. *Protein Pept Lett* **10**: 303-11.
4. *de Virgilio, M., F. De Marchis, M. Bellucci, D. Mainieri, M. Rossi, E. Benvenuto, S. Arcioni, A. Vitale* (2008) The human immunodeficiency virus antigen Nef forms protein bodies in leaves of transgenic tobacco when fused to zeolin. *J Exp Bot* **59**: 2815-29
5. *Escribano, J. M., D. M. Perez-Filgueira* (2009) Strategies for improving vaccine antigens expression in transgenic plants: fusion to carrier sequences. *Methods Mol Biol* **483**: 275-87.
6. *Goldenkova, I.V., Musiyshuk, K. A. and Piruzian E. S.* (2002) A Thermostable Clostridium thermocellum lichenase-based reporter system for studying the gene expression regulation in prokaryotic and eukaryotic cells. *Mol Biol* **36**: 868-76.
7. *Komakhin R. A., Abdeeva I. A., Salekhi Dzhuzani G. R., Goldenkova I. V., Zhuchenko A. A.* (2005) Thermostable lichenase as a translational reporter. *Genetika* **41**: 30-9.

8. Chichester, J. A., K. Musiychuk, et al. (2009) A single component two-valent LcrV-F1 vaccine protects non-human primates against pneumonic plague. *Vaccine* 27:3471-4.

9. Маали Р., Шимшилашвили Х.Р., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Носов А.М., Лось Д.А., Голденкова-Павлова И.В. (2007) Сравнительное изучение экспрессии нативного и гибридного гена ацил-липидной 9-дельта десатуразы в бактерии *Escherichia coli*. *Генетика* 43(2):176-82.

10. Герасименко И. М., Головач И. С., Кищенко Э. М., Сахно Л. А., Синдаровская Я. Р., Шимшилашвили Х. Р., Шелудько Ю.В., Голденкова-Павлова И.В. (2010) Получение и анализ трансгенных растений, несущих гены D9 и D12 десатураз цианобактерий. *Информационный вестник Вогис* 14 (1): 127-33.

11. Sheludko Y. V., Sindarovska Y. R., Gerasymenko I. M., Bannikova M. A., Kuchuk N. V. (2007) Comparison of several *Nicotiana* species as hosts for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. *Biotech Bioeng* 96:608-614.

12. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. (2005) Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol* 23(6): 718-23.

13. Gils M., Kandzia R., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y. (2005) High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnology Journal* 3: 613-20.

14. Abdeev R. M., Abdeeva I. A., Bruskin S. S., Musiychuk K. A., Goldenkova-Pavlova I. V., Piruzian E. S. (2009) Bacterial thermostable beta-glucanases as a tool for plant functional genomics. *Gene* 436: 81-9.

15. Giritch A., Eliby S., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y. Plant transformation with in vivo assembly of a sequence of interest. **US 0265814** (2009).

Резюме

Были сконструированы вектора, в которых выполнено трансляционное слияние последовательностей целевых генов (интерферона $\alpha 2b$, человеческого соматотропина, RFP и GFP) с последовательностью репортерного белка термостабильной лихеназы *Clostridium thermocellum*. Функциональная активность гибридных продуктов была показана после транзientной экспрессии конструкций в *Nicotiana excelsior*.

Були сконструйовані вектора, у яких виконане трансляційне злиття послідовностей цільових генів (інтерферону $\alpha 2b$, людського соматотропину, RFP і GFP) з послідовністю репортерного білка термостабільної ліхенази *Clostridium thermocellum*. Функціональна активність гібридних продуктів була показана після транзientної експресії конструкцій в *Nicotiana excelsior*.

Plasmid constructs with human interferone $\alpha 2b$, hGH, GFP and RFP fused with reporter *Clostridium thermocellum* lichenase gene were created and their functional activity was shown after transient expression in *Nicotiana excelsior*.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РЫЖИКА ПОСЕВНОГО *CAMELLINA SATIVA L.*

На сегодняшний день в мире чрезвычайно актуальным является поиск альтернативных источников получения биодизеля. Среди различных масличных культур (подсолнечник, соя, рапс, горчица, лен, канола, рыжик и др.) очень перспективной и экономически малозатратной культурой для получения этого вида топлива является рыжик посевной (*Camelina sativa L.*) [1]. Рыжик является самоопыляющейся и достаточно неприхотливой культурой к условиям выращивания. В отличие от других представителей семейства крестоцветных он не подвержен болезням и практически не заселяется насекомыми, отличается высокой холодо- и засухоустойчивостью, а также имеет короткий вегетационный период и может произрастать на всех типах почв, кроме глинистых. Урожайность этой культуры составляет примерно 30 ц/г, а ее семена содержат более 40% масел [2]. Благоприятные условия для выращивания *C. sativa* есть практически во всех областях Украины. Кроме того, в Украине развитие получения дизельного биотоплива имеет большую перспективу в районах, загрязненных радионуклидами в результате катастрофы на Чернобыльской АЭС, благодаря способности растений капустных культур очищать почву от радионуклидов, не накапливая их в семенах.

Таким образом, целью данной работы являлась разработка эффективных методов введения в культуру *in vitro* генотипа рыжика (*C. sativa*), адаптированного к условиям выращивания в различных регионах Украины, регенерации растений из разных типов эксплантов и генетической трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens* как основы для дальнейшего биотехнологического усовершенствования данного вида растений с целью получения биодизеля.

Материалы и методы

В качестве исходного материала для введения в культуру *in vitro* использовали семена *C. sativa* сортообразца Пэрэможэць, любезно предоставленные д.б.н. Д.Б. Рахметовым (Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины). Семена стерилизовали сначала 70%-ным этанолом, затем обрабатывали различными концентрациями коммерческого детергента «Domestos» на протяжении нескольких минут (время обработки подбирали в ходе экспериментов). После стерилизации семена трижды промывали стерильной дистиллированной водой в течение 10 мин и размещали в чашки Петри с безгормональной средой МС [3], содержащей поло-

винный набор макро- и микросолей МС, 3%-ную сахарозу, 0,8%-ый агар, рН 5,7-5,8.

Для изучения эффективности регенерации побегов в качестве эксплантов использовали петиоли и сегменты гипокотилей 5-, 7-, 9- и 14- дневных проростков рыжика как наиболее оптимальный тип эксплантов для инициации органогенеза или эмбриогенеза у многих видов растений в условиях *in vitro*, в том числе из семейства крестоцветных [4, 5]. Для индукции побегов экспланты помещали на несколько вариантов питательных сред, основу которых также составляла среда МС. Состав питательных сред отличался только по своему фитогормональному составу и по концентрациям сахарозы. В работе исследовали влияние ряда концентраций бензиламинопурина (БАП), а также – нескольких соотношений БАП и нафтил-уксусной кислоты (НУК). Всего для изучения регенерационного потенциала *C. sativa* было использовано 12 вариантов питательных сред. Все экспланты инкубировали при 22-24°C и 16-ти часовом фотопериоде. Через каждые три недели материал пассировали на свежей питательной среде. Индуцированные побеги отделяли от эксплантов и пересаживали на среду МС, либо на несколько ее вариантов, содержащих разные концентрации ауксинов, для их дальнейшего роста и укоренения.

В экспериментах по трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* [LBA4404(pBI121)], содержащий химерный ген GFP-TUA6 под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (CaMV) и ген *nptII* в качестве селективного маркерного гена, обеспечивающий устойчивость к канамицину [6]. Ночную культуру агробактерии выращивали в 20 мл жидкой среды LB, дополненной 50 мг/л канамицином, при температуре 28°C и постоянном качании на орбитальном шейкере. Затем агробактерию очищали осаждением при центрифугировании (4000 об/мин) в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок перед инокуляцией разбавляли жидкой средой МС до достижения оптической плотности в интервале от $OD_{600}=0,01$ до $OD_{600}=0,4$. В качестве эксплантов для трансформации использовали петиоли и гипокотили 5- или 7- дневных проростков. Кокультивирование эксплантов с агробактерией проводили от 15 мин до одного часа. Затем экспланты переносили на агаризованную среду для дальнейшего кокультивирования, предварительно промокнув их стерильной фильтровальной бумагой для удаления излишков агробактерии. Через 2-3 дня трансформированные экспланты переносили сроком на 7 дней на восстановительную среду МС, содержащую фитогормоны и 400 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерии, а затем – на аналогичную по составу среду, но с добавлением канамицина в концентрации 100 мг/л для селекции трансгенных линий.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных нами исследований сначала были подобраны оптимальные условия стерилизации исходного материала. В частности,

были определены и установлены эффективные концентрации стерилизующих агентов и время обработки ими семян *C. sativa*. Также было подтверждено высказывание многих авторов о том, что для процесса регенерации побегов в условиях *in vitro* перспективнее использовать клетки более молодых тканей. В частности, было отмечено, что формирование побегов происходило более интенсивно на эксплантах гипокотилей и петиолей, полученных из 5- или 7-ми дневных проростков. На сегодняшний день выполнено всего несколько работ по введению в культуру *in vitro* и получению множественных побегов растения *C. sativa*, но в то же время известно, что для биотехнологического усовершенствования любого вида растений необходимо оценить его регенерационную способность, подобрав наиболее подходящий тип и возраст экспланта, оптимальный состав питательной среды для индукции побегов, а также методику их укоренения. Относительно типа экспланта, то результаты наших исследований показали, что для регенерации в одинаковой мере можно использовать как гипокотили, так и петиоли, хотя в других работах продемонстрировано, что петиоли обладают более высоким регенерационным потенциалом, нежели гипокотили [7,8]. Также нами было установлено, что для эффективной регенерации побегов *C. sativa* больше всего подходит среда МС, содержащая в качестве фитогормонов только БАП (до 4 мг/л), тогда как для укоренения наиболее оптимальной является безгормональная среда МС.

Хорошо также известно, что эффективные методы введения в культуру *in vitro* и регенерации побегов с их последующим укоренением являются важной предпосылкой для дальнейшего успешного проведения экспериментов по генетической трансформации любого вида растений и, в том числе, *C. sativa*. Поэтому следующим этапом работы была разработка метода агробактериальной трансформации этого вида. В ходе проведенных исследований по трансформации было установлено оптимальное значение оптической плотности суспензии клеток агробактерии (в пределах от $OD_{600} = 0,01$ до $OD_{600} = 0,05$), а также оптимальная продолжительность кокультивирования эксплантов с клетками агробактерии – до 2-х суток.

Отбор эксплантов (петиолей и сегментов гипокотилей) осуществляли на селективной среде МС, дополненной 2 мг/л БАП, 100 мг/л канамицина и 400 мг/л цефотаксима. Спустя 2-3 недели после проведения трансформации на эксплантах наблюдали формирование каллуса, из которого впоследствии регенерировали побеги. Затем растения-регенеранты пересаживали на безгормональную селективную среду МС для их дальнейшего роста и развития. Трансгенную природу отобранных линий подтверждали с помощью конфокальной лазерной микроскопии (визуализация экспрессии химерного гена GFP-TUA6) и молекулярно-генетического анализа (метод полимеразной цепной реакции).

Робота виконана при фінансовій піддержці проекту № 03-10 цілевої комплексної програми научних досліджень НАН України «Біомаса як топливне сиров'язь (Біотоплива)».

Литература

1. *Pilgeram A.L., Sands D.C., Boss D., Dale N., Wichman D., Lamb P., Lu C., Barrows R., Kirkpatrick M., Thompson B., Johnson D.L.* Camelina sativa, a Montana Omega-3 and fuel crop // Issue in new crops and new uses. ASHS Press, Alexandria, Va. – 2007.
2. *Рожкован В., Коморов І.* Рижій – альтернативна олійна культура та перспективи його використання // Інформаційний щомісячник «Пропозиція». – 2009. – Режим доступу: <http://www.propozsziya.com>.
3. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays in tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 474-493.
4. *Tang G.H., Zhou W.Z., Li H.Z., Mao B.Z., He Z.H., Yoneyama K.* Medium, explants and genotype factors influencing shoot regeneration in oilseed Brassica spp. // *Agr. Crop Sci.* – 2003. – V. 189. – P. 351-358.
5. *Zhang Yu., Xu J., Han Lu., Wie Wie, Guan Z., Cong L., Chai T.* Efficient shoot regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of Brassica juncea // *Plant Mol. Rep.* – 2006. – V. 24. – P. 255a-255i.
6. *Ueda K., Matsuyama T., Hashimoto T.* Visualisation of microtubules in living cells of transgenic Arabidopsis thaliana L. // *Protoplasma.* – 1999. – V. 206. – P. 201-206.
7. *Tattersal A. & Millam S.* Establishment and *in vitro* regeneration studies of the potential oil crop species Camelina sativa // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1999. – V. 55. – P. 147-149.
8. *Millam S., Mitchell S.M., Moscheni E., Lyon J.E.* The establishment and regeneration of a range of Cuphea germplasm *in vitro* // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1997. – V. 48. – P. 143-147.

Резюме

Наведено результати введення в культуру *in vitro*, вивчення чинників, які впливають на процеси регенерації пагонів із петиолей та сегментів гіпокотилів та їх укорінення, а також результати агробактеріальної трансформації Рижія посівного (*Camelina sativa* L.) з використанням конструкції, що містить химерний ген GFP-TUA6. Трансгенну природу отриманих ліній було підтверджено за допомогою конфокального лазерного мікроскопу та ПЦР-аналізу.

Представлены результаты введения в культуру *in vitro*, изучения факторов, влияющих на процессы регенерации побегов из петиолей и сегментов гипокотилей и их укоренения, а также результаты агробактериальной трансформации Рыжика посевного (*Camelina sativa* L.) с использованием конструкции, несущей химерный ген GFP-TUA. Трансгенная природа полученных линий была подтверждена с помощью конфокального лазерного микроскопа и ПЦР-анализа.

The results of introduction *in vitro*, testing the factors influencing on shoot regeneration and root formation from petioles and hypocotyl explants and also the results of Agrobacterium-mediated transformation of (*Camelina sativa* L.) by plasmid carrying chimeric GFP-TUA6 gene are presented in this study. Transgenic nature of obtained lines was confirmed by confocal laser scanning microscopy and by PCR analysis.

**ЯМСКОВА В. П., КРАСНОВ М. С., РЫБАКОВА Е.Ю.,
КОНСТАНТИНОВСКИЙ А.А., **СТРЕЦКИЙ Г.М., **ШАЙХАЛИЕВ А.И.,
*ЯМСКОВ И. А.**

Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26, e-mail: embrmsk@mail.ru

**Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28*

***ГОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119992, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2*

НОВЫЙ БИОРЕГУЛЯТОР СЫВОРОТКИ КРОВИ БЫКА, КАК ЭФФЕКТИВНОЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЕ СРЕДСТВО

Биорегулятор, выделенный из сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС), принадлежит к группе мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов, которые были обнаружены в различных тканях животных и растений (Ямсков и др., 1999, 2009). Биорегуляторы данной группы стимулируют процессы восстановления и репарации в патологически измененных тканях, как в условиях *in vitro*, так и в условиях *in vivo* (Ямскова и др., 2009; Краснов и др., 2011).

В настоящей работе продемонстрировано выраженное ранозаживляющее свойство сывороточного биорегулятора (СБР).

Материалы и методы

Биорегулятор из сыворотки крови выделяли по разработанной ранее методике (Yamskova et al., 2007). В гель, приготовленный на основе хитозана, выделенного из панциря краба, добавляли СБР в конечной концентрации 10^{-10} мг белка/мл (ХГ-СБР).

Ожог вызывали у крыс (самцы F1 Cambell×Wistar) на спине, прикладыванием стеклянной пробирки с кипящей водой (диаметр 2см). Поврежденную поверхность кожи обрабатывали ежедневно: 1. хитозановым гелем, не содержащим СБР (ХГ) и 2. ХГ-СБР (опыт). В контроле поврежденную поверхность не обрабатывали. На 14-е сутки после ожога крыс выводили из эксперимента и проводили гистологическое исследование области ожога.

Эксперимент по заживлению кожной раны проводили на мышцах-гибридах F1, самцы, весом 20-22 г. У каждой мыши, наркотизированной эфиром, на спине вырезали лоскут кожи, диаметром около 1 см. Раны инфицировали свежеполученным гноем человека, содержащим следующие бактерии: *Staphyloc. aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Мышей разделяли на 4 группы. Животным первой контрольной группы рану инфицировали; животным второй контрольной группы – рану не обрабатывали. В первой опытной группе рану инфицировали и обрабатывали в течение ежедневно ХГ, во второй опытной группе инфицированную рану мышей обрабатывали ХГ-СБР. На 13-е сутки после

ожога мышей выводили из эксперимента и проводили гистологическое исследование области раны.

Исследование по ранозаживлению травмы роговицы проведено на кроликах породы Шиншилла, весом около 1,5 кг, самцы. Каждому животному для наркоза интраназально вводили Zoletil 5 мг/кг в комбинации с ксилазином 2 мг/кг, а также проводили эпibuльбарную анестезию роговицы трехкратной инстилляцией раствора Инокаина (0,4% оксibuпрокаин). Травму наносили трепаном диаметром 8,5 мм на глубину 0,8 мм: делали надрез, затем пинцетом оттягивали край и расслаивали роговицу ножницами, подрезая ткань по кругу. Каждому животному оперировали оба глаза: один глаз был опытным, в который закапывали водно-солевой стерильный раствор СБР (концентрация соответствовала 10^{-12} мг белка/мл); другой – контрольным, в который инстиллировали физ. раствор. Оба раствора инстиллировали в течение 21 дня по 2 капли в каждый глаз дважды в сутки. На 21-ые сутки после травмы кроликов выводили из эксперимента методом воздушной эмболии, роговицы выделяли для гистологических исследований.

Результаты и их обсуждение

Влияние на ожоговую рану. На 14-е сутки после ожога в контрольной группе в области раны наблюдали практически полную реэпителизацию, струп прилегал неплотно к коже, наблюдали незначительное воспаление в дерме и мышечном слое, некроз волосяных фолликулов. Под эпителием видны скопления нейтрофилов. Грануляционная ткань волокнисто-клеточная. В группе животных, рану которых обрабатывали ХГ, наблюдали практически на всей поверхности раны плотное прилегание струпа, реэпителизация была не полной, в области раны под эпителием наблюдали воспаление с инфильтрацией нейтрофилов. В дерме формировалась рубцовая ткань. Воспаление наблюдали и в прилежащем мышечном слое. Волосяных фолликулов в области раны не наблюдали. Грануляционная ткань была клеточно-волоконистая. В группе животных, рану которых обрабатывали ХГ-СБР, отмечали практически полную реэпителизацию с хорошо развитым многослойным эпителием. Струп в некоторых местах отходил и прикреплялся плотно лишь в месте неполной эпителизации. Вновь образованный эпителий был многослойный, хорошо развитый, наблюдаются врастания тяжелей в область дермы (предположительно формирование новых волосяных фолликулов). Воспаление в коже практически отсутствует, лишь незначительные участки инфильтрации нейтрофилов под эпителием. Мышечный слой хорошо развит и сохранен. Грануляционная ткань клеточно-волоконистая. нанесение препарата ХГ-СБР на ожоговую поверхность сразу после ожоговой травмы и его ежедневные однократные аппликации в течение последующих 14-х суток заметно ослабляют развитие тяжелых некротических процессов и ускоряют заживление ожога (Рис. 1).

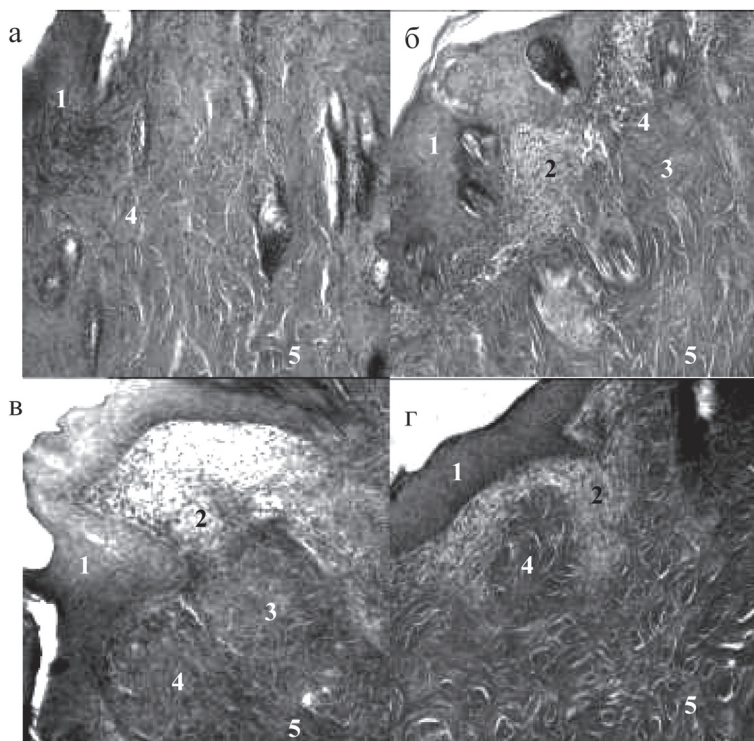


Рис. 1. Противоожоговое действие биорегулятора сыворотки крови на коже крысы на 14 сутки после ожога: а – нативная кожа, б – контроль без воздействия, в – воздействие ХГ, г – воздействие ХГ-СБР. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. Ок. $\times 10$, Об. $\times 20$. 1 – эпителий, 2 – место протекания воспалительного процесса, 3 – рубцовая ткань, 4 – дерма, 5 – мышечные элементы.

Влияние на кожную рану. У животных контрольной группы, рана которых была инфицирована, в центральной части раны наблюдали образование очага хронического воспаления и формирование соединительнотканного рубца в дерме, отмечали отсутствие полной реэпителизации. Во второй контрольной группе животных (необработанная рана) наблюдали практически полную реэпителизацию, незначительное воспаление, в дерме много мелких капилляров, волокна коллагена идут плотными тяжами параллельно эпидермису, то есть формируется фиброзный рубец. В подкожной ткани также происходило формирование рубца, волокна коллагена более рыхлые, чем в дерме, но почти отсутствуют жировые клетки. В опытной группе животных, инфицированную рану которых обрабатывали ХГ-СБР, наблюдали сильное стягивание краев раны и практически полную ее реэпителизацию,

более выраженную, чем у животных обеих контрольных групп, отслойки эпителия практически не наблюдали, отмечали отсутствие очагов воспаления, структура дермы почти восстановлена, в подкожной ткани отмечено восстановление многочисленных протоков желез, а в дерме – волосяных фолликулов. Жировая ткань сильно развита. В отдельных участках под раной отмечено частичное восстановление мышечных элементов. Полученные данные указывают на исключительно высокую эффективность препарата ХГ-СБР в заживлении инфицированных кожных ран у млекопитающих *in vivo*. Препарат не только стимулировал регенерацию в кожной ране, но и способствовал формированию в области травмы морфологически полностью восстановленной ткани (Рис. 2).

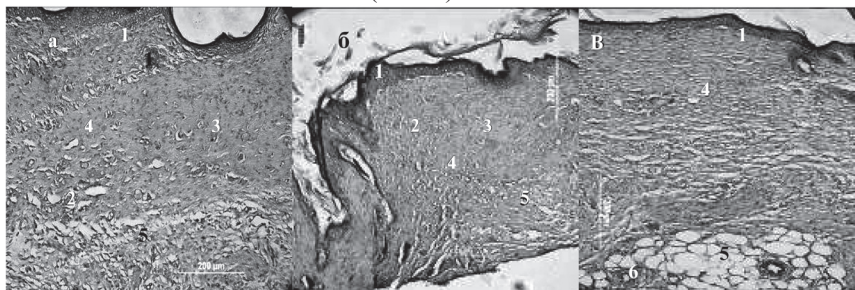


Рис. 2. Заживление кожной раны на 13-е сутки у мыши: а – инфицированная рана, б – неинфицированная рана, в – инфицированная рана, обработанная ХГ-СБР. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. Ок. $\times 10$, Об. $\times 20$. 1 – эпителий, 2 – место протекания воспалительного процесса, 3 – рубцовая ткань, 4 – дерма, 5 – подкожная жировая ткань, 6 – протоки желез.

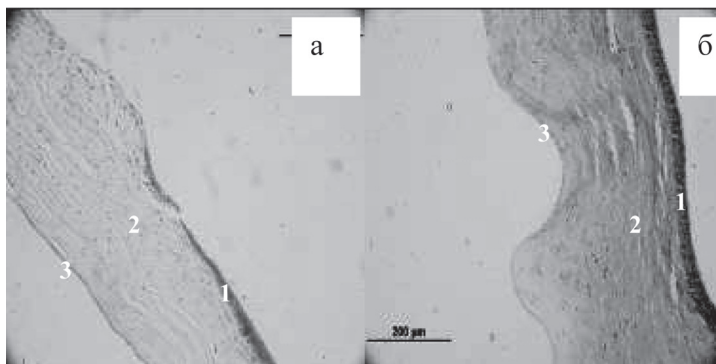


Рис. 3. Ранозаживление роговицы кролика на 21 сутки после проведения травмы *in vivo*: а – контроль (воздействие физ. р-ром); б – при воздействии СБР. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. Ок. $\times 10$, Об. $\times 20$. 1 – эпителий, 2 – строма, 3 – эндотелий.

Влияние на травму роговицы. В контроле при инстиляции кроликам физ. раствора в роговицах можно отметить отслойку эпителия, местами его полное отсутствие (вследствие деградации), наблюдали воспаление в стро-ме под эпителием.

В опыте при применении СБР произошло небольшое утолщение ро-говицы, наблюдали хорошо выраженный многослойный эпителий, мож-но отметить хорошее состояние эпителия и его взаимодействие со стромой – отсутствие отслойки. Видно, что СБР проявляет свойства фактора адге-зии (Рис. 3). Эти результаты согласуются с данными исследований, прове-денных ранее, в которых отмечалось способность этого биорегулятора вли-ять на адгезионные взаимодействия клеток, особенно эндотелия роговицы (Гундорова и др., 1997).

Выводы

Полученные нами результаты исследования действия биорегулятора, выделенного из сыворотки крови крупного рогатого скота, демонстриру-ют его способность в низких дозах стимулировать процессы восстано-вления и ранозаживления в различных тканях, после их повреждения. Обра-щает внимание тот факт, что независимо от механизма повреждения (ре-заная рана, ожог) в различных покровных тканях (роговица глаза, кожа), сывороточный биорегулятор способствовал восстановлению нормальной морфологической структуры тканей и препятствовал образованию фиброз-ного рубца. Можно предположить, что ранозаживляющее свойство биоре-гулятора основано на его способности воздействовать на соединительную ткань, модулирующую состояние покровного эпителия. Активность данно-го биорегулятора характеризуется отсутствием видовой, но наличием тка-невой специфичности (соединительная ткань).

Литература

1. Гундорова Р.А., Хорошилова-Маслова И.П., Ченцова Е.В. и др. // Вопросы офтальмологии. 1997. Т. 113. № 2. С. 12-15.
2. Краснов М.С., Ямскова В.П., Маргасюк Д.В. и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 146-153.
3. Ямсков И.А., Благодатских И.В., Краснов М.С. и др. // Изв.АН Сер. Хим. 2009. №3. С. 623-628.
4. Ямсков И.А., Ямскова В.П., Даниленко А.Н. и др. // Росс. Хим. Жур. 1999. Т. 43. № 5. С.34-39.
5. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов ново-го поколения // Изд. Макс Пресс: 2009. 82с.
6. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., et al // Biochemical physics frontal research / Eds. S.D. Varfolomeev et al. NY, 2007. P. 61-69.

Резюме

Биорегулятор, выделенный из сыворотки крови быка, стимулирует ранозажив-ление различных тканей у позвоночных животных *in vivo*, способствуя восстано-влению их нормальной морфологии, без образования рубца.

Bioregulator isolated from bovine serum, stimulates wound healing of various tissues in vertebrates *in vivo*, contributing to the restoration of normal morphology, without scarring.

Біорегулятор, виділений із сироватки крові бика, стимулює ранозагоєння різних тканин у хребетних тварин *in vivo*, сприяючи відновленню їх нормальної морфології, без утворення рубця.

ЯЦИШИН В.Ю., ШОЛЯК К.В., ФЕДОРОВИЧ Д.В., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, Львів, вул Драгоманова, 14/16, e-mail: yatsyshyn.v@gmail.com

ПІДБІР ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ДЛЯ МАКСИМАЛЬНОГО СИНТЕЗУ ФМН ШТАМОМ- НАДПРОДУЦЕНТОМ T-ОРМ 19 CANDIDA FAMATA

Рибофлавін (вітамін В₂) виконує свої функції в клітині завдяки утворенню флавіномононуклеотиду (ФМН) і флавінаденіндинуклеотиду, що є коферментами флавопротеїнів – окисно-відновних ферментів, які є найбільш універсальними каталізаторами білкової природи. Від 1 до 3% генів бактерійних та еукаріотичних геномів кодують білки, що містять флавіни [1]. Флавопротеїни залучені в процеси дихання, фотосинтезу, метаболізм жирних кислот, вуглеводів, заліза, деяких амінокислот, синтез вітамінів В₆, В₁₂, фолієвої кислоти. Порушення в обміні флавінових коферментів мають серйозні наслідки для організмів як на клітинному так і на тканинному рівнях [2]. Захворювання шкіри, очей, нервової системи, а в останні роки і кардіоваскулярні захворювання, анемії, пухлинний ріст пов'язують із дефіцитом флавінів. У медичній практиці використовують головним чином рибофлавін, хоч ФМН має вищий від рибофлавіну терапевтичний потенціал при лікуванні деяких захворювань нервової системи, очей та шкіри [3]. ФМН також застосовується як барвник у харчовій промисловості. Відновлена форма ФМН може бути використана для детоксикації ксенобіотиків. Основною перевагою використання ФМН є в 200 разів краща його розчинність у воді в порівнянні з рибофлавіном. Широке застосування флавінових нуклеотидів лімітується високою ціною їх препаратів.

У попередні роки нами розроблено схему генно-інженерного конструювання та вперше отримано штами дріжджів, здатні до нагромадження в культуральній рідині ФМН [4-6]. Заміна нативного промотора клонованого гена FMN1 дріжджів *Debaryomyces hansenii* на сильний промотор TEF1 (фактора елонгації трансляції $\alpha 1$) *Candida famata* викликає підвищення (до 200 разів) питомої активності РФ-кінази (каталізує реакцію фосфорилювання рибофлавіну) та зростання вмісту ФМН (до 1000 разів) у культуральній рідині рекомбінантних штамів *S. famata*. Проте продуктивність синтезу ФМН сконструйованими штамми є недостатньою для промислового

виробництва цього нуклеотиду. Раніше ми показали, що оптимізація лише складу середовища призводить до зростання продукції ФМН у 30 разів [7]. В даній роботі було сконструйовано штам *S. famata*, що містив 5-6 копій гена FMN1 та досліджено вплив компонентів поживного середовища та умов культивування (перемішування, рН, температура) на біосинтез ФМН.

Матеріали і методи

Як реципієнтний для конструювання надсинтетика ФМН використано штам дріжджів *S. famata* T-OP 13-76, що містив 3-4 копії гена FMN1 під контролем промотора TEF1 *S. famata* [7]. Дріжджі вирощували при 28-30 °С (якщо не вказано інше) у багатому середовищі YPD (2% глюкоза, 1% бактопептон, 0,5% дріжджовий екстракт) та модифікованому мінеральному середовищі Беркгольдера (СБ). Генно-інженерні маніпуляції проводили за стандартною методикою, аналогічно [7]. Вміст різних форм флавінів визначали на флюорометрі Turner Quantech Digital Filter Fluorometer FM109510-33 після хроматографічного розділення у 2,5% гідрофосфаті натрію. Визначення активності РФ-кінази проводили у безклітинних екстрактах [8]. За одиницю активності ферменту приймали його кількість, яка забезпечує синтез 1 мкмоль продукту за 1 хв. Для виявлення компонентів середовища, важливих для продукції ФМН, застосовувався аналіз Плакетта-Бермана [9]. Аналіз «на поверхні відзиву» використовувався для оптимізації концентрації досліджуваних компонентів середовища і для цього було застосовано центральний композиційний аналіз [10]. Статистичний аналіз математичних моделей здійснено за допомогою пакету статистики ANOVA. Для цих процедур було використано програмний пакет Statistica® 6.0 Stat Soft, Inc.

Результати та обговорення

Для введення додаткових копій гена FMN1 під контролем сильно-го промотора TEF1 у геном сконструйованого нами рекомбінантного штаму T-OP 13-76 *S. famata* [6], який містив 3-4 копії гена FMN1 і синтезував близько 25 мг/л ФМН, було сконструйовано плазмиду, що містила ген резистентності до мікофенольної кислоти. Цією плазмідною, попередньо лінеаризованою рестриктазою PstI, методом електропорації трансформували реципієнтний штам-надсинтетик ФМН *S. famata* T-OP 13-76. Отримано колекцію стабільних, резистентних до мікофенольної кислоти рекомбінантних штамів, які, за результатами Саузерн-блот аналізу, містили 5-6 копій гена FMN1. Питома активність РФ-кінази у таких трансформантів (позначено T-OPM) становила 10-17 МОд/мг білка і була у 5-6 разів вищою, ніж у реципієнтного штаму та в 120 разів – ніж у штаму дикого типу *S. famata*.

Вплив температури та рН на біосинтез ФМН штамом *S. famata* T-OPM 19 вивчали при інкубації клітин у рідкому середовищі з частотою перемішування 220 об./хв, час інкубації – 21 год (табл). Встановлено, що температура культивування має суттєвий вплив на рівень синтезу ФМН. Найкращою для продукції ФМН є температура 28 °С, зниження синтезу ФМН при вищих значеннях температури культивування, імовірно, пов'язане із суттє-

вим пригніченням росту досліджуваного штаму T-OPM 19 C. famata при температурі вищій, ніж 30 °C (дані не наведено). Вплив рН на синтез ФМН не є настільки суттєвим, як вплив температури, оптимальним значенням рН виявилось 5,5.

Крім того з'ясовано, що найвищий рівень синтезу ФМН спостерігається при помірному перемішуванні. Серед дослідженої частоти перемішування (100, 220 та 300 об./хв.), найбільше ФМН (205 мг/л) синтезувалося при 220 об./хв.

Таблиця.

Вміст ФМН (мг/л) у культуральній рідині штаму T-OPM 19 C. famata, за умов інкубації при різних значеннях температури і рН

t, °C \ рН	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
24	101,0±5,22	104,0±9,08	139,0±9,89	146,8±9,89	201,1±5,31	206,0±6,51
28	190,1±7,21	194,0±8,99	205,0±2,11	205,1±7,68	209,0±5,54	196,9±5,76
35	43,0±4,12	44,0±3,55	40,0±3,09	40,0±1,12	33,8±2,11	22,2±3,22
38	19,0±2,11	20,0±3,33	15,5±3,24	13,3±4,05	11,6±2,11	12,2±1,09
42	9,3±2,22	9,9±1,01	11,0±2,10	11,6±8,67	4,4±0,09	2,2±1,09

Досліджено вплив окремих компонентів інкубаційного середовища на синтез ФМН сконструйованим штамом-надсинтетиком C. famata T-OPM 19. Виявилось, що продукція ФМН цим штамом значно більше залежить від джерела азоту, ніж це показано для реципієнтного штаму T-OP 13-76. Використання як джерела азоту сечовини дає змогу підвищити синтез ФМН у 5,7 раза для рекомбінантного штаму T-OPM 19 C. famata. Для з'ясування, які компоненти середовища є важливими для підвищення рівня синтезу ФМН, було застосовано методи математичного моделювання експериментів, зокрема, аналіз Плакетта-Бермана. Використовуючи експериментальні дані, створено математичні моделі, що дали змогу передбачити склад середовища, найкращий для синтезу ФМН сконструйованим штамом. Встановлено, що на нагромадження цього нуклеотиду позитивно впливають ті ж сполуки: іони PO_4^{3-} , Ca^{2+} , $Mo_7O_{24}^{6-}$, Cu^{2+} , та дріжджовий екстракт, як і у випадку реципієнтного штаму. Однак, за допомогою центрального композиційного аналізу показано, що оптимальними для синтезу ФМН є інші концентрації згаданих речовин, а саме: в 10 разів вищий (порівняно із середовищем СБ) вміст іонів фосфату, в 13 разів вищий – іонів кальцію, у 800 разів вищий – іонів молібдату, у 260 разів вищий – іонів міді, а також дріжджовий екстракт (0,22%).

Для перевірки даних центрального композиційного аналізу дріжджі вирощували у колбах об'ємом 100 мл, що містили 10 мл середовища оптимізованого складу (згідно прогнозованих даних моделі) (г/л): сахароза – 20; сечовина – 1; KH_2PO_4 – 4,999; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 2,600; $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ – 0,240; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,0013; дріжджовий екстракт – 2,198; а також біотин – 1

мг/л; мікроелементи у кінцевій концентрації: 0,2 мкМ CuSO_4 ; 4,5 мкМ MnSO_4 ; 2,0 мкМ NaMoO_4 , 0,75 мкМ H_3BO_3 ; 17,5 мкМ ZnSO_4 .

Результати, отримані у трьох окремих експериментах, були близькими до прогнозованих результатів. Передбачувана продукція ФМН становила 328,25 мг/л, тоді як експериментально отримано $318,2 \pm 7,411$ мг/л ФМН, що було в 5,7-раза більше, ніж у середовищі з сечовиною як джерелом азоту до оптимізації складу середовища (55,7 мг/л) та у 36 разів більше, ніж у немодифікованому середовищі СБ (8,80 мг/л). Це підтверджує достовірність теоретичної моделі.

Інкубація 2 мг/мл клітин рекомбінантного штаму T-OPM 19 C. *famata* у ферментері об'ємом 1 літр у середовищі оптимізованого складу дала змогу отримати 385,3 мг/л ФМН. Виділення ФМН у культуральну рідину починалося на 13 год. інкубації та сягало максимуму на 48 год. інкубації, в той час як при культивуванні в колбах максимум продукції ФМН (318,2 г/л) спостерігався на 21 год. інкубації (рис.).

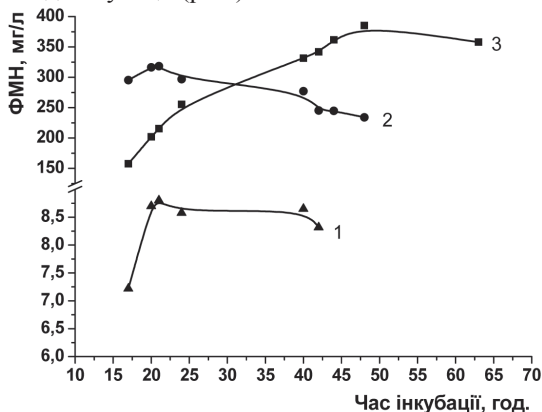


Рис. Продукція ФМН штамом *C. famata* T-OPM 19 при вирощуванні в колбах у синтетичному немодифікованому середовищі СБ (1), оптимізованому середовищі (2) та в оптимізованому середовищі у ферментері (3)

Висновки. Сконструйовано штами *C. famata*, що містили 5-6 копій гена FMN1 та досліджено вплив окремих компонентів інкубаційного середовища та умов культивування на продукцію ФМН одним із таких штамів – *C. famata* T-OPM 19. Використовуючи експериментальні дані, створено математичні моделі, що дали змогу спрогнозувати склад середовища, найкращий для синтезу цього нуклеотиду. Оптимізація середовища за допомогою методів математичного моделювання експериментів дала змогу підвищити синтез ФМН згаданим рекомбінантним штамом у 36 разів. У ферментері, при використанні середовища оптимізованого складу, вдалося досягнути синтезу 385,3 мг/л ФМН штамом T-OPM 19 *C. famata* протягом 48 год. інкубації.

Робота частково фінансована науково-технічним проектом установ НАН України 2011 р. за № 43.

Література

1. *Colibus L., Mattevi A.* New frontiers in structural flavoenzymology // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2006. – vol. 16, № 6. – P. 722–728.
2. *Powers H. J.* Riboflavin (vitamin B-2) and health // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2003. – vol. 77, № 6. – P. 1352–1360.
3. *Хамидова М. Х.* Рибофлавінмононуклеотид в глазной практике // *Вестн. офтальмол.* – 1973. – Т. 1. – С. 41–42.
4. *Ішук О. П., Яцишин В. Ю., Дмитрук К. В. та ін.* Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази // *Український біохім. журн.* – 2006. – Т. 78, № 5. – С. 63–69.
5. *Вороновський А. Я., Дмитрук К. В., Ішук О. П. та ін.* // Пат. 87684 Україна, МПК С 12 Р 25/00, С 12 N 15/00. Спосіб отримання флавінмононуклеотиду (5'-ФМН); заявник і власник Інститут біології клітини НАН України. – № а200612203; заявл. 20.11.2006; опубл. 10.08.2009, бюл. № 15.
6. *Yatsyshyn V. Y., Ischuk O. P., Voronovsky A. Y. et al.* Production of flavin mononucleotide by metabolically engineered yeast *Candida famata* // *Metabol. Eng.* – 2009. – v. 11, №. 3. – P. 163–167.
7. *Yatsyshyn V. Y., Fedorovych D. V., Sibirny A. A.* Medium optimization for production of flavin mononucleotide by the recombinant strain of the yeast *Candida famata* using statistical designs // *Biochem. Eng. J.* – 2010. – vol. 49, № 1. – P. 52–60.
8. *Шавловський Г. М., Кащенко В. Є.* Визначення рибофлавінкіназної активності активності дріжджів // *Укр. біохім. журн.* – 1975. – Т. 47, № 4. – С. 536–541.
9. *Plackett R. L., Burman J. P.* The design of optimum multifactorial experiments // *Biometrika.* – 1946. – v. 33, № 4. – P. 305–325.
10. *Montgomery D. C.* Design and Analysis of Experiments. – [4-th edn.]. – NY: Wiley, 1997. – 196 p.

Резюме

Сконструйовано штами *C. famata*, що містили 5-6 копій гена FMN1 і досліджено умови, оптимальні для синтезу ФМН за умов культивування в колбах та у ферментері штамом *C. famata* T-OPM 19. Оптимізовано склад поживного середовища (оптимальне джерело азоту, макро- та мікроелементи, їх концентрації), а також інші параметри культивування (перемішування, температура, рН) для продукції ФМН.

Сконструйовані штами *C. famata*, которые содержат 5-6 копий гена FMN1, изучены параметры, оптимальные для синтеза ФМН при культивировании в колбах и в ферментёре штамма *C. famata* T-OPM 19. Оптимизирован состав питательной среды (источник азота, макро- и микроэлементы, их концентрации), а также другие параметры культивирования (перемешивание, температура, рН) для продукции ФМН.

Recombinant *C. famata* strains that contain 5-6 copies of FMN1 gene were isolated. The *Candida famata* T-OPM 19 was studied for parameters optimal for FMN synthesis during batch cultivation in shake flasks and in fermenter. Medium composition (optimal nitrogen source, salts and extra additives concentration) and other parameters (agitation, temperature, pH) for enhanced production of FMN by the constructed recombinant strain was optimized.

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

**АТРАМЕНТОВА Л.А., КАРАЧЕНЦЕВ Ю.И., ГОРШУНСКАЯ М.Ю.,
ТЫЖНЕНКО Т.В., ПОЧЕРНЯЕВ А.К., ОПАЛЕЙКО Ю.А.**

*ГУ «Институт проблем эндокринной патологии имени В.Я.Данилевского АМН
Украины», Украина, 61002, Харьков, ул. Артёма, 10, e-mail: atramentova@yandex.ru*

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ +45T/G И +276G/T ГЕНА *ADIPOQ* У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Ген адипонектина *ADIPOQ* находится в локусе 3q27 [1] и экспрессируется в адипозной ткани [2]. Продукт этого гена – гормон адипонектин, обладает противовоспалительным [3] и антисклеротическим действием [4], регулирует β -окисление жирных кислот [5], поддерживает уровень глюкозы в скелетных мышцах и печени [6, 7]. Связь между полиморфизмами гена *ADIPOQ* и ожирением, инсулиновой резистентностью, сахарным диабетом 2 типа (СД 2) отмечалась разными авторами [4, 5, 8-11]. Однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphism, SNP), представляющие собой гуанин-тиминовую замену (G/T) в позиции +276 интрона 2 и тимин-гуаниновую замену (T/G) в позиции +45 экзона 2 гена *ADIPOQ*, а также их гаплотипы в ряде этнических групп и популяций ассоциированы (либо не ассоциированы) с СД 2 типа [6, 12]. Совместное наследование аллелей в гаплотипе проявляется как неравновесие по сцеплению (linkage disequilibrium) и в настоящее время является предметом интенсивных исследований при анализе подверженности мультифакториальным заболеваниям (МФЗ) [13]. Информация о локальной частоте аллелей, генотипов и гаплотипов является базой для формирования программ по выявлению групп повышенного риска по МФЗ. Изложенное определило цель данного исследования: оценить частоты аллелей, генотипов и гаплотипов по локусам +45 и +276 гена *ADIPOQ* у больных СД 2 типа и здоровых людей в населении Харькова.

Материалы и методы

Изучены образцы крови 78 не состоящих в родстве здоровых людей и 179 больных СД 2 типа, украинцев и русских. ДНК выделена из лейкоцитов при помощи ионообменной смолы *Челекс-100 (ChelexR100)* [14]. Однонуклеотидные замены определяли рестрикционным методом путём амплификации в полимеразной цепной реакции [15]. Рассчитаны частоты аллелей и гаплотипов. Для анализа неравновесия по сцеплению рассчитывали показатель *D* (разницу между произведением частот гамет в фазе притяжения и в

фазе отталкивания), показатель D' [16], равный $D'=D/D_{max}$ где D_{max} – максимальное значение D , возможное для данного набора аллелей в двух локусах. Проверку статистических гипотез об ассоциации изученных аллелей, а также сравнение фактических и теоретических рядов проводили с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты генотипирования, приведённые в табл.1, показали наличие в группе больных СД 2 всех девяти возможных генотипов. В группе здоровых людей двойные гомозиготы не были выявлены. По частоте аллелей обоих локусов эти группы значимо не различаются. В контрольной группе частота $+45G$ составляет 0,519, частота $+45T - 0,481$. В группе больных СД 2 эти частоты соответственно равняются $+45G - 0,433$ и $+45T - 0,567$. У больных в локусе $+45$ частота аллеля G (0,519) примерно на 20% выше (0,433), чем в контрольной группе, но разница статистически не значима. Частота $+276G$ (0,481) в контрольной группе и также значимо не отличается от этого показателя в больных группе СД 2 типа (0,472).

Соотношение каждого их моногенных генотипов не соответствует соотношению Харди-Вайнберга и отклоняется от панмиксии в сторону повышенной гетерозиготности. Удельный вес гетерозигот по локусу $+45$ в 1,9 раз выше, а по локусу $+276$ в 1,7 раза выше, чем при равновесии. Избыток гетерозигот в популяционной выборке свидетельствует о том, что локус *ADIPOQ* является селективно значимым и может быть связан с рядом причин. Он может свидетельствовать об отрицательной брачной ассортативности, которая едва ли имеет место. Пролить свет на причину избытка гетерозигот может знание функции гена адипонектина, который контролирует уровень этого гормона. Адипонектиновый статус организма, по-видимому, особенно важен при высоком гликемическом индексе пищи, что характерно для современных условий. Адаптация к этому фактору, возможно, происходит за счёт совершенствования механизма утилизации углеводов [17]. Гетерозиготы по генетически активным аллелям, как известно, обладают более разнообразным набором функционально значимых продуктов. Адаптация популяции к среде, которая характеризуется высоким гликемическим индексом пищи, по-видимому, происходит ещё в пренатальный период путём элиминации гомозиготных генотипов. Зиготы, эмбрионы и плоды, прошедшие через сито отбора должны отличаться высоким уровнем гетерозиготности по гену адипонектина.

Информация о генотипах по двум локусам даёт возможность проанализировать популяционную характеристику, обозначаемую как неравновесие по сцеплению. Суть её состоит в том, что в популяции между одними аллелями может существовать коадаптация, а между другими отсутствовать. Некоторые сочетания аллелей могут формировать высоко приспособленный фенотипы, сочетание других аллелей обуславливать фенотипы плохо приспособленные. Приспособленность популяции повышается,

если аллели передаются в одних сочетаниях и понижается, если передаётся сочетание других. Когда аллели различных локусов в одних комбинациях встречаются чаще, чем в других, то в популяции существует неравновесие по сцеплению.

Таблица 1

Распределение генотипов у больных сахарным диабетом 2 типа (СД 2) и в группе здоровых (К)

Группа		Генотипы +45/+276								
		GG/GG	GG/GT	GG/TT	GT/GG	GT/GT	GT/TT	TT/GG	TT/GT	TT/TT
К	n	0	3	0	5	60	8	0	2	0
	%	0,00	3,85	0,00	6,41	76,92	10,26	0,00	2,56	0,00
СД 2	n	7	7	10	26	52	36	13	21	7
	%	3,91	3,91	5,58	14,53	29,05	20,11	7,26	11,73	3,91

Независимое определение полиморфизмов по каждому из локусов не позволило определить гаплотипы у двойных гетерозигот, которые, как известно, могут обладать разными наборами гаплотипов: цис- (*GG* и *TT*) и транс-положения (*GT* и *TG*). Поэтому соотношение хромосом у двойных гетерозигот приняли таким же, что и в группе гомозигот и моногетерозигот. Распределение гаплотипов в контрольной группе и группе больных соответствует теоретически ожидаемому для свободного сочетания аллелей (табл.2).

Таблица 2

Распределение гаплотипов в популяции и у больных

Гаплотипы 45/276	Контроль		СД 2	
	Фактическое.	Теоретическое.	Фактическое.	Теоретическое
<u>GG</u>	0,218	0,250	0,184	0,204
<u>GT</u>	0,301	0,269	0,249	0,229
<u>TG</u>	0,199	0,231	0,288	0,268
<u>TT</u>	0,282	0,250	0,279	0,299
Всего	1,000	1,000	1,000	1,000
Статистики	$df=3; \chi^2_{st} = 7,82; \chi^2 = 2,57; p>0,05$		$df=3; \chi^2_{st} = 7,82; \chi^2 = 2,25; p>0,05$	

Показатели неравновесия по сцеплению в изученном населении оказались величинами крайне малыми и свидетельствуют об отсутствии ассоциации между аллелями в гаметах (табл. 3).

Таблица 3

Оценка параметров неравновесия по сцеплению

Группа	D	D _{max}	D'	R ²
Контроль	0,0016	0,231	0,007	0,00004
СД 2	-0,0004	0,204	-0,002	0,000003

Выводы

Частоты *SNP* +45T/G и +276G/T гена адипонектина *ADIPOQ* значимо не различаются у больных СД 2 типа и здоровых людей.

По каждому из *SNP* харьковская популяция отклоняется от равновесия Харди-Вайнберга к избытку гетерозигот.

У больных СД 2 типа по сравнению со здоровыми людьми повышен удельный вес гомозигот по каждому из *SNP*.

Распределение *SNP*-гаплотипов соответствует равновесному состоянию популяции.

Литература

1. GenBank is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences. – *GenBank*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

2. Yang W.S., Hsiung C.A., Ho L.T. et al. Genetic epistasis of adiponectin and *PPARγ2* genotypes in modulation of insulin sensitivity: a family-based association study // *Diabetologia*. – 2003. – V. 465. P. 977-983.

3. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin // *Circulation*. – 1999. – V. 100. – P. 2473–2476.

4. Hotta K., Funahashi T., Arita Y. et al. Plasma Concentrations of a Novel, Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2000. – V. 20. – P. 1595-1599.

5. Vimalaewaran K.S., Radha V., Ramya K. et al A novel association of a polymorphism in the first intron of adiponectin gene with type 2 diabetes, obesity and hypoadiponectinemia in Asian Indians // *Hum. Genet.* – 2008. – V. 123(6). – P. 599-605.

6. Hara K., Boutin P, Mori Y. et al. Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population // *Diabetes*. – 2002. – V. 51. – P. 536-540.

7. Fumeron F, Aubert R, Siddiq A. et al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period // *Diabetes*. – 2004. – V.53. – P.1150-1157.

8. Berthier M-T., Houde A., Côte M. et al. Impact of adiponectin gene polymorphisms on plasma lipoprotein and adiponectin concentrations of viscerally obese men // *Journal of Lipid Research*. – 2005. – V.46. – P.237-244.

9. Hu F.B., Doria A., Meigs J.D. et al. Genetic a variation of the adiponectin locus and risk of type 2 diabetes in women // *Diabetes*. – 2004. – V. 53. – P.209-231.

10. Stumvoll M., Tschrutter O., Fritsche A. et al. Assotiation of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity // *Diabetes*. – 2002. – V.51. – P. 37-41.

11. Menzaghi C., Ercolo T., Paola RD et al. A haplotype at the adiponectin locus is associated with obesity and other features of the insulin resistance syndrome // *Diabetes*. – 2002. – V.51. – P.2306-2312.

12. Mackevics V., Heid I.M, Wagner S.A., et al. The adiponectin gene is associated with adiponectin levels but not with characteristics of the insulin resistance syndrome in healthy Caucasians // *European Journal of Human Genetics*. – 2006. – V.14. – P.349-356

13. Slatkin M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future // *Genetics*. – 2008. – V. 9. – P. 477-485

14. Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. Chelex 100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material // *BioTechniques*. – 1991.– №10. – P.506-513

15. Pollin T. I., Tanner K., O'Connell J. R. et al. Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the APM1 gene // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P. 268–274.

16. Хендрик Ф. Генетика популяций. – М.: Техносфера, 2003. – 592 с.

17. Hardy D.S., Hoelcher D.M., Aragaki C. et al. Association of glyemic index and glyemic load with risk of incident coronary heart disease among whites and African Americans with and without type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities study // *Ann Epidemiol*. – 2010. – V. 20(8). – P. 610-616.

Резюме

Частоты *SNP* +45T/G и +276G/T гена адипонектина *ADIPOQ* значимо не различаются у больных СД 2 типа и здоровых людей, находясь в пределах 0,433-0,567. В популяции наблюдается избыток гетерозигот, превышающий состояние равновесия Харди-Вайнберга в 1,7-1,9 раз. Среди больных СД 2 типа повышен удельный вес гомозигот. Частоты *SNP*-гаплотипов указывают на равновесие по сцеплению.

Частоты *SNP* +45T/G і +276G/T гена адипонектину *ADIPOQ* значущо не розрізняються у хворих на ЦД 2 типу і здорових осіб, знаходячись в межах 0,433-0,567. У популяції спостерігається надлишок гетерозигот, що перевищує рівновагу Харди-Вайнберга в 1,7-1,9 разів. Серед хворих на ЦД 2 типу підвищена питома вага гомозигот. Частоти *SNP* -гаплотипів вказують на рівновагу по зчепленню.

Frequencies of *SNP* +45T/G and +276G/T of adiponectin gene *ADIPOQ* for the patients with T2D and healthy people do not meaningfully differentiate. They are within the limits of 0,433-0,567. In population there is surplus of heterozygotes. Distributing of genotypes didn't correspond to Hardy-Weinberg equilibrium: share of heterozygotes is 1.7-1.9 times higher than selectively-neutral value (state of equilibrium). Among the T2D patients specific gravity of homozygotes is enhanceable. Frequencies of *SNP* – haplotypes are in an linkage equilibrium.

БАГАЦКАЯ Н.В., НЕФИДОВА В.Е.

ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины»,
Украина, 61153, Харьков, пр. 50-лет ВЛКСМ, 52-А, e-mail: iozdp@ukrpost.ua, n_
bagatskaya@mail.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МУТАГЕНЕЗА В ЛИМФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРОБАНДОВ, БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ

В последнее время в мире, в том числе и в Украине, наблюдается увеличение частоты заболеваний суставов, в частности остеоартроза (ОА). Общая частота заболеваемости суставов в мире составляет 15-20 %, в России – 8,26 %, в Украине – 10,5 % [2]. Особую озабоченность вызывает тот факт, что в настоящее время возрастает частота развития дегенеративных процессов у лиц молодого возраста и подростков [4].

Доказано, что в патогенезе ОА у подростков значительную роль играют нарушения соединительнотканых структур, более выраженные у лиц женского пола, изменения в различных звеньях иммунитета [5, 6]. Ранняя диагностика, выявление факторов риска заболевания у подростков является чрезвычайно важным для проведения своевременного адекватного лечения, предупреждения прогрессирования ОА и улучшения качества жизни пациентов.

В настоящее время цитогенетические исследования проводятся у больных с разными мультифакториальными заболеваниями, в том числе и ревматическими [1]. В ряде работ показано наличие мутаций в хромосомах 2q [7, 11] и 13q [10], установлено повышение уровня хромосомных aberrаций [8] у взрослых лиц, больных остеоартрозом. Вместе с тем, изучение состояния хромосомного аппарата под воздействием модельного мутагена у подростков, больных остеоартрозом, в Украине не проводились.

Целью настоящего исследования явилось изучение цитогенетических эффектов мутагенеза в лимфоцитах периферической крови пробандов, больных остеоартрозом.

Материалы и методы

Для исследования цитогенетических эффектов мутагенеза в лимфоцитах периферической крови у 25 человек 12–18 лет, больных ОА, проведено цитогенетическое исследование в лаборатории медицинской генетики ГУ «ИОЗДП АМНУ».

Методика выполнялась по стандартному методу [9]. Оценку стабильности хромосомного аппарата лимфоцитов периферической крови у пробандов с ОА проводили до и после воздействия мутагеном-провокатором митомицином *C in vitro*, который вносили на 67 часу культивирования в питательную среду, в конечной концентрации 3 мкг/мл. Фиксацию препаратов проводили на 72 часу культивирования.

При изучении частоты и спектра цитогенетических аномалий у больных ОА анализировали от 50 до 100 метафазных пластинок до и после внесения мутагена-провокатора митомицина *C*. Всего проанализировано 2355 метафазных пластинок до воздействия мутагеном и 2046 – после мутагенной нагрузки. Учитывали все структурные aberrации хроматидного (одиночные фрагменты, делеции короткого и длинного плеч) и хромосомного типов (парные фрагменты, разрывы по центромере, кольцевые хромосомы, преждевременное расхождение сестринских хроматид, нерасхождение хромосом), а также числовые aberrации хромосом (полиплоидные клетки).

Анализ метафазных пластинок проводили с помощью бинокулярного микроскопа фирмы Leica Galen III (Австрия), окуляр 15х, объектив 100х, бинокулярная насадка 1,25х. Расчеты выполнены на PC с использованием прикладного пакета программ Excel, «SPSS Statistics 17,0».

Результаты и обсуждение

На цитогенетическом уровне важную роль в дестабилизации генома человека отражает скрытая хромосомная нестабильность при нормальном кариотипе, которая проявляется как гиперчувствительность хромосом лимфоцитов периферической крови к действию других мутагенов – *in vivo* и *in vitro*. Анализ уровня спонтанных хромосомных aberrаций свидетельствовал о том, что 98 % пробандов с ОА имели aberrации различного типа, тогда как после воздействия митомицином С на лимфоциты периферической крови – 100 % пробандов. Среднегрупповая частота aberrаций, индуцированная митомицином С, составляла $16,47 \pm 0,82$ % на 100 клеток, что в три раза превышало спонтанный уровень aberrаций у этих подростков ($5,90 \pm 0,49$ %, $p < 0,001$). Анализ спектра ХА показал статистически значимое увеличение количества aberrаций как хроматидного, так и хромосомного типов после дополнительной мутагенной нагрузки. Aberrации хроматидного типа и до и после мутагенной нагрузки у пациентов с ОА были представлены преимущественно одиночными фрагментами, однако после внесения в культуральную смесь мутагена-провокатора их частота существенно возросла ($p < 0,001$) (рис.1).

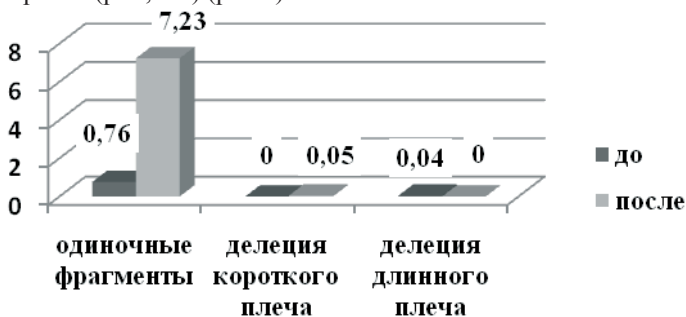


Рис. 1. Уровень aberrаций хроматидного типа у подростков обоего пола, больных остеоартрозом, до и после мутагенной нагрузки, %

Особого внимания заслуживает увеличение уровня aberrаций хромосомного типа почти в 2 раза ($5,10 \pm 0,45$ % до тестирующей нагрузки и $9,19 \pm 0,64$ % – после, $p < 0,001$), в то время, как частота aberrаций хроматидного типа увеличилась почти в 10 раз ($0,81 \pm 0,18$ % и $7,28 \pm 0,58$ %, соответственно, $p < 0,001$). Это можно объяснить тем, что хроматидные aberrации являются маркерами воздействия мутагенов химической природы, в то время как aberrации хромосомного типа – индикаторами радиационного влияния. Установлено статистически значимое повышение частоты парных фрагментов ($p < 0,001$) и разрывов по центромере ($p < 0,05$) после внесения мутагена-провокатора митомицина С (рис.2).

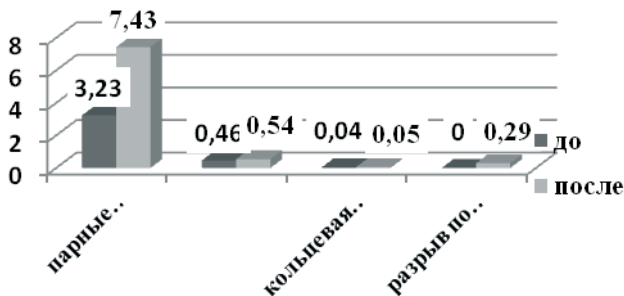


Рис.2 Уровень аберраций хромосомного типа у подростков обоего пола, больных остеоартрозом, до и после мутагенной нагрузки, %

При изучении частоты полиплоидных клеток в культуре лимфоцитов больных ОА, обработанной модельным мутагеном, и без тестирующей нагрузки не было установлено статистических различий ($0,88 \pm 0,21\%$ и $1,27 \pm 0,23\%$ соответственно, $p > 0,05$). В настоящее время выдвигается гипотеза, согласно которой образование полиплоидных клеток может осуществляться двумя путями. Первый механизм заключается в том, что при индукции множественных повреждений ДНК происходит увеличение стадии G_2 за счет их репарации, при этом уменьшается концентрация белка циклина, участвующего в запуске перехода клетки к митозу. В результате из клеточного цикла исключается стадия митоза и происходит прямой переход от стадии G_2 к G_0 и в последующем к G_1 , что приводит к формированию полиплоида. Второй путь формирования полиплоидных клеток – результат межклеточного слияния [3].

Итак, у пробандов с ОА до и после мутагенной нагрузки митомизином С установлено статистически значимое повышение частоты ХА с $5,90\%$ до $16,47\%$ ($p < 0,001$). Анализ спектра ХА показал существенное увеличение количества аберраций как хроматидного (одиночных фрагментов), так и хромосомного (парных фрагментов и разрывов по центрумере) типов после дополнительной мутагенной нагрузки в сравнении со спонтанным уровнем аберраций ($p < 0,001$). Повышение уровня хромосомных нарушений вследствие воздействия мутагена-провокатора митомизина С можно объяснить тем, что специфические функционально активные белки, участвующие в упаковке первичной последовательности ДНК в наднуклеотидные структуры хроматина и метафазных хромосом, могут вносить существенный вклад в частоту хромосомных аберраций в популяциях клеток, подвергшихся генотоксическому воздействию. При определенных условиях часть разрывов нитей ДНК, благодаря этим белкам, может в нерепарированном состоянии пережить несколько поколений клеточных делений [12].

Кроме того, еще одной из причин возникновения геномной нестабильности и повышенной чувствительности к действию мутагенов являются повреждения хромосомных теломер. Возможно, что скрытая хромосомная нестабильность может быть обусловлена и воздействием внешнесредовых факторов (курением, цитомегаловирусной инфекцией).

Таким образом, у пробандов с ОА выявлена дестабилизация генома – повышение уровня хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови. Вероятно, что метаболические нарушения, которые регистрируются при ОА у подростков, могут приводить к нарушению нормально-го митотического цикла, и как следствие – к хромосомной нестабильности.

Литература

1. Багацкая Н.В. Характеристика цитогенетических и дерматоглифических показателей при ювенильном ревматоидном артрите: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук: спец. 03.00.15 «генетика» / Н.В. Багацкая – Харьков, 1991. – 17с.

2. Коваленко В.М. Ревматичні хвороби суглобів: медико-соціальні проблеми в Україні та шляхи їх вирішення / В.М. Коваленко., Н.М. Шуба. // Український ревматологічний журнал. – 2003. – №3 (13). – С. 3–7.

3. Ковалева О.А. Цитогенетические аномалии в соматических клетках млекопитающих / О.А. Ковалева // Цитология и генетика. – 2008. – №1. –С.58–72.

4. Коренев М.М. До проблеми ранньої діагностики остеоартрозу в підлітків / М.М.Коренев, Н.С. Шевченко // X Національний конгрес кардіологів України: матеріали конгр. – К., 2009. – С. 131.

5. Кашкалда Д.А. Зміни активності ферментів катаболізму білків сполучної тканини у дітей, хворих на остеоартроз, в процесі катamnестичного спостереження / Д.А. Кашкалда, І.С. Лебець, Н.С. Шевченко // Моніторинг здоров'я школярів: міжсекторальна взаємодія лікарів, педагогів, психологів: матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю – Х., 2009. – С. 46.

6. Лебець І.С. Особенности суставного синдрома у подростков с начальными проявлениями остеоартроза / І.С. Лебець, Н.С. Шевченко, О.В. Матвієнко // Укр. ревматол. журнал. – 2006. – Т.23, №1. – С.69–72.

7. Association of two loci on chromosome 2 with nodal osteoarthritis [Text] / G.D. Wright, A.E. Hughes, M. Regan, M. Doherty // Ann. Rheum. Dis. – 1996. – N55(5). – P.317-319.

8. Mosaic chromosomal aberrations in synovial fibroblast of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and other inflammatory joint diseases / R. W.Kinne, T. Leibr, V. Beensen [et al.] // Arthritis Res. – 2001. – N3(5). – P.319-330.

9. Moorhead P.S. Chromosomes preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood / P.S. Moorhead, P.C. Nowell, W.J. Mellman. // Exper. Cell. Res. – 1960. – Vol.20. – P. 613-616.

10. Familial osteoarthritis of the hip joint associated with acetabular dysplasia maps to chromosome 13q. [Электронный ресурс] / A. Mabuchi, S. Nakamura, Y. Takatori, S. Ikegawa // Am J Hum Genet. – 2006. – №79 (1). – P.163–168. – Режим доступа: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16773577?itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum&ordinalpos=9.

11. Strong linkage on 2q33.3 to familial early-onset generalized osteoarthritis and a consideration of two positional candidate genes. [Электронный ресурс] / I. Meulenbelt, J.L. Min, C.M. van Duijn [et.al.] // Eur J Hum Genet. – 2006. – №14 (12):1280-7. – Режим доступа: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912703.

12. Rational design and molecular effect of a new topoisomerase II inhibitor, azatoxin / F. Leteurtre, J. Madalengoitia, A. Orr [et. al.] // Cancer Res. – 1992. – Vol.52. – P.4478–4483.

Резюме

При оцінці впливу модельного мутагена митоміцину С на лімфоцити периферическої крові 100 % пробандов с остеоартрозом мали різні порушення хромосом. Середньогруповая частота аберацій, індукційована митоміцином С, в три рази перевищала спонтанний рівень хромосомних аберацій у цих подростков.

При оцінці впливу модельного мутагену митоміцину С на лімфоцити периферичної крові 100% пробандів із остеоартрозом мали різні порушення хромосом. Середньогруповая частота аберацій, індукційованих митоміцином С, у три рази перевищувала спонтанний рівень хромосомних аберацій у цих підлітків.

When evaluating the impact of the model mutagen mitomycin C on peripheral blood lymphocytes 100% probands with osteoarthritis had various by disorders the chromosomes. Group average rate aberrations incidence, induced mitomycin C, was in three times higher than the level of spontaneous chromosomes.

ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О., КЩЕРА Н.І.

ДУ «Інститут спадкової патології АМН України» Україна, 79000, Львів, МСП-169, вул.Лисенка 31а, тел.8(0322)-76-54-99, e-mail: berezovska.s@gmail.com

КАТАМНЕСТИЧНЕ СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ВИПАДКАМИ ПРИРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ СЕРЕД НОВОНАРОДЖЕНИХ У ПОЛОГОВИХ БУДИНКАХ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Природжені вади розвитку (ПВР) є однією з основних причин анте-, інтранатальної загибелі плода, малюкової смертності. Відомо понад 4 тисячі видів природжених вад розвитку. Щороку в Україні народжується близько 12 тис. дітей зі спадковою і природженою патологією. До 20% дітей-інвалідів є інвалідами внаслідок природжених вад. Природжена і спадкова патологія стабільно займає друге місце в структурі смертності дітей першого року життя. Майже кожна третя мертвонароджена дитина також має цю патологію [1].

Серед усіх ПВР найчастіше зустрічаються вади серця. У США кожного року виявляють 25 тисяч новонароджених з ПВР серця, тобто одна дитина із 140 має дефект у серці. В Україні щорічно народжується 4-6 тисяч дітей з патологією серця. Вади серця можуть бути суміжними з іншими природженими вадами, наприклад, хворобою Дауна. З точки зору епігенетики висока питома вага природжених вад серця співвідноситься із якістю довкілля, антропогенним забрудненням. [2]. До факторів високого ризику

формування вроджених вад серця ($OR > 6$) відносяться: вживання алкоголю вагітною (18,2), паління вагітною (7,6), професійно-виробничі шкідливості матері (9,6) і батька (7,3), а також вік матері на момент зачаття дитини, штучне переривання першої вагітності та гострі інфекційні захворювання впродовж вагітності [3,4].

Склалась чітка система профілактики спадкових хвороб: медико-генетичне консультування, прекоцепційна профілактика, пренатальна діагностика, масова діагностика у новонароджених спадкових хвороб обміну, які піддаються дієтичній та лікарській корекції, диспансеризація хворих та членів їх сімей. Впровадження цієї системи забезпечує зниження на 60-70% частоти народження дітей із вродженими вадами та спадковими хворобами. Зокрема проведення комплексного пренатального скринінгу хромосомної патології в Москві за 2003-2008 рр. дозволило знизити кількість дітей із синдромом Дауна на 40% [5,6].

Мета роботи – порівняння репродуктивного, генетичного анамнезу, особливостей перебігу даної вагітності у жінок, які народили дітей з ПВР та контрольної групи, оцінка ризику виникнення ПВР серед новонароджених.

Матеріали і методи

Об'єкт дослідження – випадки природжених вад розвитку у новонароджених пологових установ Львівської області. Методи та об'єм дослідження – збір та аналіз клініко-епідеміологічних і медико-статистичних даних з джерел первинної документації про дітей, які народились в 2002- 2010 роках із ПВР методом “випадок-контроль” шляхом заповнення реєстраційних карт в пологових установах Львівської області. На кожен випадок ПВР заповнено “Карту реєстрації дитини з вродженою аномалією” та, в якості контролю 1-2 “Карти реєстрації здорової доношеної дитини” на здорову доношену дитину цієї ж статі, народжену в найкоротший проміжок часу від дитини з вадою розвитку.

Заповнено 561 карту на дітей із ПВР та 554 карт на здорових дітей. Створено базу ПВР у форматі Excel. За рекомендаціями європейського реєстру брались до уваги наступні вади: аненцефалія, spina bifida, енцефалоцеле, гідроцефалія, анотія, мікротія, щілина піднебіння (без щілини губи), щілина губи (із або без щілини піднебіння), атрезія стравоходу, атрезія прямої кишки, агенезія нирок, редукційні вади кінцівок, полідактилія, омфалоцеле, гастрошизис, дефекти черевної стінки, діафрагмальна кіла, транспозиція магістральних судин, гіпоплазія лівих відділів серця, синдром Дауна, МПВР, мікроцефалія, ариненцефалія / голопрозенцефалія, анофтальмія, мікрофтальмія, атрезія хоан, атрезія або стеноз тонкого кишківника, гіпоспадія, невизначена стать, епіспадія, екстрофія сечового міхура, кистозна хвороба нирок, трисомія 13, трисомія 18.

Отримані дані стандартизовані згідно Міжнародної статистичної класифікації хвороб та споріднених проблем охорони здоров'я десятого пе-

регляду (МКХ – 10) та оброблено методами варіаційної статистики за допомогою пакету програм “Statistica та Microsoft Excel – 2000: визначали середнє арифметичне значення (M), відхилення від середнього арифметичного значення (m), співвідношення шансів (odds ratio – OR), довірчий інтервал співвідношення шансів (Exp).

Шляхом проспективного та ретроспективного аналізу медичної документації пологових установ Львівської області проведено аналіз факторів ризику виникнення ПВР серед новонароджених методом “випадок – контроль” за 2002-2009 роки та 9 місяців 2010 року. За даний період заповнено 561 карту на дітей із природженими вадами розвитку та 554 карти на здорових дітей.

Результати та обговорення

В групі ПВР перша вагітність закінчилася артифіціальним абортom у 6,3% випадків, в контрольній групі – в 3,2% випадків. Загалом в досліджуваній групі артифіціальних абортів було у 11,3% випадків, в контрольній – 8,9% (P>0,05). Самовільним викиднем закінчилося 44 вагітності в досліджуваній групі, з них 40 – викидні першого триместру, що становить 7,1% випадків, в контрольній групі самовільний викидень був у 41-ти випадках, з них в першому триместрі – у 36-ти випадках - 6,4% (P>0,05). Серед матерів групи ПВР померлі діти були у 13-ти випадках, що складає 2,3%, в контрольній групі – у 7-ми випадках, що становить 1,2%. Мертвонародження спостерігалися у 17-ти випадках (3,0%) досліджуваної групи та в 2-ох випадках (0,36%) контрольної групи (P<0,05). Регулярне вживання гормональних контрацептивів спостерігалося в 1,1% випадків групи ПВР та в 0,9% випадків контрольної групи (P>0,05). Порівняння питомої ваги анемії протягом вагітності в досліджуваній та контрольній групах представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння питомої ваги анемії протягом вагітності матерів дітей з ПВР та контрольної групи

Анемія	Випадки ПВР		Контрольна група		Співвідношення шансів (OR)	P
	Кількість (n)	Питома вага %	Кількість (n)	Питома вага %		
Присутні	249	44,3	233	42,1	1,0	> 0,05
Відсутні	256	45,7	260	46,9		
Невідомо	56	10,0	61	11,0		

Під час вагітності анемія була у 44,3% випадків досліджуваної групи та 42,1% – контрольної групи (P>0,05). Ризик народження дитини (odds ratio – OR) з ПВР при анемії у матері складає 1,0 при довірчому інтервалі (0,31; 2,52). Порівняння питомої ваги гестозу першої половини вагітності в досліджуваній та контрольній групах представлено в таблиці 2. Гестоз пер-

шої половини вагітності у матерів був у 32,4% випадків досліджуваної групи та 31,7% – контрольної групи ($P>0,05$). Ризик народження дитини (OR) із ПВР при гестозі першої половини вагітності становить 1,0 при довірчому інтервалі (0,43; 2,54). Порівняння питомої ваги гестозу другої половини вагітності в досліджуваній та контрольній групах представлено в таблиці 3.

Таблиця 2

Порівняння питомої ваги гестозу першої половини вагітності матерів дітей з ПВР та контрольної групи

Гестоз першої половини вагітності	Випадки ПВР		Контрольна група		Співвідношення шансів (OR)	P
	Кількість (n)	Питома вага %	Кількість (n)	Питома вага %		
Присутні	182	32,4	176	31,7	1,0	>0,05
Відсутні	317	56,5	333	60,2		
Невідомо	62	11,1	45	8,1		

Таблиця 3

Порівняння питомої ваги гестозу другої половини вагітності матерів дітей з ПВР та контрольної групи

Гестоз другої половини вагітності	Випадки ПВР		Контрольна група		Співвідношення шансів (OR)	P
	Кількість (n)	Питома вага %	Кількість (n)	Питома вага %		
Присутні	192	34,3	181	32,6	1,0	>0,05
Відсутні	299	53,2	300	54,2		
Невідомо	70	12,5	73	13,2		

Гестоз другої половини вагітності у матерів був у 34,3% випадків досліджуваної групи та 32,6% – контрольної групи ($P>0,05$). Ризик народження дитини (OR) із ПВР при гестозі другої половини вагітності становить 1,0 при довірчому інтервалі (0,55; 2,61). Двічі до 28 – ми тижнів вагітності УЗ дослідження було проведено у 44,5% випадків групи ПВР та у 50,2% – контрольної групи ($P>0,05$). Вроджені аномалії при проведенні УЗД виявлено у 53 випадках, що становить 9,4%. Діагностовано 14 випадків spina bifida, 12 – синдроми МПВР; по 1-му випадку менінгоенцефалоцеле, омфалоцеле, атрезії тонкого кишківника, голопрозенцефалії, вродженого гідронефрозу та синдрому Дауна; по 2 випадки гідроцефалії, аненцефалії, кистозної хвороби нирок та агенезії нирок; по 3 випадки атрезії стравоходу, гіпоплазії лівих відділів серця та діафрагмальної киля та у 4-ох випадках спостерігався гастрошизис.

При порівнянні генетичного анамнезу матерів досліджуваної групи вроджені аномалії виявлено у 9-ти випадках: 3 – природжений вивих стегна, двобічний, 1 – природжений коксартроз кульшових суглобів, косозміщений таз, 1 – полідактилія, 2 – розщелини губи та піднебіння, 1 – вроджена вада серця та 1 – стигми дизембріогенезу. У контрольній групі спо-

стерігалось 7 випадків природжених вад розвитку: 5 – природжений вивих стегна, двобічний, 1 – додаткова нирка, 1 – щілина губи.

Серед близьких родичів групи ПВР вроджені аномалії виявлено у 7-ми випадках – 1 - природжена вада розвитку системи кровообігу, неуточнена (у брата матері досліджуваної групи), 1 випадок – spina bifida, 1 випадок – гіпоспадія, 2 – полідактилії (у діда по батьковій лінії та у двоюрідного брата), 2 – розщелини губи та піднебіння. В контрольній групі природжених аномалій та генетичних порушень у близьких родичів не спостерігалось. В групі дітей з ПВР зареєстрований кровноспоріднений у четвертому поколінні шлюб. В контрольній групі кровноспоріднених шлюбів не було.

Таким чином, зареєстровано більшу кількість випадків мертвонароджень (3,0%) у жінок групи ПВР, ніж у жінок контрольної групи (0,36% випадків). Отже, враховуючи вказані особливості репродуктивного анамнезу та перебігу вагітності і пологів, спостерігається статистично значима різниця досліджуваної групи матерів ($P < 0,05$) з контрольною. Вперше проведено аналіз ефективності використання регіонального реєстру ПВР шляхом впровадження наказу № 501 від 01.08.2006р. «Про внесення доповнень до Програми моніторингу природжених вад розвитку у Львівській області». На додаток до заповнення в пологових будинках області карт реєстрації дитини з вродженою аномалією (ВА) та карт реєстрації здорової доношеної дитини згідно наказу ГУОЗ ЛОДА № 707 від 29.12.2004 р. «Про впровадження Програми моніторингу природжених вад розвитку у Львівській області» районні педіатри Львівської області та м.Львова заповнювали реєстраційну форму на кожну дитину з ПВР щодо даних, які стосуються проведених лікувальних заходів у дітей з ПВР з метою моніторингу стану здоров'я дитини.

В результаті аналізу даних реєстраційних форм усі діти із виявленими природженими вадами розвитку знаходяться на диспансерному спостереженні у поліклініках по місцю проживання. В залежності від виявленої природженої вади розвитку у реєстраційних формах вказано оперативне чи консервативне лікування було проведено. За період від впровадження в дію наказу № 501 від 01.08.2006р. у районах Львівської області померли тринадцять дітей, з яких шість – із вродженою вадою серця, двоє – із синдромом Дауна, двоє – із вродженою вадою головного мозку (синдром Арнольда-Кіарі), одна дитина із МПВР, двоє – із діафрагмальною кілою. У трьох дітей після проведеної консультації у ЛОДКЛ «ОХМАТДИТ» та у Львівському міжобласному медико-генетичному центрі раніше встановлений діагноз був знятий (хлопчик із епіспадією, дівчинка із кишковою

Висновки

1. Не виявлено статистично значимої різниці щодо відсотку артіфіціальних абортів (11,3%), самовільних викиднів (7,1%), померлих дітей (2,3%) у матерів досліджуваної групи ($P > 0,05$) в порівнянні з контрольною (8,9%, 6,4% та 1,2% відповідно).

2. Виявлено статистично значиму різницю ($P < 0,05$) щодо відсотку мертвонароджень, (3,0%) у матерів, які народили дитину з природженою вадю розвитку порівняно із жінками контрольної групи (0,36%) відповідно.

3. Порівнюючи особливості перебігу вагітності, не виявлено статистично значимої різниці щодо анемії, гестозу першої та другої половини вагітності, імунного конфлікту між матір'ю і плодом, рентгенорадіологічного обстеження, ультразвукового дослідження, фізичної та психічної травми, ускладнених та патологічних пологів у жінок групи ПВР в порівнянні з контрольною ($P > 0,05$).

4. Ризик народження дитини з ПВР при анемії у матері складає 1,0 при довірчому інтервалі (0,31; 2,52). Ризик народження дитини із ПВР при гестозі першої половини вагітності становить 1,0 при довірчому інтервалі (0,43; 2,54). Ризик народження дитини із ПВР при гестозі другої половини вагітності становить 1,0 при довірчому інтервалі (0,55; 2,61).

Література

1. *Запорожан В.М., Руденко І.В.* Природжені вади розвитку з позицій епігенетики // ПАГ. – 2009. – №1. – С. 92-96.

2. *Руденко І.В.* Нозологічні форми та частота природжених пороків серцево-судинної системи у новонароджених Одещини // ПАГ. – 2009. – №3. – С. 47-48.

3. Оцінка соціально-гігієнічних факторів ризику виникнення природжених вад серцево-судинної системи Т.В.Сорокман, Н.І.Підвисоцька, Н.О.Попелюк // ПАГ. – 2010. – №1. – С. 28-30.

4. Оцінка медико-біологічних факторів ризику виникнення уроджених вад серцево-судинної системи у дітей / Сорокман Т.В., Підвисоцька Н.І., Ластівка І.В. та інші // Здоров'є ребенка. – 2010.- № 2.- С. 15-18.

5. *П.В.Новиков* Достижение генетики в решении новых проблем педиатрии // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2010. – №1. – С.6-11.

6. Результаты пренатального скрининга хромосомной патологии в Москве / Курцер М.А., Гнетецкая В.А., Митькин В.В. и др. // Акушерство и гинекология. – 2010.- № 3.- С.32-35.

Резюме

Проведено аналіз пренатальних факторів ризику у жінок, які народили дітей із природженими вадами розвитку у м.Львові та Львівській області за 2002-2010 рр. Виявлено статистично вірогідну різницю ($P < 0,05$) по мертвонародженнях (3,0%) у матерів досліджуваної групи порівняно із жінками контрольної групи (0,36%).

Проведен аналіз пренатальних факторів ризику у жінок, родивших дітей с вродженими пороками розвитку в г. Львові та Львівської області за 2002-2010 гг. Виявлено статистически значимую різницю ($P < 0,05$) по мертворожденнях (3,0 %) у матерей исследуемой группы сравнительно с женщинами контрольной группы (0,36%).

The analysis of prenatal risks factors among womens, which gave birth to newborns with congenital malformations in Lviv and Lviv district during 2002-2010 was carried out. The statistically significant increase ($P < 0,05$) in stillborns (3,0%) among mothers of examined group comparatively to control group (0,36%) was revealed.

ГОНТАРЬ Ю.В., ИЛЬИН И.Е

*Институт генетики репродукции Украина, г. Киев, ул. Зоологическая, 3Д
e-mail: genetics-J@yandex.ru*

ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В ИССЛЕДОВАНИИ ПРИЧИН БЕСПЛОДИЯ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР

С бурным развитием вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) и диагностических методик стало возможным проводить преимплантационное исследование эмбрионов. Как правило, такая диагностика доступна жителям больших городов (Киев, Донецк, Львов), а также людям с определенным уровнем дохода. Поэтому в Украине данный метод является относительно новым и мало распространенным.

Следует также отметить, что информированность населения нашей страны о наличии и доступности подобного рода технологий очень низкая, в следствии чего множество пар так и не могут справиться с проблемой бесплодия. Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД) является единственным методом диагностики и профилактики хромосомных патологий, которая проводится до переноса эмбриона в полость матки, чем предотвращает рождение больного ребенка и повышает эффективность ЭКО, особенно у супружеских пар с высоким риском рождения ребенка с хромосомными болезнями. При выполнении этих исследований цитогенетики сталкиваются с определенными трудностями, основными из которых являются ошибочные диагнозы, связанные с высокой частотой мозаицизма при стадии дробления, так как диагностика проводится лишь на одной клетке эмбриона.[1] Но, несмотря на эти трудности, использование этой технологии позволяет иметь супружеской паре здорового ребенка, поскольку при корректном молекулярно-цитогенетическом исследовании пораженные эмбрионы не переносятся в полость матки для имплантации. Таким образом, до переноса эмбрионов в матку можно анализировать хромосомы на всех стадиях клеточного цикла.[2]. Как известно, риском для рождения больного ребенка являются эмбрионы, несущие анеуплоидии в следствии нерасхождения хромосом во время деления клеток, и если в одних зиготах при нарушения хромосомного набора развитие останавливается, то в большинстве других случаев развиваются особи с резко выраженными аномалиями.[3]

Актуальность применения ПГД обусловлена еще и тем, что при проведении пренатального карiotипирования на ранних сроках беременности для принятия взвешенного решения о пролонгации беременности пациенток, находящихся в группе риска, как правило, в I триместре обычно осуществляют аспирацию ворсин хориона/плаценты (CVS), полагая, что карiotип в клетках плаценты идентичен таковому в клетках плода. Однако описаны наблюдения, когда результаты проведения хромосомного анализа

клеток плаценты не совпадали с результатами анализа клеток пуповинной крови плода и новорожденного.[4]

В настоящее время основными показаниями для проведения данной диагностики являются возраст женщины более 35 лет; возраст мужчины старше 39 лет; мужчины с тяжелыми нарушениями сперматогенеза - олигоастенотератозооспермия, тяжелая олигозооспермия; повторяющиеся самопроизвольные прерывания беременности в сроке до 12 недель в анамнезе семейной пары; неоднократные безуспешные попытки лечения бесплодия методом ЭКО; носительство хромосомных перестроек, транслокаций, инверсий и других хромосомных и генетических патологий. [5]

При проведении ПГД используются два основных метода: для числовых хромосомных нарушений и при транслокациях применяется метод FISH (флуоресцентная гибридизация in situ); при проведении ПГД моногенных заболеваний применяется метод ПЦР. Флуоресцентная гибридизация in situ (FISH - fluorescence in situ hybridization) заключается в проведении процедуры молекулярной гибридизации ДНК зонда с ДНК фиксированного на стекле материала (интерфазных ядер или метафазных хромосом) с последующим использованием флуоресцентной микроскопии для детекции результатов гибридизации. Для идентификации индивидуальных хромосом при проведении диагностики наиболее эффективны так называемые хромосомоспецифичные ДНК зонды, созданы на основе клонированных последовательностей сателлитной ДНК человека. Но хромосомы 4 и 9, 5и 19, 13 и 21, 14 и 22 содержат практически идентичные и неотличимые при гибридизации in situ варианты альфоидной ДНК, и, следовательно, надежно идентифицировать эти хромосомы с помощью FISH на основе альфоидных ДНК зондов нельзя. Поэтому широкое применение находят также сайт-специфические (локус-специфические) ДНК зонды, которые маркируют индивидуальные хромосомные участки или индивидуальные гены.[6]

В связи с тем, что в Украине ПГД применяется последнее десятилетие, в литературе почти не представлено данных по исследованию результатов применения. Поэтому целью представленного исследования является анализ показаний для ПГД, определение целесообразности и результативности применения доимплантационной диагностики

Материалы и методы

Сбор первичной информации проводился на базе цитогенетической лаборатории клиники «Институт генетики репродукции» (директор- к.м.н., И.Е. Ильин) в период с 2009 по 2011. Обработаны данные историй болезни 112 пациенток и результаты молекулярно-цитогенетического анализа их эмбрионов. Проанализировано 46 циклов ЭКО/ИКСИ + ПГД.

Материал для доимплантационной диагностики был получен путем аспирации одной клетки (бластомера) эмбриона на станции 8 клеток.[7] Полученный бластомер фиксировался на стекле с помощью смеси метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Последующим этапом являлось на-

несение флуоресцентных ДНК-зондов в зону, где находились ядра биопсированных клеток эмбриона. Обычно используются зонды для хромосом 13, 16, 18, 21, 22, X, Y. Стекло с нанесенными зондами помещалось в гибридизатор с установленной программой денатурации и гибридизации при 37 С длительностью от 4 до 12 часов. Затем для удаления негибридизовавшихся проб, а также с целью уменьшения кросс-гибридизации альфоидных последовательностей с центромерными участками других хромосом, стекла подвергают отмывке. Далее препараты окрашиваются и проводится детекция флуоресцентных сигналов согласно стандартному протоколу. Микроскопический анализ осуществляется с использованием флуоресцентного микроскопа, оборудованного соответствующим набором фильтров и программой автоматической обработки изображения, в данном случае программа ISIS.[8]. Статистическая обработка данных проводилась с использованием современных методов биологической статистики.[9]

Результаты и обсуждение

Было проанализировано 46 случаев проведения ПГД. При этом наибольший возраст пациентки составил 44 года, наименьший – 28 года, что является нехарактерным возрастом для показания к ПГД, но у данной пациентки при кариотипировании была обнаружена сбалансированная транслокация между хромосомами 7 и 16. Средний возраст пациенток, направленных на ПГД, составил в среднем $34,5 \pm 0,7$ лет. Статистические характеристики представлены в таблице 1.

Таблица 1

Средний возраст пациенток, направленных на ПГД

Показатель	Средний возраст	Статистическая ошибка	Стандартное отклонение (s)	Статистическая ошибка	Дисперсия (s ²)	Статистическая ошибка	Коэффициент вариации C _v , %	Статистическая ошибка, %
Значение	34,50	0,70	4,60	0,48	15,21	1,60	13.30	0.43

Показания, по которым проводилась преимплантационная диагностика, имели различную этиологию, а именно: невынашивание (13 пациенток), критичный возраст (10 пациенток), 1 неудачный цикл ЭКО/ИКСИ (4 пациентки), 2 неудачных цикла ЭКО/ИКСИ (6 пациенток), 3 неудачных цикла ЭКО/ИКСИ (2 пациентки), наличие хромосомных перестроек – транслокации (5 пациенток), селекция пола - при наличии 2 однополых детей (4 пациентки), низкоуровневый мозаицизм (2 пациентки). Данные представлены в таблице 2.

В соответствии с результатами, полученными в ходе анализа ядер бластомеров, представляется описание количества исследуемых хромосом. По протоколу молекулярно-цитогенетического исследования проводится трансфер эмбриона, если не обнаружены анеуплоидии.

Таблица 2

Показания к ПГД.

	Невынашивание	Возраст	Неудачные циклы 1	Неудачные циклы 2	Неудачные циклы 3	Транслокации	Селекция пола	Низкоуровневый мозаицизм
Количество пациенток	13	10	4	6	2	5	4	2
Доля, %	28.3	21.7	8.7	13.0	4.3	10.9	8.7	4.4

Данные по результатам проведенной доимплантационной диагностике представлены в таблице 3

Таблица 3

Результаты ПГД

	Наступление беременности	Отсутствие беременности	Без эмбриотрансфера
Количество пациенток	25	16	5
Доля, %	54.3	34.8	10.9

В отечественной литературе практически не представлена информация об эффективности ПГД и об анализе ее зависимости от показаний, что требует дальнейших исследований на более обширном материале

Выводы

Преимплантационная генетическая диагностика снижает риск рождения ребенка с определенными хромосомными заболеваниями благодаря выбору и переносу в матку только тех эмбрионов, которые не имеют хромосомных нарушений, снижает риск невынашивания и многоплодия, увеличивает шанс на успешную имплантацию и благополучное рождение ребенка.

Благодарности

Авторы выражают признательность доценту кафедры генетики и цитологии ХНУ имени В.Н. Каразина А.М.Федоте за плодотворное сотрудничество.

Литература

1. *T.Baczkovski, R.Kurzawa, W.Glabowski*, Methods of embryo scoring in *in vitro* fertilization // *Reproductive Biology*, Vol.4, No.1, 2004
2. *J.Brezinova, I.Oborna*, Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome// *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009
3. *Гинтер Е.К.*, Медицинская генетика, М.: 2003.
4. *Окунева Е.Г., Шилова Н.В., Золотухина Т.В., Кузина Т.В., Юдина Е.В.* Проблемы оценки результатов пренатального хромосомного анализа клеток плода на ранних сроках беременности // Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков, Ростов-на-Дону. - 2010. – с. 133
5. *G. Harton, P. Braude, A. Lashwood, A. Schmutzler, J. Traeger-Synodinos, L. Wilton, and J.C. Harper*, ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization

of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening //Human Reproduction, Vol.0, No.0 pp. 1–6, 2010

6. Ворсанова С.В., Юров Ю.Г., Соловьев И.В., Демидова И.А. и др. Современные методы молекулярной цитогенетики в пре- и постнатальной диагностике хромосомной патологии // Клиническая лабораторная диагностика. - 2000. - № 8. - С. 36 - 39.

7. G.L. Harton, M.C. Magli, K. Lundin, M. Montag, J. Lemmen, and J.C. Harper, ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS) // Human Reproduction, Vol.00, No.0 pp. 1–8, 2010

8. Ворсанова С.В., Юров Ю.Г., Чернышов В.Н., Медицинская цитогенетика – 2006, Москва, с.219-222

9. Атраментова Л.А., Утевская О.М. Статистические методы в биологии-Горловка, 2008, с.30-64

Резюме

Преимплантационная генетическая диагностика с применением метода FISH (флуоресцентная гибридизация in situ) является наиболее актуальной при лечении бесплодия методом ЭКО и профилактики рождения детей с хромосомной патологией. В клинике «Институт генетики репродукции» проведено исследование по результатам 46 циклов ЭКО/ИКСИ + ПГД. Эффективность составила 54,3%

Преімплантаційна генетична діагностика з використанням методу FISH (флуоресцентна гібридизація in situ) є найбільш актуальною при лікуванні безпліддя методом ЕКЗ і профілактики народження дітей з хромосомною патологією. В клініці «Інститут генетики репродукції» проведено дослідження за результатами 46 циклів ЕКЗ/ІКСІ+ПГД. Ефективність складала 54,3%

Preimplantation genetic diagnosis using the method of FISH (fluorescent hybridization in situ) is most relevant in the treatment of infertility by IVF and prevention of children born with chromosomal abnormalities. In the clinic, “Institute of genetics of reproduction”, a study based on 46 cycles of IVF / ICSI + PGD. Efficacy was 54.3%

ДЬОМІНА Е.А., МИХАЙЛЕНКО В.М.

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, 03022, Київ, вул. Васильківська, 45, e-mail: edjomina@ukr.net

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ОКСИДІВ АЗОТУ В РОЗВИТКУ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ЕФЕКТІВ ПРИ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

Оксид азоту (ОА) регулює численні фізіологічні функції, має широкий спектр біологічної дії, зокрема бере участь у розвитку ряду патологічних станів. Багато біологічних функцій, залежних від активності ОА, безпосередньо зв'язані з ендogenousним утворенням нітрозотіолов (НТ) [1]. НТ являються основною формою транспорту ОА, який вивільняється з них при фізіологічних умовах та здатний створювати передумови для виникнення і акумуляції аберантних клітин, що в подальшому може обумовити розвиток неоплазій. Зібрано багато доказів участі НТ в регуляції канцерогенезу та

метастазування шляхом впливу на функціонування білків, задіяних на різних стадіях розвитку пухлин [2]. Визначено здатність NO та його похідних пошкоджувати структуру ДНК, що доводить не тільки його участь в утворенні хромосомних перебудов, але й в індукції пухлин [1].

Відповідно до сучасних уявлень, Т-лімфоцити людини здійснюють імунний нагляд за антигенною стабільністю внутрішнього середовища організму, а здатність до бласттрансформації під впливом мітогенів відображає їх функціональну активність [3]. Тому найбільш плідним підходом до вивчення комбінованих ефектів НТ та радіації на геном людини є цитогенетичний аналіз лімфоцитів периферичної крові, як найбільш чутливих клітин до дії мутагенних та канцерогенних факторів, а також оцінка їх проліферативної активності.

Експериментальні та епідеміологічні спостереження переконують в тому, що мутації індуковані факторами навколишнього середовища обумовлюють підвищення рівня захворювань, в тому числі онкологічних. Чинне місце у вирішенні/подоланні цієї проблеми має займати вивчення закономірностей та механізмів дії комутагенів, які можуть суттєво модифікувати (а саме – підсилувати) дію мутагенів довкілля, в тому числі NO і радіації [4, 5]. Варто зазначити, що особливу небезпеку серед виявлених комутагенів являють собою лікарські препарати, наприклад, кофеїн.

Мета роботи: дослідити особливості впливу НТ, рентгенівського випромінювання та комутагену (кофеїну) на проліферативний та цитогенетичний статус лімфоцитів периферичної крові людини (дослідження *in vitro*).

Матеріали і методи

Матеріалом для досліджень були лімфоцити периферичної крові (ЛПК) практично здорових осіб (34 спостереження). Культивування ЛПК проводили за модифікованим напівмікрометодом [6] протягом 52 год при температурі 37⁰С, що забезпечує метафазний аналіз клітини в першому мітозі.

В якості показника проліферативної активності ЛПК використовували значення мітотичного індексу, для чого визначали частину ядер, які знаходились на стадії мітозу. На відміну від загальноприйнятої методики [7], з метою зменшення величини стандартної похибки аналізували 2000-3000 клітин на кожне спостереження [8]. Культуру клітин опромінювали на установці «РУМ-17», в умовах: потужність дози – 0,41 Гр/хв, сила струму – 10 мА, напруга 200 кВ, фільтри Cu (0,5мм) + Al (1мм). Доза рентгенівського випромінювання 0,5-1,0 Гр.

В якості НТ використовували нітрозований глутатіон, який додавали в культуру клітин в діапазоні концентрацій 0,25–1,0 мкМ/л, кофеїн – 200–600 мкг/мл крові.

Результати

Показано, що НТ, незалежно від концентрації (0,25-1,0 мкМ/л), пригнічує мітотичну активність лімфоцитів майже на 30% порівняно з контролем (рис. 1).

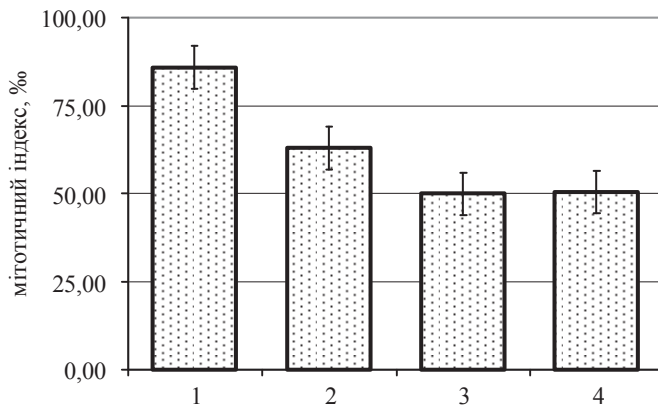


Рис. 1. Вплив НТ на мітотичну активність лімфоцитів людини (*in vitro*): 1 – контроль, 2 – НТ, 0,25 мкМ/л, 3 – НТ, 0,5 мкМ/л, 4 – НТ, 1,0 мкМ/л

При комбінованій дії НТ (0,5 мкМ/л) та опроміненні в дозі 0,5 Гр (верхня межа інтервалу малих доз) мітотичний індекс лімфоцитів порівняно з контролем знижується більше ніж на 60% (рис 2).

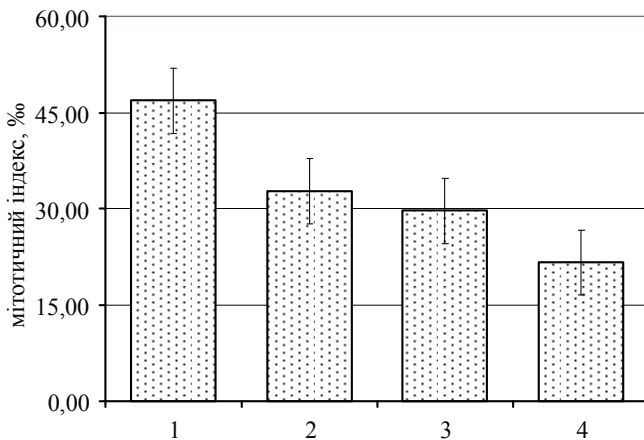


Рис. 2. Комбінований вплив НТ та опромінення на мітотичну активність лімфоцитів людини (*in vitro*): 1 – опромінення, 2 - опромінення + НТ (0,5мкМ/л), 3 - опромінення + НТ (0,5мкМ/л)+кофеїн (200 мкг/мл), 4 - опромінення + НТ (0,5мкМ/л) + кофеїн (600 мкг/мл).

Досліджено вплив НТ на хромосомний апарат лімфоцитів людини. Результати цитогенетичного аналізу свідчать про індукцію аберацій хроматидного типу під впливом НТ, причому в спектрі аберацій хромосом присутні як делеції, так і обміни (12 та 6,3/100 метафаз, відповідно).

Найбільший модифікуючий вплив комутагену кофеїну на мітотичну активність лімфоцитів спостерігався за дії найменшої концентрації НТ (0,25 мкМ/л) та найбільшої концентрації кофеїну (600 мкг/мл) – проліферативний потенціал лімфоцитів людини пригнічувався в 2,5 рази порівняно з інтактним контролем (85,0% і 33,6%) та майже в 2 рази (62,0% і 33,6%) порівняно з дією лише НТ (рис. 3).

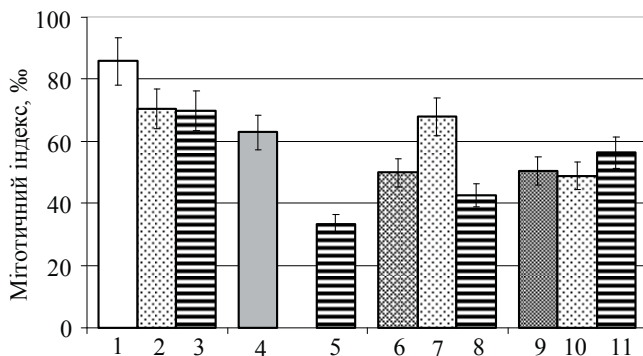


Рис. 3. Вплив кофеїну (мкг/мл крові) на мітотичну активність лімфоцитів людини за дії різних концентрацій НТ: 1 – контроль, 2 – кофеїн, 200 мкг/мл, 3 – кофеїн, 600 мкг/мл, 4 – НТ, 0,25 мкМ/л, 5 – НТ (0,25 мкМ/л) + кофеїн (600 мкг/мл), 6 – НТ, 0,5 мкМ/л, 7 – НТ (0,5 мкМ/л) + кофеїн (200 мкг/мл), 8 – НТ (0,5 мкМ/л) + кофеїн (600 мкг/мл), 9 – НТ, 1,0 мкМ/л, 10 – НТ (1,0 мкМ/л) + кофеїн (200 мкг/мл), 11 – НТ (1,0 мкМ/л) + кофеїн (600 мкг/мл).

Таким чином, на рівні лімфоцитів периферичної крові, як моделі найбільш уразливих до дії мутагенів соматичних клітин людини, показано:

- НТ, незалежно від концентрації (0,25-1,0 мкМ/л), пригнічують проліферативну активність лімфоцитів на 30% порівняно з контролем;
- при комбінованій дії НТ і опромінення проліферативна активність лімфоцитів знижується на 60% порівняно з контролем;
- рівень аберацій хроматидного типу зростає за дії НТ в концентрації 0,5 мкМ/л;
- при комбінованій дії НТ (0,25 мкМ/л) та кофеїну (600 мкг/мл крові) проліферативний потенціал лімфоцитів людини пригнічується майже в 2,5 рази порівняно з інтактним контролем та майже в 2 рази порівняно з дією лише НТ.

Висновки. Показано цитотоксичну дію НТ на соматичні немалігнізовані клітини людини, в тому числі при комбінованій дії з рентгенівським

випромінюванням. Кофеїн підсилював дію НТ, пригнічуючи проліферативний потенціал клітин.

Література

1. Nitric Oxide (NO) and Cancer Prognosis, Prevention, and Therapy. Benjamin Bonavida Editor, Springer. New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 2010. – 513 p.

2. Gow, A.J., Chen, Q., Hess, D.T., Day, B.J., Ischiropoulos, H., and Stamler, J.S. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J. Biol. Chem.*, 2002. v. 277. –P. 9637–9640

3. Груневич Ю.А., Дёмина Э.А. Иммуные и цитогенетические эффекты плотнo- и редкоионизирующих излучений. Под. ред. А.А. Ярилина. – К.: «Здоров'я». – 2006. – 200 с.

4. Дурнев А.Д. Модификация мутационного процесса в клетках человека // Вестник РАМН. – 2001. – №10. – С. 70-77.

5. Dyomina E.A., Glavin A.A., Mikhailenko V.M., Kriachok L.M. S-nitrosothiol impact on the mitotic activity and chromosomes of human lymphocytes. Internation. Conference, Sept. 21-24, Kyiv. Tumor and host: novel aspects of old problem // *Experimental Oncology*, 2010. – 2010. – Vol. 32 Suppl. – P. 36.

6. Демина Э.А., Демченко Е.Н., Барияк И.Р. Характер калибровочных кривых в цитогенетической дозиметрии // Вісн. Укр. товариства генетиків і селекціонерів. – 2009. – Т.7, №2. – С. 184-190.

7. Алмазов В.А., Афанасьева Б.В., Зарицкий А.Ю. Физиология лейкоцитов человека. – Л.: Наука. – 1979. – 232 с.

8. Шкарупа В.Н., Дёмина Э.А., Демченко Е.Н. Влияние малых доз облучения на формирование цитогенетических повреждений в культуре лимфоцитов человека. Матер. VI съезда по радиац. исслед. – М.: 2010. – Т.1. – С. 172.

Резюме

Нітрозотіолі проявляють цито та генотоксичну дію на соматичні немалігнізовані клітини людини як самостійно, так і в комбінації з рентгенівським випромінюванням. Кофеїн підсилював дії НТ пригнічуючи проліферативний потенціал клітин.

Нитрозотиолы проявляют цито и генотоксическое действие на соматические немалигнизированные клетки человека как самостоятельно, так и в комбинации с рентгеновским излучением. Кофеин усиливал действие НТ, подавляя пролиферативный потенциал клеток.

Oncology and Radiobiology of National Academy of Sciences of Ukraine S-nitrosothiols show cyto- and genotoxic effects on the human somatic noncancer cells both independently and in combination with a γ -irradiation. A caffeine strengthened the effect of NT by inhibition of cells proliferation.

ДМИТРУК І.М.¹, ТИРКУС М. Я.¹, МАКУХ Г.В.¹, КЩЕРА Н.І.¹,
ГНАТЕЙКО О.З.¹, ПОЛЩУК Р.С.², ЦИМБАЛЮК І.П.², ДОРОШ О.І.²,
ТРОЯНОВСЬКА О.О.², КУПЧАК О.І.², КОЗЛОВА О.І.², СТЕПАНЮК О.І.²

1 ДУ «Інститут спадкової патології АМН України»

Україна, 79000, Львів, вул. ЛИСЕНКА, 31а, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua

2 Західно-Український спеціалізований дитячий медичний центр

Україна, 79035, Львів, вул. Дністерська, 27

АНАЛІЗ ПОЛІМОРФНОГО ЛОКУСУ G308A ГЕНА TNF- α У ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ

Одним із сучасних підходів до попередження розвитку тієї чи іншої патології є генетичне прогнозування ризику її формування. За останні роки зростає частота злоякісних пухлин як серед дорослого населення так і серед дітей. Тому важливими є розробка нових діагностичних та генетичних критеріїв схильності до злоякісних пухлин та визначення ризику появи онкозахворювань, які спричинені факторами генетичного характеру.

Серед генів-кандидатів, які беруть участь у регуляції процесів апоптозу і клітинної проліферації, важливе значення мають гени фактору некрозу пухлин (*TNF α*) та їх рецепторів [1]. Це визначається тим, що чинники некрозу пухлини через свої специфічні рецептори можуть бути як індукторами апоптозу, так і стимулювати мітогенну активність клітин [2].

TNF- α (*tumor necrosis factor*) - фактор некрозу пухлин-альфа, це позаклітинний білок, багатofункціональний прозапальний цитокін, що утворюється в основному моноцитами та макрофагами. *TNF- α* бере участь у розвитку запальних реакцій і відіграє важливу роль в патогенезі запальних, аутоімунних і злоякісних захворювань. Спочатку був запропонований антиканцерогенний ефект фактору некрозу пухлин, проте дослідження *in vitro* та *in vivo* показали його онкогенність. *TNF- α* є ключовою ангіогенною молекулою, яка може сприяти ангіогенезу безпосередньо, стимулюючи проліферацію ендотеліальних клітин і непрямим шляхом модулюючи експресію інших проангіогенних факторів. Крім того, *TNF- α* , як відомо, індують експресію молекул адгезії, які можуть приймати участь у збільшенні рухливості і інвазивності/метастазуванні пухлинних клітин [3,4]. *TNF- α* впливає на процеси кровотворення, пригнічуючи еритро-, мієло-і лімфопоєз.

Найбільш вагомим при цілому ряді патологічних станів є поліморфізм промоторної ділянки гена фактору некрозу пухлин - (308G>A) [5, 6]. Відомо, що поліморфізм 308G>A гена *TNF- α* асоційований з рівнем експресії стероїдних рецепторів на малігнізованих клітинах молочної залози [7].

Отже, метою даної роботи було провести молекулярно-генетичне дослідження алейних варіантів 308G>A гена *TNF- α* в пацієнтів з онкологічними хворобами.

Матеріали та методи

Першу досліджувану групу склали 25 дітей з лейкеміями (65%-хлопчики, 35%- дівчатка) у віці від 2 до 16 років. Діагноз онкогематологічної патології встановлено вперше. Серед них - 20 осіб із гострою лейкемією, 3 осіб із лімфоною Годжкіна та 2 особи з негоджкінською лімфоною. Другу досліджувану групу склали 25 осіб з раком молочної залози. Жінки з раком молочної залози (I - IV ст.) були у віці від 35 до 75 років з обтяженим сімейним анамнезом щодо раку молочної залози чи раку яєчників. Контрольну групу склали 66 здорових осіб. Всі особи досліджуваних та контрольної груп є вихідцями Західного регіону України.

Виділення та очищення ДНК проводили методом висолювання [8]. Для детекції алелів *TNF-α* 308G>A використовували алель-специфічну ПЛР [9]. Використовували олігонуклеотидні праймери та 2xPCR Master Mix («Fermentas», Литва). ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик». Проводили 35циклів ПЛР в наступному режимі: денатурація ДНК (94°C) 30сек., відпал праймерів (57°C) 20сек., елонгація ДНК (72°C) 20 сек. та фінальна елонгація – 3 хв. (72°C).

Аналіз продуктів ПЛР проводили шляхом електрофорезу в 2% агарозному гелі та сканували електрофореграми на ультрафіолетовому транслюмінаторі «ЕСХ-15.М». Результати сканування гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» при довжині хвилі 256 нм. Перевірку статистичних гіпотез проводили на рівні значущості $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

В результаті даної роботи апробовано методику молекулярно-генетичного дослідження поліморфних варіантів *TNF-α* 308G>A за допомогою алель-специфічної ПЛР. В результаті ПЛР реакції синтезуються фрагменти величиною 273 п.н. (для алелів G або A). Молекулярно-генетичний аналіз поліморфного локусу 308 G>A гена *TNF-α* представлено на даній електрофореграмі (Рис.1).

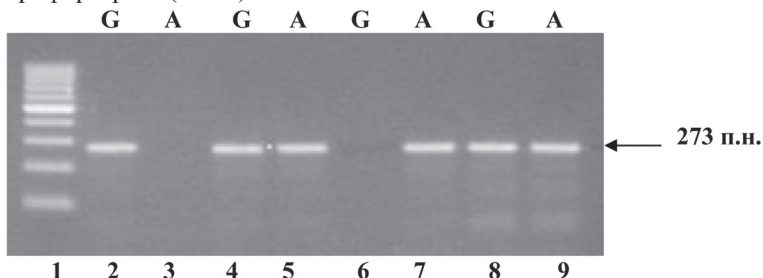


Рис. 1. Електрофореграма алель-специфічної ПЛР реакції (2% агарозний гель): 1- маркери молекулярної ваги (Ladder 100 bp); 2,3 – генотип GG; 4,5 – генотип GA; 6,7 – генотип AA, 8,9 – генотип GA.

Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфного локусу 308 G>A гена *TNF-α* у 25 осіб з раком молочної залози, 25 дітей з лейкеміями та та 66 осіб контрольної групи. За результатами генетичного тестування і статистичних розрахунків встановлено розподіл генотипів та алелів поліморфного локусу 308 G>A гена *TNF-α* серед пацієнтів з онкозахворюваннями у порівнянні з контрольною групою. Також для даного поліморфного локусу приведені результати статистичного обрахунку відносного ризику за рецесивною та домінантною моделями (табл.1.).

Аналіз розподілу генотипів поліморфного локусу 308G>A гена *TNF-α* продемонстрував вірогідно вищу частоту генотипу 308GG в групі пацієнтів з лейкеміями (88%) у порівнянні з контрольною групою (62%), а також підвищену частоту генотипу 308GG у пацієнтів з раком молочної залози (80%). В дослідних групах пацієнтів генотипу 308AA не виявлено, що може бути пов'язано з невеликим об'ємом вибірок. Частота гетерозигот *TNF-α* 308 GA у групі пацієнтів з лейкеміями (12%) була вірогідно нижчою в порівнянні з контрольною групою (36%). В той же час, встановлено, що наявність 308GG генотипу гена *TNF-α* збільшує ризик виникнення раку молочної залози в 2,44 рази (OR= 2,44), а лейкемії 4,5 рази (OR= 4,5).

Таблиця 1

Розподіл генотипів та алелів поліморфного локусу *TNF-α* 308G>A у досліджуваних та контрольній групах

<i>TNF-α</i> - 308G/A	Контрольна група (n=66)		Рак молочної залози (n=25)				Лейкемії (n=25)			
	n	%	n	%	p	OR	n	%	p	OR
Генотип										
GG	41	62	20	80	≥ 0.5	2,44	22	88	≤0.5*	4,5
GA	24	36	5	20	≥ 0.5	0,44	3	12	≤0.5*	0,23
AA	1	2	0	0	≥ 0.5	0	0	0	≥ 0.5	0
Алелі										
G	106	80	45	90	≥ 0.5	-	47	94	≥ 0.5	-
A	26	20	5	10	≥ 0.5	-	3	6	≥ 0.5	-

*P< 0.05, статистично вірогідна відмінність

При аналізі розподілу алелів поліморфного локусу 308 G>A гена *TNF-α* встановлена підвищена частота А алелю в контрольній групі (20%) порівняно з дослідними (10% та 6%). Частота G алелю була вищою в пацієнтів з раком молочної залози (90%) та лейкеміями (98%) в порівнянні з групою контролю. Відсутність статистично вірогідної відмінності може бути пов'язана з недостатньою вибіркою дослідних груп. Отримані нами результати можуть свідчити про протективну роль А алеля поліморфного локуса 308G>A гена *TNF-α*, проте для остаточних результатів необхідно провести дослідження на більших вибірках.

Дані різних авторів щодо асоціації між 308G>A поліморфним локусом гена *TNF-α* та схильністю до виникнення раку суперечливі. Так, дослідження серед росіян та жителів Тунісу показали асоціацію між 308G>A поліморфним локусом та виникненням раку молочної залози [4], серед Північно-Європейського населення не виявлено асоціації між 308G>A поліморфним локусом гена *TNF-α* та схильністю до виникнення раку [10], суперечливим є дані й інших авторів [6, 10, 11, 12]. Для формулювання остаточних висновків коректним було б об'єднання результатів отриманих різними дослідницькими групами. Мутації в гені *TNF-α* передаються по спадковості і потребують подальшого вивчення як можливих маркерів схильності до утворення пухлин.

Висновки

Частота генотипу 308GG в групі пацієнтів з лейкеміями становить 88% і є вірогідно вищою у порівнянні з контрольною групою (62%).

Встановлено підвищену частоту генотипу 308GG у пацієнтів з раком молочної залози (80%) у порівнянні з контрольною групою (62%).

Встановлено, що наявність 308GG генотипу гена *TNF-α* збільшує ризик виникнення раку молочної залози в 2,4 рази (OR= 2,4), а лейкемій - в 4,5 рази (OR= 4,5).

Роботу виконано при фінансовому сприянні Західно-Українського Біо-Медичного Дослідницького Центру підтримки молодих вчених (WUBMRC).

Література

1. *Asghar T, Yoshida S, Kennedy S. et al.* The tumor necrosis factor- α promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population // *Hum Reprod.* - 2004. – Vol. 19. – P. 2509-2514.
2. *Karpe F, Lundahl B., Ehrenborg E. et al.* A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels // *Arterioscler. Thromb. - Vasc. Biol.* - 1998. – Vol.1. – P. 756–761.
3. *Waterston, M. Bower* TNF and cancer: good or bad? // *Cancer Therapy.*- Vol. 2. – 2004. – P.131-148
4. *Azmy S., Balasubramanian A., Wilson T. et al.* Role of tumour necrosis factor gene polymorphisms (-308 and-238) in breast cancer susceptibility and severity // *Breast Cancer Res.* – 2004. – P. R395-R400.
5. *Gupta V, Sehajpal P.K.* Rapid detection of single nucleotide (-308) polymorphism in TNF- α promoter using ARMS-PCR.-*Curr Sci.* - 2003.-Vol.85. – P. 1521-1523.
6. *Lawrence J., Kroeger A., Kroeger K.* Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene:relevance to disease // *Journal of Leukocyte Biology.* – Vol. 66. – 1999.
7. *Wilson A. G., Symons J. A., Dowell T. L. et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1997 - № 94. – P.3195–3199.
8. *Mohindru K., Changotra H., Sehajpal P.K.* Lack of Association Between TNF α 308 Polymorphism and End Stage Renal Disease in North Indian Population.- *International Journal of Human Genetics.* – 2004. – Vol. 4, № 1. – P. 61-64.

9. Пат. 32044 UA, МПК G01N33/49 (2006.01) Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові / Г.В. Макух, Д.В.Заставна, М.Я. Туркус, Б.І. Третяк, Л.Б. Чорна, заявник ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ». – № u200801896; заявл. 14.02.2008; опубл. 25.04.2008, Бюл.№8.

10. Bao-Ying Fei, Bing Xia, Chang-Sheng Deng et al. Association of tumor necrosis factor genetic polymorphism with chronic atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma in Chinese Han population // World J Gastroenterol. – 2004. – Vol.10. – P.1256-1261.

11. John P., White S., Yolanda E. et al. TNF- α Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Human Papillomavirus Associated Cervical // Cancer The Journal of Infectious Diseases. – 2005.- Vol.191. – P. 969–976.

12. Karen M., Kroeger, James H. et al. Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism.- 2000. –Vol. 12. – P.110-119.

Резюме

Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфного локусу 308 G>A гена *TNF- α* у осіб з раком молочної залози та дітей з лейкеміями. Аналіз розподілу генотипів показав вірогідно вищу частоту генотипу 308GG в групі пацієнтів з лейкеміями у порівнянні з контрольною групою та підвищену частоту генотипу 308GG у пацієнтів з раком молочної залози. Наявність 308GG генотипу гена *TNF- α* збільшує ризик виникнення раку молочної залози в 2,44 рази, а лейкемії – у 4,5 рази.

Проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфного локуса 308 G>A гена *TNF- α* у лиц с раком молочной железы и детей с лейкемиями. Анализ распределения генотипов показал статистически значимо высшую частоту генотипа 308GG в группе пациентов с лейкемиями по сравнению с контрольной группой и повышенную частоту генотипа 308GG у пациентов с раком молочной железы. Наличие 308GG генотипа гена *TNF- α* увеличивает риск возникновения рака молочной железы в 2,4 раза, а лейкемий – в 4,5 раза.

Molecular-genetic study of *TNF- α* gene polymorphic locus 308 G>A in patients with breast cancer and children with leukemia was performed. The genotype analysis showed significantly higher frequency of 308GG genotype in group of patients with leukemia than in controls and increased frequency of 308GG genotype in patients with breast cancer. The presence of *TNF- α* gene genotype 308GG was associated with 2.4 - fold increased risk of breast cancer and 4.5 - fold increased risk of leukemia.

ЗУЕВА М.І.¹, АТРАМЕНТОВА Л.А.²

ІГУ «Інститут дерматології та венерології АМН України», Україна, 61057, Харків, ул. Чернышевская, 7/9, e-mail: mahaqq@yandex.ru

2Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна,

Україна, 61077, Харків, пл. Свободи, 4, e-mail: atramentova@yandex.ru

ПОЛИМОРФИЗМ 1258G/A ГЕНА *SPINK5* У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

Псориаз – хроническое рецидивирующее системное заболевание с кожными проявлениями. Значение генетических факторов в формировании

этого заболевания отмечалось неоднократно. Выявлено семейное накопление псориаза, определен тип наследования, рассчитаны эмпирические риски [1, 2, 5, 6]. Картировано несколько хромосомных локусов, ассоциированных с псориазом, связанные в основном с главным комплексом гистосовместимости (МНС) и Т-клетками. На сегодня определено девять локусов в различных хромосомах: (*PSORS1-PSORS9*). Расположенные в этих локусах гены контролируют процессы воспаления, и нарушения в них могут приводить к возникновению псориаза. Важнейшим из них является *PSORS1*, локализованный в хромосоме 6. В нём в частности, находятся гены, контролирующие развитие данной патологии: *HLA-Cw6*, *CCHCR1* и *CDSM* [8, 13].

В качестве кандидатного гена псориаза представляет интерес *SPINK5*. Этот ген размером 73 т.п.н. находится в локусе 5q31-q32 и включает 33 экзона. Ген экспрессируется в глотке, пищеводе, тимусе, органах репродуктивной и дыхательной систем, коже, волосах [9, 11]. Продукт данного гена, белок *SPINK5* относится к ингибиторам сериновых протеаз. Изменения в структуре кодирующего гена могут привести к аномальному повышению активности этих протеаз и инициировать воспалительные процессы, которые приводят к развитию аллергодерматозов [10]. Известна также роль *SPINK5* в формировании барьерной функции кожи и, в частности, защиты от ультрафиолетового излучения, инфекционных агентов, химически активных веществ и других факторов [7, 9, 10]. Полиморфизм гена *SPINK5* связан с атопиями, астмой, синдромом Нетертона (атопия, ихтиоз, нарушения ороговения), целиакией [6-8, 11, 13-16]. Экспериментальные животные, у которых наблюдались мутации с полной потерей функции гена *SPINK5*, имели признаки синдрома Нетертона [15]. Экспрессия этого гена снижена при карциномах [9]. Перечисленные свойства этого белка убеждают в необходимости дальнейшего исследования гена *SPINK5*. Это позволит лучше понять природу псориаза и найти маркеры наследственной предрасположенности. Целью данного исследования было изучение однонуклеотидного полиморфизма (SNP) *1258G/A* гена *SPINK5*, приводящий к глутамин-лизиновой (Glu/Lys) аминокислотной замене в белковом продукте, у больных псориазом в населении Харьковской области.

Объекты и методы исследования

Использованы образцы венозной крови 39 больных псориазом (19 женщин и 20 мужчин 16-68 лет). Контрольной группой служили 96 человек (37 мужчин и 59 женщин 16-80 лет) без признаков псориаза. Все обследованные – жители Харькова и Харьковской области, украинцы и русские – дали информированное письменное согласие на исследование. Выделение ДНК проводили фенольным методом из лейкоцитов периферической крови по методу [4]. Исследование генотипов гена *SPINK5* выполнено методом анализа ПЦР-ПДРФ. ПЦР фрагмента 14 экзона гена *SPINK5* длиной 306 п.н. проводилась с использованием пары праймеров: *5'-TGC AAT TGT GAG GAT TTC ACA G-3' / 5'-CCT GAA CAT GAT CTG TGG ATC-3'* [11] при

температурных режимах: 95⁰С 30 сек., 52⁰С 30 сек., 72⁰С 40 сек. Объём рестрикционной смеси 30 мкл. Фрагменты получали с помощью рестриктазы NpH1 (Fermentas, Литва), которая разрезает сайт с последовательностью *GGTGA(N)8*↓. Детекцию результатов рестрикции проводили с помощью электрофореза в 3% агарозном геле. Гипотезу о равенстве частот аллелей в группах больных и здоровых мужчин и женщин, а также равенстве распределений фактических и теоретических рядов генотипов проверяли с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05 [2].

Результаты и обсуждение

Рестриктаза NpH1 разрезает ампликон *SPINK5* на две части, если в положении 1258 14-го экзона находится нуклеотид *A*. Нуклеотид *G* создаёт ещё один сайт рестрикции, в результате чего образуются три фрагмента. По виду электрофореграммы делается вывод о генотипе донора (рис. 1).

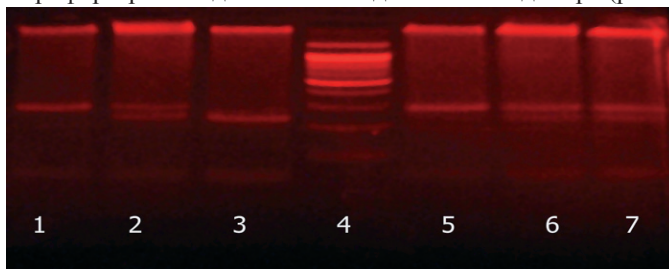


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов ДНК шести человек, генотипированных по полиморфизму *1258G/A* гена *SPINK5* (1, 5 – генотип *AA*; 2, 6, 7 – генотип *AG*; 3 – генотип *GG*; 4 – маркёр молекулярной массы).

Анализ результатов генотипирования выявил пока ещё не объяснимое различие в частотах SNP *1258G/A* гена *SPINK5* у мужчин и женщин контрольной группы (табл. 1). Неравенство частот аллелей у представителей разных полов привело к необходимости сравнивать группы больных и здоровых людей раздельно по полу. Группа больных мужчин отличается от здоровых более высокой, почти двукратной, частотой аллеля *A* (0,70 и 0,36, $p<0,01$). Частоты аллелей у больных и здоровых женщин значимо не различаются (табл. 1).

Соотношение генотипов в группах здоровых и больных мужчин и женщин значимо не отличается от теоретически ожидаемого для равновесия Харди-Вайнберга (табл.2). Распределение генотипов между основной и контрольной группами различается только у мужчин. У здоровых мужчин преобладает генотип *GG*, (43% против 10% в группе сравнения). Больные мужчины чаще, чем здоровые являются обладателями генотипа *AA* (50% против 16% в контроле, $p<0,05$). Соотношение генотипов в группе больных и здоровых женщин значимо не различается (табл.2).

Таблица 1

Распределение аллелей и генотипов SNP SPINK5

Группа	Пол	N	Генотипы SPINK5			Частоты SNP		p
			AA	AG	GG	A	G	
Контроль	Мужской	37	6	15	16	0,36	0,64	<0,01
	Женский	59	20	30	9	0,59	0,41	
Больные псориазом	Мужской	20	10	8	2	0,70	0,30	>0,05
	Женский	19	7	8	4	0,58	0,42	

Примечание. n – число обследованных, p – уровень значимости различий в частоте аллелей между группами мужчин и женщин.

Таблица 2

Распределения генотипов (%)

Группа	Пол	Фактические			Теоретические		
		AA	AG	GG	AA	AG	GG
Контроль	Мужской	16,2	40,5	43,2	13,0	46,0	41,0
	Женский	33,9	50,8	15,3	34,8	48,4	16,8
Псориаз	Мужской	50,0	40,0	10,0	49,0	42,0	9,0
	Женский	36,8	42,1	21,1	33,5	48,8	17,7

Полученные данные являются начальным этапом в создании базы маркёров наследственной предрасположенности к дерматозам в локальной популяции.

Выводы

Частоты аллелей гена составляют: у здоровых мужчин аллель A - 0,36, аллель G - 0,64. У больных мужчин аллель A - 0,70, аллель G - 0,30. У здоровых женщин аллель A - 0,59, аллель G - 0,41. У больных женщин - аллель A - 0,58, аллель G - 0,42.

У больных псориазом мужчин чаще, чем у здоровых встречается аллель A (0,70 против 0,36 в контрольной группе).

Литература

1. Атраментова Л.А., Рыжко П. П., Федота А.М. Генетическое изучение псориаза в Харьковской популяции // Цитология и генетика. – 2001. - Том 35, N 1. – С. 74-78.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика. – 1998. – 459 с.
3. Глухенький Б.Т. Псоріаз // Лікування та діагностика. – 1998. – №1. – С. 42–50.
4. Маннатиц Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы геной инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. - М.: Мир, 1984. - 480 с.
5. Федота А.М. Зависимость проявлений псориаза от этнической гетерогенности и степени урбанизации популяции // Вестник Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. Серия: биология. – 2001. – №506. – С. 331–333.
6. Федота А.М., Винокурова Е.И., Безродная А.И., Атраментова Л.А.. Популяционно-генетические характеристики псориаза на примере населения горо-

да Харькова // Вестник Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. Серия: биология. – 2009. – Вып. 9, №856. – С. 97-101.

7. *Deraison C., Bonnart C., Lopez F., Besson C. et. al.* LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction // *Mol. Biol. Cell.* – 2007. – Vol. 18, № 9. – P. 3607–3619.

8. *Globe D., Bayliss M., Harrison D.* The impact of itch symptoms in psoriasis: results from physician interviews and patient focus groups // *Health Qual Life Outcomes.* – 2009. – Vol. 7, № 1. – P. 62.

9. *Godic A, Dragos V.* Successful treatment of Netherton's syndrome with topical calcipotriol. // *Europ. J. Dermatol.* – 2004. – Vol. 14, № 1. – P. 115-117.

10. *Hubiche T., Ged C., Benard A., Léauté-Labrèze C. et. al.* Analysis of SPINK 5, KLK 7 and FLG genotypes in a French atopic dermatitis cohort // *Acta Derm Venereol.* – 2007. – Vol. 87, №6. – P. 499–505.

11. *Kabesch M., Carr D., Weiland S.K., von Mutius E.* Association between polymorphisms in serine protease inhibitor, kazal type 5 and asthma phenotypes in a large German population sample // *Clin. Exp. Allergy.* – 2004. – Vol. 34, № 2. – P. 340–345.

12. *Meyer Hoffert U.* Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* - 2009. - Vol 52. N 8. - P. 345-354.

13. *Nestle F., Kaplan D., Barker J.* Mechanisms of Disease: Psoriasis // *N Engl J Med.* – 2009. – Vol. 361, № 5. – P. 496–509.

14. *Qiji Liu, Yu Xia, Wenjing Zhang et al.* A functional polymorphism in the SPINK5 gene is associated with asthma in a Chinese Han Population // *BMC Medical Genetics.* - 2009. - Vol. 46, №7. - P. 394-40.

15. *Tao Yang, Dongcia Liang.* Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in Spink5^{-/-} mice // *Genes and Development.* – 2002. – Vol 18, N 10. – P. 2354-2358.

16. *Wapenaar M., Monsuur A., Poell J., Slot R. et. al.* The SPINK gene family and celiac disease susceptibility // *Immunogenetics* – 2007. – Vol. 59, №5. – P. 349–357.

Резюме

По результатам проведенного генотипирования с помощью анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов показано, что аллель *A* является фактором повышенного риска по псориазу у мужчин.

За результатами проведенного генотипування методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів показано, що алель *A* є фактором підвищеного ризику по псориазу у чоловіків.

Results of genotyping by analysis of restriction fragment length polymorphism demonstrated that allele *A* is a risk factor for psoriasis in men.

ЦИТОКИН LIF КАК МОДУЛЯТОР ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *MGMT* В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

В репарации первичных повреждений ДНК, вызванных действием алкилирующих соединений, важную роль играет репаративный энзим Об-алкилгуанин-ДНК алкилтрансфераза (*MGMT*), кодируемый геном *MGMT* [1, 2]. Известно, что уровень экспрессии данного гена может изменяться под действием различных факторов, например, однопочечных разрывов ДНК, алкилирующих соединений, гиперметилирования промотора [3-7]. Регуляция экспрессии этого гена также может осуществляться через различные внутриклеточные сигнальные системы, например, опосредованные белком p53 и др. [7]. В литературе также существуют единичные данные, свидетельствующие о том, что некоторые цитокины выступают в роли индукторов/ингибиторов экспрессии гена *MGMT* [8-12]. В нашей работе мы изучали влияние цитокина LIF (лейкемия-ингибирующий фактор) на экспрессию этого гена в культуре клеток человека. Он относится к семейству IL-6 и является плейотропным цитокином, действующим на многие типы клеток, включая эмбриональные стволовые, мегакариоциты, остеобласты и нервные клетки [13, 14]. LIF является обязательным компонентом сред при работе с плюрипотентными стволовыми клетками - для блокирования их дифференцировки в культуре, также он участвует в процессе дифференцировки клеток и формировании полноценного органа с его специфическими функциями в условиях организма. Воздействие белка LIF осуществляется через рецепторные системы. Гены-мишени, активируемые такими сигнальными системами, ответственны за плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток, их дифференцировку и пролиферацию [15]. Не исключено, что к числу таких генов - мишеней может относиться и ген *MGMT*.

Цель работы: изучить возможности влияния цитокина LIF на экспрессию гена *MGMT* на уровне белка в культурах клеток человека.

Материалы и методы

Использовали следующие культуры клеток человека: ВК (первичные стромальные клетки, выделенные из периферической крови донора) и Нер-2 (рак гортани, стандартная клеточная линия). Время инкубации с цитокином LIF (рабочая концентрация 20 нг/мл, фирма SIGMA) составляло 8 часов. SDS-электрофорез белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [16]. Концентрацию общего белка определяли по методу Бредфорда [17]. Идентификацию *MGMT* в клеточном экстракте проводили с помощью Вестерн блот анализа. Использовали моноклональные антитела против *MGMT* производства «Novus Biologicals, Littleton, Co» (США). В качестве вторичных использовали видоспецифические конъюгированные

с пероксидазой хрена антитела производства «Jackson ImmunoResearch» (США). Процедуры по идентификации MGMT проводили согласно методическим указаниям фирмы-изготовителя [18].

Результаты и обсуждение

Известно, что молекулярная масса белка MGMT – 24 кДа (немодифицированная форма). Однако нами было обнаружено существование второй формы белка MGMT с молекулярной массой около 50 кДа (модифицированная форма) [19], природа которой в настоящее время изучается.

Влияние цитокина LIF на экспрессию гена *MGMT* исследовали с использованием условно-нормальных первичных клеток донора (ВК) и опухолевых клеток стандартной линии Нер-2 *in vitro*. На рис. 1 представлены результаты Вестерн блот анализа белкового экстракта, полученного из клеток ВК.

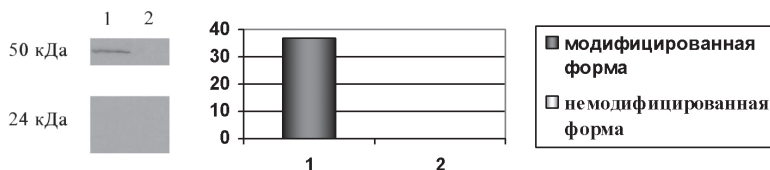


Рис. 1. Вестерн блот анализ влияния цитокина LIF на экспрессию гена *MGMT* в первичных клетках кожи (на гистограмме представлены результаты денситометрии сигнала): 1. – контроль; 2 – LIF, 20 нг/мл.

Как показано на рис.1, в клетках ВК белок MGMT выявлялся только в модифицированной форме (≈ 50 кДа). Присутствие цитокина LIF в культуральной среде без сыворотки приводило к резкому снижению количества белка MGMT в опытных клетках по сравнению с необработанным контролем.

В другой серии экспериментов использовались опухолевые клетки Нер-2. Для данной клеточной линии характерно изменение характера экспрессии MGMT в зависимости от фазы роста культуры. Так, на стадии логарифмического роста (*log*-фаза), когда происходит интенсивная пролиферация клеток репаративный фермент MGMT выявлялся как в модифицированной, так и в немодифицированной формах (рис. 2а, контроль). Однако при замедлении роста культуры (стадия стационарного роста) исследуемый белок присутствовал лишь в модифицированной форме (рис. 2б, контроль).

В этой связи мы сравнили влияние LIF на экспрессию репаративного фермента, используя культуры клеток Нер-2 на разных стадиях роста (рис. 2 а, б).

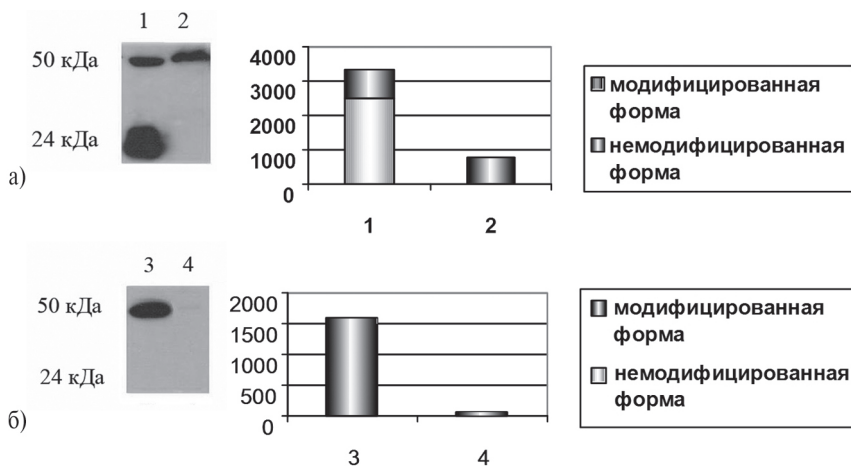


Рис. 2. Вестерн блот анализ влияния цитокина LIF на экспрессию гена *MGMT* в опухолевых клетках линии Hep-2 (на гистограммах представлены результаты денситометрии сигнала): а) на логарифмической стадии роста: 1. – контроль; 2.- LIF (20 нг/мл). б) на стационарной стадии роста: 3 – контроль; 4 - LIF (20 нг/мл).

После обработки клеточных культур цитокином LIF в обоих случаях наблюдалось резкое снижение уровня экспрессии *MGMT* (Рис. 2, дорожки 2 и 4).

В активно пролиферирующих клетках после обработки цитокином совсем не обнаруживался *MGMT* в немодифицированной форме с молекулярной массой ≈ 24 кДа, хотя количество модифицированного белка сохранялось примерно на одном и том же уровне. В результате количество суммарного белка (в модифицированной и в немодифицированной формах) в опытном варианте оказывалось существенно более низким по сравнению с контролем.

На стационарной стадии роста культуры обработка клеток цитокином LIF приводила к значительному снижению количества *MGMT* в модифицированной форме (≈ 50 кДа).

Выводы

Результаты наших исследований показали, что цитокин LIF, помимо известных своих регуляторных функций является модулятором экспрессии гена репаративного энзима *MGMT*. Показано, что в определенных условиях этот цитокин ингибирует экспрессию *MGMT* как в условно-нормальных первичных клетках, так и в опухолевых клетках человека *in vitro*.

Дальнейшее изучение воздействия цитокина LIF на экспрессию репаративного энзима *MGMT* будет способствовать более полному пониманию механизмов взаимосвязи клеточной дифференцировки и репарации ДНК. Возможно, активация/репрессия исследуемого репаративного энзима

в процессе дифференцировки клеток под влиянием цитокинов играет регуляторную роль и/или обеспечивает устранение возникающих повреждений ДНК.

Литература

1. Pegg A.E. Mammalian O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: regulation and importance in response to alkylation carcinogenesis and therapeutic agents. // *Cancer Res.* – 1990. – vol. 50, № 25. – P.6119–6122.

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

3. Goodtsova K., Crone T.M., Pegg A.E. Activation of Human O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase by DNA // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. - № 28. – P. 8385-8390.

4. Śledziewska-Gójska E. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in vivo by SN2 alkylation agents // *Mutation Research.* - 1995. - № 336. – P. 61-67.

5. Bandres E., Andion E., Escalada A., Honorato B., Catalan V., Cubedo E., Cordeu L., Garcia F., Zarate R., Zabalegui N., Garcia-Foncillas J. Gene expression profile induced by BCNU in human glioma cell lines with differential MGMT expression // *Journal of Neuro-Oncology.* – 2005. – Vol.73. – P. 189–198.

6. Bello M. J., Alonso M. E., Amiñoso C., Anselmo N. P., Arjona D., Gonzalez-Gomez P., Lopez-Marin I., Campos J. M., Gutierrez M., Isla A., Kusak M. E., Lassaletta L., Sarasa J.L., Vaquero J., Casartelli C., Rey J. A. Hypermethylation of the DNA repair gene MGMT: association with TP53 G:C to A:T transitions in a series of 469 nervous system tumors // *Mutation Research.* - 2004. – № 554. – P. 23–32.

7. Verbeek B., Southgate T. D., Gilham D. E., Margison G. P. O6 -Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy // *British Medical Bulletin.* – 2008. – Vol. 85. – P. 17–33.

8. Nitire S. K., Velu C. S., Smith Q. R., Brat G. J., Srivenugopal K. S. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines // *Carcinogenesis.* – V. 28. – 2007. – P. 378 – 389.

9. Zheng M., Bocangel D., Ramesh R., Ekmekcioglu S., Poindexter N., Grimm E.A., Chada S. Interleukin-24 overcomes temozolomide resistance and enhances cell death by down-regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human melanoma cells // *Mol. Cancer Ther.* 2008. – Vol. 7. -№ 12. – P. 3842-3851.

10. Natsume A., Ishii D., Wakabayashi T., Tsuno T., Hatano H., Mizuno M., Yoshida J. IFN- β Down-Regulates the Expression of DNA Repair Gene MGMT and Sensitizes Resistant Glioma Cells to Temozolomide // *Cancer Res.* - 2005. – Vol. 65. - № 17. – P. 7573-7579

11. Cardozo A.K., Kruhoffer M., Leeman R., Orntoft T., Eizirik D.L. Identification of Novel Cytokine-Induced Genes in Pancreatic β -Cells by High-Density Oligonucleotide Arrays // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. – P. 909-920.

12. Лило В.В., Коцаренко К.В., Манько В.Г., Мацевич Л.Л., Рубан Т.А., Лукаш Л.Л. Цитокині як потенційні модулятори репарації первинних ушкоджень, індукованих алкілувальними сполуками // Фактори експериментальної еволюції організмів. Збірник наукових праць. – 2010. – Т. 9. – С. 420-423.

13. Huyton T., Zhang J., Luo C.S., Lou M., Hilton D.J., Nicola N.A., Garrett T. P. J. An unusual cytokine: Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leuke-

mia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor // PNAS. – 2007. – V. 104. – № 31. – P. 12737–12742.

14. *Broholm C, Pedersen BK.* Leukaemia inhibitory factor – an exercise-induced myokine // *Exerc Immunol Rev.* – 2010.–V. 16. – P. 77–85.

15. *Борисова М. П., Межевских Л. М., Петрова Р. П.* Взаимодействие цитокина LIF с липидным матриксом мембран // Компьютерные исследования и моделирование. – 2010. – Т. 2. – № 1. – С. 43–49.

16. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // *Nature.* – 1970. – 227, N 5259. – P. 680–685.

17. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. –72, N 1-2. – P. 248–254.

18. <http://www.novusbio.com/support/protocols/protocol-specific-for-mgmt-antibody-nb100-168.html>

19. *Лыло В.В.* Выявление модифицированной формы репаративного фермента Об-алкилгуанин-ДНК алкилтрансферазы // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. Збірник наукових праць. Випуск 19. –2010. – С. 299-305.

Резюме

Исследовалось влияние цитокина LIF на экспрессию репаративного энзима MGMT в культурах первичных и опухолевых клеток человека. Показано, что данный цитокин вызывает снижение экспрессии гена MGMT на уровне белка в клетках данных линий.

Досліджувався вплив цитокіну LIF на експресію репаративного ензиму MGMT в культурах первинних та пухлинних клітин людини. Показано, що даний цитокін спричиняє зниження експресії гена MGMT на рівні білка в клітинах даних ліній..

Influence of the cytokine LIF on expression of the repair enzyme MGMT in human primary and tumor cell cultures has been studied. This cytokine have been shown to inhibit the MGMT expression on the protein level in those cell cultures.

ЛУКАШ Л.Л., ЯЦИШИНА А.П., КУШНИРУК В.О., ПИДПАЛА О.В.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Киев, 03143, ул Акад. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imbg.org.ua*

РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Впервые способ репрограммирования клеток млекопитающих как возможность полного возврата генетической программы взрослой клетки к «нулевой точке» развития под влиянием внутриклеточного микроокружения яйцеклетки, был убедительно продемонстрирован в экспериментах по клонированию животных [1]. В дальнейшем описанный способ применялся также при создании технологии «терпевтического клонирования» с использованием донорских соматических клеток человека. Одновременно разрабатывались способы получения плюрипотентного клеточного матери-

ала из тканей взрослого человека без применения техники клонирования, которая с самого начала вызывала биоэтические возражения.

Верфайли и соавторы описали метод репрограммирования клеток, выделенных из костного мозга человека в клеточный материал, который по своим свойствам был весьма близок к примитивным стволовым клеткам. Метод Верфайли был успешно воспроизведен и в других лабораториях с использованием не только клеток костного мозга человека, но и костного мозга других млекопитающих. Особо хотелось бы отметить работы, в которых удалось получить клеточный материал со свойствами стволовости из периферической крови человека [2,3]. В результате целого ряда исследований удалось получить из костного мозга так называемые взрослые мультипотентные прогениторные клетки. Несмотря на всю привлекательность этих работ, сложность культуральной техники, длительность процедур отбора, невысокая эффективность получения линий стволовых клеток из взрослых тканей заставили искать альтернативные пути получения стволовых клеток из взрослого клеточного материала.

Значительный прогресс достигнут в области получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПС) человека с помощью методов генной инженерии, что позволило приступить к разработке клеточных технологий для применения в клинике. Доказана возможность репрограммирования фибробластов кожи в генетически модифицированные плюрипотентные стволовые клетки, близкие к эмбриональным [4,5]. В настоящее время для получения ИПС клеток используются и другие дифференцированные клетки, в частности, клетки крови [6]. Проведена успешная трансфекция взрослых клеток без вирусных векторов [7]. Полное репрограммирование взрослых клеток осуществляют не только трансфекцией в клетки рекомбинантных конструкций, содержащих 4 или 3 трансгена [8,9], но и прямой доставкой в клетки химерных транскрипционных факторов, индуцирующих плюрипотентность [10,11]. Усовершенствование техники культивирования с использованием рекомбинантных ростовых факторов и цитокинов позволяет получать длительно культивируемые линии эмбриональных стволовых клеток, а также осуществлять их дифференцировку *in vitro*. Целью данной работы было получение клеточных линий из дифференцированных тканей взрослого человека с использованием некоторых рекомбинантных цитокинов, способных стимулировать пролиферацию и блокировать дифференцировку стволовых клеток, и кондиционированных сред, содержащих факторы, продуцируемые эмбриональными герминативными клетками (ЭГК).

Материалы и методы

В данной работе для получения клеточных линий использовали образцы кожи человека, периферическую и пуповинную кровь здоровых доноров. Образцы взрослых и эмбриональных тканей любезно предоставлены Киевским центром термальных ожогов и пластической хирургии при городской

больнице № 2, фирмой «Эмбриотек», а также Институтом клеточной терапии. Из образцов кожи получали культуры первичных клеток, из образцов крови – лейкомассу с помощью стандартных методов.

Клетки культивировали в ростовой среде ДМЕМ (SIGMA) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (SIGMA) и антибиотиков пенициллина и стрептомицина. Как добавки использовали рекомбинантные цитокины человека LIF, SCF, IL-3 (SIGMA) по 2нг/мл каждого и 30 % среды, кондиционированной ЭГК. ЭГК человека выделены нами из abortивного материала по методу Джона Герхарта и соавторов, который мы применяли также при получении соответствующих клеток мыши [12]. В качестве фидера использовали либо первичные эмбриональные фибробласты, либо первичные фибробласты кожи взрослого человека, митотически инактивированные с помощью митомицина С в концентрации 10-20 мкг/мл. В отдельных экспериментах использовали линии фибробластов человека, любезно предоставленные профессором Мак-Кормиком, США. Далее полученные клеточные популяции культивировали в виде монослоя до 30-200 пассажей без добавления рекомбинантных цитокинов и кондиционированной среды.

Результаты и обсуждение

В результате отбора культур с хорошими ростовыми свойствами удалось получить три линии клеток клонального происхождения: SK1- из кожи, 4BL – из периферической и CB1 – из кордовой крови. Клетки линии SK1 продолжали расти до 30 пассажа, затем произошло старение и гибель клеточной популяции. Две другие клеточные линии прошли уже достаточно большое количество пассажей (CB1 – 50, а линия 4BL – 219) без признаков клеточного кризиса, старения и изменения морфологии, что позволяет судить об их потенциальном бессмертии. На различных пассажах культивирования клеточные суспензии были подвергнуты криоконсервации с целью длительного хранения и дальнейшего исследования.

Особый интерес представляет клеточная линия 4BL, клетки которой могут расти в виде компактных колоний на фидере, напоминающих колонии плюрипотентных стволовых клеток (рис. 1, а). При постоянной подкормке колонии клеток могут расти достаточно долго, достигая столь больших размеров (рис. 1, б), что они видны невооруженным глазом без микроскопирования.

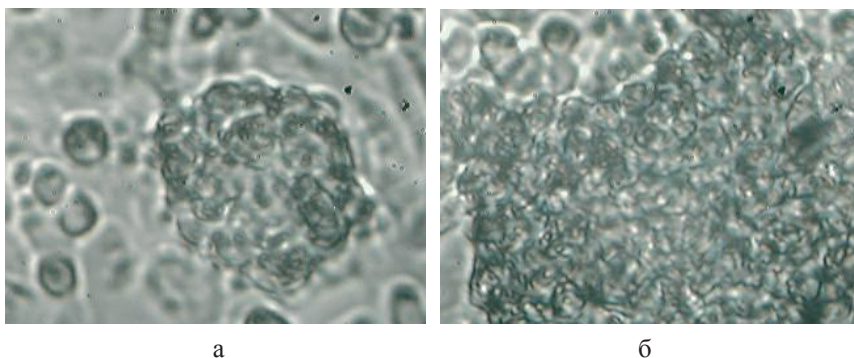


Рис. 1. Формирование колоний клеток 4BL (а) и увеличение их размера (б) при росте на митотически инактивированном фидере из фибробластов человека (без окрашивания, объектив 40х)

В клеточных популяциях этой линии при культивировании без фидера постоянно наблюдаются морфологически два типа клеток: округлые эпителиоидные (рис. 2, а) и фибробластоподобные клетки (рис. 2, б), что свидетельствует о возможном наличии в популяции недифференцированных стволовых клеток.

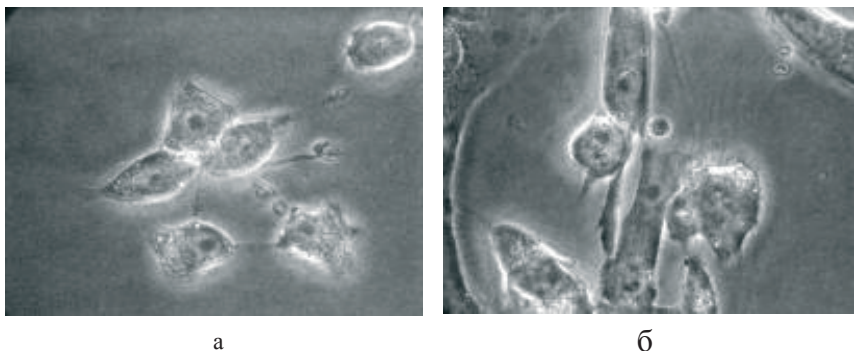


Рис. 2. Эпителиоидные (а) и фибробластоподобные (б) клетки 4BL (без окрашивания, объектив 40х)

Способность клеток линии 4BL с высокой эффективностью размножаться в полутвердых средах (0,3 % агара или 1,4 % метилцеллюлозы) с образованием эмбриоидноподобных телец характерна для плюрипотентных стволовых клеток, а также и для некоторых опухолевых клеток (рис. 3, а, б). В среде с метилцеллюлозой наблюдали формирование гигантских клеточных конгломератов, значительно превышающих размеры колоний, которые могут формировать в полутвердых средах стволовые клетки крови.

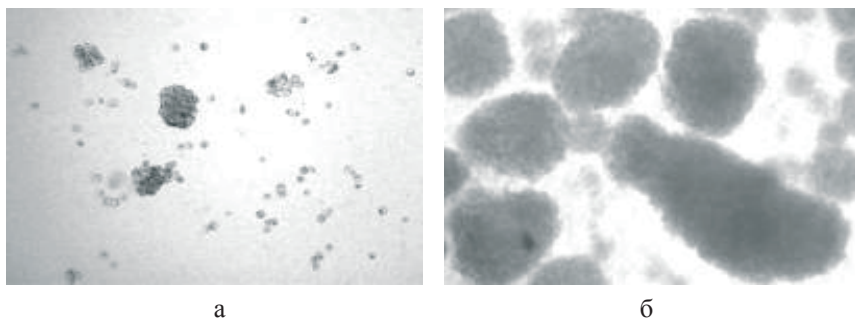


Рис. 3. Образование эмбрионоподобных тел из клеток 4BL на полутвердых средах с агаром (а) и метилцеллюлозой (б) (без окрашивания, объектив 10х)

В пользу сохранения нормальных свойств у клеток 4BL свидетельствует чувствительность к такому яду, как колхицин [13], а о наличии стволовых клеток в популяции данной линии - способность их к дифференцировке в мышечную ткань [14-16]. Для подтверждения наличия в популяциях исследуемой линии репрограммированных клеток и сохранения у них нормальных свойств в настоящее время проводится иммунофенотипирование и цитогенетический анализ [17,18] полученных нами клеточных линий.

Выводы

Показана возможность репрограммирования взрослых клеток человека путем выращивания их в культуральных средах, содержащих рекомбинантные цитокины LIF, SCF и IL-3, а также другие факторы эмбрионального происхождения.

Литература

1. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // Nature. – 1997. – vol. 385, № 6619. – P.810 – 813.
2. Abuljadayel I.S. Induction of stem cell-like plasticity in mononuclear cells derived from unmobilised adult human periferal blood // Curr. Med. Res. Opin. – 2003.-vol. 19.-P.355-374.
3. Abuljadayel I.S., Afghan R.K., McCaffrey T.A. et al. SCID repopulating cells derived from unmobilised adult human peripheral blood // Curr. Med. Res. Opin. – 2004. – vol. 20, № 1. – P.87 – 100.
4. Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells // Nature. – 2007. – Vol. 448, № 7151. – P.313 – 317.
5. Yu J, Vodyanik M.A., Thomson J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // Science. – Vol. 318, № 5858. – P. 1917 – 1920.
6. Yamanaka S. Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible // Cell Stem Cells. – 2010. – vol. 7, № 1. – P.1 – 2.
7. Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors // Science. – 2008. – vol. 322, № 5903. – P. 949 – 953.

8. Maherali N., Sridharan R., Xie W. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodelling and widespread tissue contribution // *Cell Stem Cell*. – 2007. – Vol. 1, № 1. – P. 55 – 70.

9. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts // *Nat. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 26, № 1. – P. 101 – 106.

10. Zhou H., Wu S., Joo J.Y. et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins // *Cell Stem Cell*. – 2009. – Vol. 4, № 5. – P.381 – 384.

11. Kim D., Kim C.H., Moon J.I. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins // *Cell Stem Cell*. – 2009. – Vol. 4, № 6. – P.472 – 476.

12. Лукаш Л.Л., Яцишина А.П., Підпала О.В., Вагіна І.Н., Кочубей Т.П. Получение новых линий стволовых клеток мыши и изучение влияния микроокружения на их кариотипическую изменчивость // *Физиология и биохимия культурных растений*. – 2006. – Т. 38, № 2. – С. 144 – 152.

13. Яцишина А.П., Рубан Т.П., Вавіліна І.В., Кочубей Т.П., Підпала О.В., Лукаш Л.Л. Особливості змін кариотипу та активність контрольної точки мітозу при становленні клітинних ліній стовбурових клітин людини *in vitro* // *Синтетична теорія еволюції: стан, проблеми і перспективи*. – Луганськ, 2009. – С. 50 – 52.

14. Lukash L., Kovalenko O., Pidpala O., Yatsishina A. Cardiomyogenic differentiation of mammalian cells *in vitro* // 4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society, Munich, Germany, 2005. – N 146. – P.38.

15. Lukash L.L., Bazzika D.A., Belyaeva N.V., Kovalenko O.A., Pidpala O.V., Yatsishina A.P. Myogenic differentiation of adult mesenchyme stem cells // Abstracts: XXXIII Annual ESAO(Congress, 21-24 June 2006, Umea-Sweden. The International Journal of Artificial Organs). – 2006. – Т. 29, № 5. – С. 32 – 34.

16. Lukash L.L. Cell therapy of heart pathologies // *Биотехнология*. – 2008. – 1, № 1. – С. 40 – 45.

17. Кушнірук В.О., Гритич О.А., Яцишина А.П., Рубан Т.П., Мацевич Л.Л., Лукаш Л.Л. Порівняльний аналіз частот аберантних мітозів у популяціях стовбурових клітин різного походження. – *Серцево-судинна хірургія*. – К., 2009. – Випуск 17. С. 293 – 296.

18. Акоюн Г.Р., Гулеюк Н.Л., Вавіліна І.В., Яцишина А.П., Підпала О.В., Рубан Т.П., Лукаш Л.Л. Цитогенетичні особливості нової клітинної лінії 4BL6 при тривалому культивуванні у стандартних умовах *in vitro* // *Журн. АМН України*. – 2010. – Т.16, додаток. – С.11 – 12.

Резюме

Показано можливість репрограмування дорослих клітин людини вирощуванням їх у культуральних середовищах, що містять рекомбінантні цитокіни LIF, SCF і ІЛ-3, а також інші фактори ембріонального походження.

It has been shown the possibility of reprogramming of adult human cells by culturing them in mediums, containing recombinant cytokines LIF, SCF and IL-3, as well as other factors of embryonic origin.

ЛУЧКО Е.Н.

Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина

Украина, 61077, м. Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: ekaterina_luchko@mail.ru

МИГРАЦИЯ И ЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТРЕСС КАК ФАКТОРЫ РИСКА ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ

Первые работы по изучению роли наследственности при гипертонии появились еще в 20-х годах нашего столетия. Описаны семьи, в которых в течение 3-4 поколений наблюдались лица, страдающие артериальной гипертонией [Кушаковский, 1977]. Большинство авторов считают, что в генезе гипертонической болезни имеет значение сочетание генетических и экзогенных факторов [Тогин, 1983]. По наследству передаётся наклонность к функциональным сдвигам, лежащим в основе развития гипертонической болезни. Число детей с артериальной гипертонией больше в семьях, где гипертонической болезнью страдают родители [Чепыжева, 1999].

Последнее десятилетие наблюдается коренное изменение в структуре человеческой популяции, население стареет, и большая часть населения проживает в мегаполисе. Поэтому возрастает распространение болезней с поздней манифестацией. Болезни с поздней манифестацией имеют генетическую компоненту и поэтому зависят от генетико-демографических процессов в популяции. В настоящее время наблюдается значительная миграция населения между странами и континентами. В новых условиях на их организм продолжают действовать факторы, связанные с прежней средой обитания, и новые условия окружающей среды. Между эмоциями и заболеваниями существует определённая связь [Исаков, 1983]. Поскольку негативные эмоции не только ухудшают отношения с окружающими людьми, но и влияют на состояние здоровья человека. Отрицательные эмоции, душевные переживания, психоэмоциональные травмы и у здоровых людей сопровождаются различными реакциями, в том числе повышением артериального давления. У болеющего гипертонической болезнью человека в ответ на малозначительную причину возникает не соответствующая по поводу эмоциональная реакция, вместе с которой значительно повышается артериальное давление. Всплески агрессивности связывают с мигренями и гипертонической болезнью [Кушаковский, 1977]. Систематические психоаналитические обследования больных гипертонией показали, что на уровне артериального давления влияют постоянное сдерживание агрессивных импульсов [Руцицкий Э.М., 1980]. Цель данного исследования – выяснить, имеется ли связь между демографическим статусом городского жителя (коренной или мигрант), а также его психоэмоциональными характеристиками и гипертонической болезнью.

Объект и методы

В исследовании приняли участие 363 жителя города Харькова в возрасте 45-65 лет. Были сформированы две выборки: случайная популяцион-

ная (259 человек) и пробандная (104 человека), которую составили больные гипертонией. Выясняли место рождения обследованных, а также их родителей. Для оценки агрессивности использовался опросник Ассингера [Сидоренко, 2001]. Общая агрессивность выражается в баллах от 30 до 50. Для исследования эмпатии – опросник Меграбяна-Эпштейна [Сидоренко, 2001]. Уровень эмпатии выражается в баллах от 1 до 10. Сравнимые группы были сопоставимы по возрасту (табл.1). Статистический анализ проводили методом угловой трансформации долей с использованием критерия F [Фалконер, 1985]. База данных сформирована в программе Microsoft Excel. Расчёты выполнены с помощью программы Statistica.

Результаты и обсуждение

Анализ медицинской документации представителей популяционной выборки (259 человек) позволил выявить больных гипертонией. Они составили среди мужчин 41%, среди женщин 59%. Разница в распространённости гипертонии у мужчин и женщин оказалась статистически незначимой. Для дальнейшего анализа больных из популяционной выборки (54 человека) объединили с выборкой пробандов. Таким образом, была сформирована группа «больные гипертонией» (158 человек). Индивиды популяционной выборки без признаков гипертонии составили контрольную группу здоровых (205 человек).

Таблица 1

Характеристики возрастных распределений

Статистические показатели	Больные гипертонией		Здоровые	
	Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
n	74	84	102	103
min	45	45	45	45
max	65	65	65	65
$\bar{X} \pm S_x$	53,1±0,24	53,4±0,17	53,7±0,31	52,9±0,21
s	4,38	4,41	4,62	4,07

Примечание. n – количество обследованных, min , max – минимальный и максимальный возраст, $\bar{X} \pm S_x$ – среднее арифметическое и статистическая ошибка, s – стандартное отклонение.

В группе больных гипертонией распределение коренные жители составляют 28%, мигранты 72%. В группе здоровых коренных в два раза больше - 62% ($p < 0,05$), на долю мигрантов приходится 38% (табл.2). Таким образом, миграция может рассматриваться как фактор повышенного риска к развитию гипертонической болезни.

Отмечено, что при гипертонии происходит изменение реакции на стресс и опасность, что отражается на отношении индивида к другим людям [Гогин Е.Е., 1983]. Для проверки этого предположения нами был измерен уровень агрессивности и эмпатии. Оказалось, что уровень агрессивности у гипертоников выше, чем у здоровых людей (табл.3). У больных

мужчин и женщин он составляет 42,1 и 41,2 баллов, а у здоровых соответственно 36,2 и 34,2 балла ($p < 0,05$).

Эмпатия способствует уравновешенности эмоциональной сферы человека [Rogers, 1975]. Так как гипертония чаще всего возникает у людей, занятых трудом, требующим длительного и сильного психоэмоционального напряжения, следует предположить, что уровень эмпатии будет ниже у гипертоников, чем у здоровых людей. Проведенные исследования показали, что уровень эмпатии выше у здоровых людей по сравнению с больными. У здоровых мужчин и женщин показатели эмпатии составляют 6,8 и 6,4 баллов, у гипертоников соответственно 4,0 и 3,3 ($p < 0,05$).

Таблица 2

Распределение мест рождения (n, %)

Больные гипертонией				Здоровые			
Мужчины		Женщины		Мужчины		Женщины	
Кор.	Мигр.	Кор.	Мигр.	Кор.	Мигр.	Кор.	Мигр.
25	49	19	65	67	35	59	44
34%	66%	23%	77%	66%	34%	57%	43%

Примечание. Кор. – уроженцы г. Харькова, Мигр. - уроженцы других мест.

Таблица 3

Уровень агрессивности и эмпатии (баллы)

Показатель	Больные гипертонией		Здоровые	
	Мужчины (n=74)	Женщины (n=84)	Мужчины (n=102)	Женщины (n=103)
Агрессивность ($\bar{X} \pm S_x$)	42,1 \pm 3,4	41,2 \pm 3,8	36,2 \pm 3,1	34,2 \pm 3,6
Эмпатия ($\bar{X} \pm S_x$)	4,0 \pm 3,2	3,3 \pm 3,1	6,8 \pm 3,7	6,4 \pm 3,5

Примечание. n – количество обследованных, $\bar{X} \pm S_x$ - среднее арифметическое и статистическая ошибка.

Изложенные результаты пока являются предварительными. Они показали, что миграция как популяционно-генетический процесс является фактором повышенного риска для формирования гипертонической болезни. Что касается различий в личностных характеристиках больных и здоровых людей, то причинно-следственные связи этих явлений будут обсуждаться после завершения семейных исследований с последующим генетико-корреляционным анализом.

Выводы

В населении Харькова признаки гипертонии отмечаются у 20% мужчин и 23% женщин.

Среди гипертоников мигрантов (72%) почти в два раза больше, чем среди здоровых людей (38,5%).

Уровень агрессии выше у гипертоников (41,2-42,1 балла), чем у здоровых людей (34,2-36,2).

Уровень эмпатии здоровых людей (6,4-6,8 баллов) выше, чем у больных гипертонией (3,3-4,0 баллов).

Литература

1. *Сидоренко Е.В.* Методы математической обработки в психологии. СПб: ООО «Речь», 2001. – 350 с.

2. *Фалконер Д.С.* Введение в генетику количественных признаков / Пер.с англ. А.Г. Креславского и В.Г. Черданцева. – М.: ВО «Агропромиздат», 1985. – С.486.

3. *Bergeman C.S., Seroczynski A.D.* Genetic and environmental influences on aggression and impulsivity / In: *Neurobiology and Clinical Views on Aggression and Impulsivity*, edited by Maes M., Coccaro E.F. – Chichester, UK, Wiley, 1998, pp 63–80.

4. *Rogers C.R.* Empatic: an unappreciated way of being // *The Counseling Psychologist*. - 1975. – Vol.5. - №2. – P.2-10.

5. *Гогин Е. Е., Сененко А. Н., Тюрин Е. И.* Артериальная гипертензия.— Л.: Медицина, 1983.—272 с.

6. *Исаков И. И.* Артериальные гипертонии.— Л. : Медицина, 1983.— 198 с.

7. *Кушаковский М. С.* Гипертоническая болезнь.— М.: Медицина, 1977.— 210 с.

8. *Руцицкий Э. М., Василенко Ф. И.* Динамика некоторых психологических параметров у больных с гипертоническими кризами//Клин, медицина.— 1980.— № 10.—С. 26—30.

9. *Haessler G.* Central mechanisms in blood pressure regulation and hypertension.—*Int. J. Obes.*, 1981, v. 5, S. 1, p. 45—50.

Резюме

В населении Харькова признаки гипертонии отмечаются у 20% мужчин и 23% женщин. Среди гипертоников мигрантов (72%) почти в два раза больше, чем среди здоровых людей (38,5%). Уровень агрессии выше у гипертоников (41,2-42,1 балла), чем у здоровых людей (34,2-36,2). Уровень эмпатии здоровых людей (6,4-6,8 баллов) выше, чем у больных гипертонией (3,3-4,0 баллов).

У населенні Харкова ознаки гіпертонії наголошуються у 20% чоловіків і 23% жінок. Серед гіпертоніків мігрантів (72%) майже в два рази більше, ніж серед здорових людей (38,5%). Рівень агресії вище у гіпертоніків (41,2-42,1 балів), чим у здорових людей (34,2-36,2). Рівень емпатії здорових людей (6,4-6,8 балів) вищий, ніж у хворих на гіпертонію (3,3-4,0 балів).

In the population of Kharkov the signs of high blood pressure are marked for 20% men and 23% women. Among high blood pressures of migrants (72%) almost in two times more than among healthy people (38,5%). Patients by high blood pressures (41,2-42,1 mark) have a level of aggression higher, what for healthy people (34,2-36,2). The level of empatic of healthy people (6,4-6,8 marks) is higher, than for patients by high blood pressure (3,3-4,0 marks).

**МАКУХ Г.В., ЧОРНА Л.Б., ТРЕТЯК Б.І., ТИРКУС М.Я.,
ЛОТОЦЬКА - САВЧАК О. Ю., ЗАСТАВНА Д.В.**

ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України»

Україна, 79008, Львів, вул. Лисенка, 31,а, e-mail: makukh.h@ihp.lviv.ua

СПЕКТР ТА ЧАСТОТА АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ ФОЛАТНОГО ОБМІНУ (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*), ГЕМОСТАЗУ (*FV*, *FII*) ТА ІНСУЛІН – ПОДІБНОГО ФАКТОРУ РОСТУ – II (*IGF-II*) У САМОВІЛЬНИХ АБОРТУСІВ

У людини 60% зигот елімінується на пре- та ранніх після імплантаційних етапах розвитку, а 15-20% клінічно верифікованих вагітностей спонтанно перериваються. Незважаючи на велике число факторів, які спричиняють переривання вагітності, дія їх в більшості випадків на кінцевому етапі однотипова і окреслюється терміном самовільний аборт (СА, викидень). Самовільний аборт відбувається без будь-яких зовнішніх втручань, і якщо повторюється більше, ніж два рази, його називають звичним [1, 2].

Самовільний аборт має багатофакторну етіологію, що включає в себе негенетичні (гормональні, анатомічні, імунологічні, інфекційні, метаболічні і фактори навколишнього середовища) та генетичні фактори (чисельні і структурні хромосомні аномалії, генні мутації) [2]. Внесок генетичної компоненти в генез раннього переривання вагітності є дуже високим і майже половина стосується кількісних хромосомних аномалій [3]. Чим обумовлено переривання вагітності при нормальному каріотипі зародка вивчено недостатньо і становить значний інтерес.

Згідно з сучасними протоколами ведення пацієнток із діагнозом аборт в ході, неповний аборт, завмерла вагітність, обов'язковим є патогістологічне дослідження видаленої тканини [2]. Зважаючи на сучасні можливості ДНК – діагностики, доцільним є виділення ДНК із ембріонального матеріалу отриманих зразків для встановлення можливих чинників мимовільного переривання вагітності. Такі обстеження спрямовуватимуться на виявлення причин СА у кожному конкретному випадку.

Метою роботи було проаналізувати спектр та частоту алельних варіантів генів фолатного обміну (*MTHFR*, *MTR*, *MTRR*), гемостазу (*FV*, *FII*), інсулін – подібного фактору росту – II (*IGF-II*) та провести детекцію гена *SRY* у генетичному матеріалі тканин самовільних абортусів.

Матеріали та методи

Проводили виділення та очистку ДНК із ворсин хоріону чи лейкоцитів периферійної крові методом фенол – хлороформної екстракції. На подальших етапах дослідження проводили ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro*, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Використовували ендонуклеази рестрикції та термостабільну Taq-полімеразу ("Fermentas", Вільнюс, Литва). Генотипування поліморфних локусів проводили методом ПДРФ. Молекулярно – генетичну детекцію гена *SRY* про-

водили методом ПЛР із використанням праймерів гомологічних до даного гена. Електрофорез проводили у 2,5% агарозному гелі та сканували на УФ – транслюмінаторі. Достовірність відмінностей оцінювали методом χ^2 та застосовували точний критерій Фішера.

Результати та обговорення

Виділено ДНК ворсин хоріону отриманих із 85 зразків біологічного матеріалу мимовільних абортусів зібраного для патогістологічного дослідження. Термін переривання вагітності становив від 4 до 16 тижнів. Зважаючи на можливість контамінації материнською ДНК, матеріалом для виділення ДНК служили багаторазово промиті у фізіологічному розчині ворсини хоріона.

На Y хромосомі локалізований ген *SRY*, присутність якого детермінує чоловічу стать у людини. Проведено молекулярно-генетичну детекцію гена *SRY* у ДНК 85 ембріонів та плодів людини, отриманих внаслідок мимовільного переривання вагітності. У 46 (54%) зразках ДНК, виділеної з хоріона виявлено відсутність гена *SRY* та у 39 (46%) зразках присутність гена *SRY*. Таке співвідношення відрізняється від середнього співвідношення статей при народженні, де переважає чоловіча стать. Отримані результати потребують подальшого аналізу, оскільки різняться від даних літератури, згідно з якими частка мимовільних викиднів чоловічої статі є вищою, ніж жіночої [3].

Інсуліноподібний фактор росту II є регуляторним пептидом, який відноситься до суперродини інсуліну і відіграє роль аутокринного або паракринного фактора росту. АраІ поліморфізм - один з найбільш функціональних SNP гена *IGF-II*, вивчається у якості кандидатного маркера ризику пошкодження м'язів, порушення внутрішньоутробного розвитку і канцерогенезу [4]. З метою вивчення його ролі при мимовільних викиднях, проведено молекулярно-генетичне тестування АраІ поліморфізму гена *IGF-II* у 52 зразках ДНК виділених з хоріона самовільних абортусів. У якості контролю проаналізовано 40 зразків ДНК здорових волонтерів (Табл. 1).

Таблиця 1

Частоти генотипів АраІ поліморфізму гена *IGF-II*

Генотип АраІ <i>IGF-II</i>	Дослідна група, %	Контрольна група %	χ^2	P
ВВ	36,5	67,5	8,66	< 0,01
АВ	53,8	22,5	18,1	< 0,01
АА	9,7	10	0,0037	> 0,05

Як видно з даних наведених у табл.1, встановлено статистично вірогідні відмінності щодо розподілу генотипів у досліджуваних групах із зростанням у дослідній групі частки гетерозигот АраІ АВ. Досліджений у роботі ген *IGF-II* у людини є імпритованим й дефект метилювання *IGF-II* призводить до низької ваги при народженні - синдром Сільвера – Расела

і, навпаки, втрата імпринтингу *IGF-II* веде до гіперекспресії гена - синдром Беквіта- Відемана [5]. Отримані результати можуть свідчити про те, що гетерозиготність гена *IGF-II* і можлива втрата геномного імпринтингу можуть бути однією із причин й самовільних викиднів.

Враховуючи те, що для клітин ембріону є характерним швидкий поділ та активний ріст, а проліферація та диференціація клітин вимагає достатньої кількості метильних груп, то низькофункціональні алелі генів фолатного обміну можуть мати вплив на розвиток ембріона як через порушення забезпечення і біодоступності метильних груп, так і через пряму ембріотоксичну дію гомоцистеїну [6, 7]. Проведено молекулярно – генетичне дослідження поліморфних локусів генів *MTHFR* (метилентетрагідрофолат редуктази) *C677T*, *MTHFR A1298C*, *MTR* (метіонін синтази) *A2756G* та *MTRR* (редуктази метіонін синтази) *A66G* в 50 зразках ДНК хоріона самовільно елімінованих ембріонів та 70 зразках ДНК дітей контрольної групи (Табл.2).

Як свідчать отримані дані (Табл.2), встановлено статистично вірогідні відмінності щодо розподілу генотипів поліморфних локусів *MTHFR C677T* та *MTRR A66G*. У дослідній групі виявлено значно вищу частоту генотипу *MTHFR 677TT* при зниженні частки гетерозигот *MTHFR 677CT* у порівнянні із контрольною групою. Дослідження поліморфного локусу *MTRR A66G* показало значне збільшення кількості гетерозигот *MTRR 66AG* серед мимовільних викиднів при зменшенні кількості випадків генотипу *MTRR 66AA*. Аналіз даних контрольної групи свідчить про зміщення від рівноваги Харді – Вайберга в напрямку браку гетерозигот *MTRR 66AG*. Можна припустити, що однією із причин такого розподілу може бути зростання частоти елімінації ембріонів з генотипом *MTRR 66AG* на ранніх стадія онтогенезу.

Не виявлено вірогідних відмінностей щодо розподілу алелів і генотипів поліморфних локусів *MTHFR A1298C* та *MTR A2756G*. Проте, не виключається їх роль при накопиченні низькофункціональних алелів, що виступатиме предметом окремого дослідження. Дефіцит метильних груп в клітинах ембріону може вести до підвищеного включення урацилу замість тиміну в ланцюг ДНК, який синтезується. В результаті утворюється ДНК, яка аномально легко фрагментується, синтез її різко сповільнюється, що веде до порушення клітинного циклу клітин плоду, і можливо сприяє запуску механізмів апоптозу. В свою чергу недостатність метилювання ДНК викликає порушення хромосомної сегрегації та аномальну генну експресію, що, як ми припускаємо, може бути причиною поліплідії або анеуплоїдії хромосомного набору плоду.

Наявність в геномі ембріону алелів генів, які асоціюються із виникненням тромфолічних станів, є потенційною причиною репродукційних втрат [8]. Для перевірки даної гіпотези проаналізовано частоту мутацій *FV G1691A* та *FII G20210A* серед самовільних абортусів у порівнянні із їх поширеністю серед народжених дітей. Проведено молекулярно - генетичне

дослідження генетичних маркерів спадкових тромбофілій: мутації G1691A гена фактора V (Leiden) та G20210A гена фактора II (протромбін) згортання крові у 50 зразках ДНК хоріона та у 70 зразках ДНК дітей контрольної групи.

Таблиця 2

Частоти генотипів поліморфних локусів генів фолатного обміну

Локус	Генотип	Дослідна група %	Контроль, %	P
MTHFR C677T	CC	58	43	>0.05
	CT	34	54	<0.05*
	TT	8	3	>0.05
MTHFR A1298C	AA	40	32	>0.05
	AC	52	54	>0.05
	CC	8	14	>0.05
MTR A2756G	AA	68	60	>0.05
	AG	28	37	>0.05
	GG	4	3	>0.05
MTRR A66G	AA	8	31.5	<0.05*
	AG	72	37	<0.05*
	GG	20	31.5	>0.05

P< 0.05*- статистично вірогідна відмінність

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу у переважній більшості випадків (>95%) як у мимовільних абортусів, так і в контрольній групі виявляли нормальні генотипи *FV* 1691GG та *FII* 20210GG. У досліджуваній групі частота гетерозиготного носійства мутації *FV* 1691 GA виявилася вищою, ніж у контрольній групі (4% та 2,86%). Серед 50 зразків ДНК хоріона самовільно елімінованих ембріонів виявлено один випадок гетерозиготного носійства мутації *FII* 20210 GA, при її відсутності у контрольній групі. Проте, відмінності щодо частоти мутації G1691A гена фактора V та G20210A гена фактора II згортання крові між дослідною та контрольною групою не були статистично вірогідними.

Із визначенням інформативних маркерів, молекулярно-генетичне тестування включатиметься у протоколи досліджень видалених ембріональних тканин для встановлення можливих чинників самовільного переривання вагітності.

Висновки

1. Зважаючи на сучасні можливості ДНК – діагностики, доцільним є виділення ДНК із ембріонального матеріалу самовільних абортусів, скерованого на патогістологічне дослідження з метою проведення подальшого генетичного аналізу.

2. Розподіл генотипів поліморфного локусу *AraI* імпритованого гена *IGF-II* у ДНК виділених із хоріона самовольних абортусів статистично вірогідно відрізняється від результатів контрольної групи.

3. Виявлено вищу частоту генотипу *MTHFR* 677TT при зниженні частки гетерозигот *MTHFR* 677CT та вірогідне збільшення частки гетерозигот *MTRR* 66AG у самовільних абортусів у порівнянні із контрольною групою.

4. Не виявлено вірогідних відмінностей у розподілі алелів і генотипів поліморфних локусів *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *FV* G1691A та *FII* G20210A.

Роботу виконано при фінансовому сприянні Західно-Українського Біо-Медичного Дослідницького Центру підтримки молодих вчених (WUBMRC).

Література

1. Macek M. Sr., Bianchi D.W., Cuckle H. Early Prenatal Diagnosis, Fetal Cells and DNA in the Mother. Present State and Perspectives // Charles University in Prague – The Karolinum Press, Prague, - 2002.

2. Серов Е.Н., Стрижаков А.Н., Маркин С.А. Руководство по практическому акушерству - М.: Медицина, - 1997, 424с.

3. Островерхова Н.В. Детекция анеуплоидии у спонтанных абортусов методом сравнительной геномной гибридизации/ Островерхова Н. В., Назаренко С.А., Лебедев И.Н. // Генетика.-2002.-Т.38, №12.-С.1690-1698.

4. Hengmi, C. Loss of *IGF2* imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk / C. Hengmi, M. Cruz-Crrea, F.M. Giardiello // Science. — 2003. — Vol. 299.— P. 1753-1755.

5. Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of *IGF2* imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome / A. Sparago, F. Cerrato, M. Vernucci [et al.] // Nature Genetics. – 2004, - Vol. 36, - P. 958 – 960.

6. Recurrent spontaneous miscarriages and hyperhomocysteinemia. / A. Del Bianco, G. Maruotti, A. M. Fulgieri [et al.] // Minerva Ginecol. – 2004. – Vol. 56. – P. 379–383.

7. Zetterberg H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. //H. Zetterberg. // Reprod. Biol. Endocrinol.– 2004. – Vol. 2. – P-7.

8. Макацария А. Д. Тромбофилические состояния в акушерской практике (клинические, молекулярные и генетические аспекты). А. Д. Макацария, В. О. Бицадзе // М.: – 2001. – С. 247–256.

Резюме

Виявлено статистично вірогідну різницю у розподілі генотипів *AraI* поліморфізму гена *IGF-II* у мимовільних абортусів у порівнянні із контрольною групою. Виявлено вищу частоту генотипів *MTHFR* 677TT та *MTRR* 66AG, при зниженні частки *MTHFR* 677CT. Не виявлено значимих відмінностей у розподілі алелів і генотипів поліморфних локусів *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *FV* G1691A та *FII* G20210A.

Виявлено статистически достовірні различия в распределении генотипов *AraI* полиморфизма гена *IGF-II* в самопроизвольных абортусов в сравнении с контрольной группой. Вывявлено высшую частоту генотипов *MTHFR* 677TT и *MTRR* 66AG, при снижении доли *MTHFR* 677CT. Не обнаружено значимых различий в

распределении аллелей и генотипов полиморфных локусов *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *FV* G1691A и *FII* G20210A.

It has been established a statistically reliable differences in the distribution of *IGF-II* gene *ApaI* genotypes in spontaneous abortions as compared with control group. The higher frequency of *MTHFR* 677TT and *MTRR* 66AG genotypes to a lower proportion of *MTHFR* 677CT have been revealed. There were no significant differences in the distribution of alleles and genotypes of polymorphic loci *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *FV* G1691A and *FII* G20210A.

МОРДЕРЕР Д.Є., НІКОЛАЄНКО О.В., СКРИПКИНА І.Я., ЦИБА Л.О., РИНДИЧ А.В.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: i.skrypkina@imbg.org.ua

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АДАПТОРНОГО БІЛКА ITSN1 З СИНАПТИЧНИМИ БІЛКАМИ MAP6 (STOP) ТА СИНАПСИНОМ

Інтерсектин 1 (ITSN1) є мультидоменним адапторним білком, що бере участь у клатрин-опосередкованому ендоцитозі, регуляції актинового цитоскелету та сигнальній трансдукції. Його характерною особливістю є порівняно висока експресія у нейронах [1]. Крім того, відомо декілька подій альтернативного сплайсингу інтерсектину 1, що відбуваються виключно чи переважно в нейронах. Йдеться про утворення довгої ізоформи інтерсектину 1, а також про включення 20-го екзону, що призводить до інсерції п'яти додаткових амінокислот до SH3A-домену [2]. Ця подія призводить до зміни властивостей SH3A-домену, зокрема до підвищення афінності зв'язування з динаміном, синаптоніном та CdGAP, а також пониження афінності зв'язування з SOS та Cbl [2]. Усе це говорить про особливі функції інтерсектину 1 у нейронах.

Як відомо, основною функцією нейронів є проведення нервового імпульсу. Передача імпульсу між двома нейронами відбувається в синапсах. Найбільш поширеним типом синапсів у нервовій системі є хімічні синапси, в яких передача відбувається за допомогою нейромедіатора, що міститься у синаптичних везикулах. Коли потенціал дії досягає пресинаптичного нервового закінчення, відбувається відкриття потенціалзалежних кальцієвих каналів і підвищення внутрішньоклітинної концентрації кальцію, що призводить до злиття синаптичних везикул з плазматичною мембраною і вивільнення нейромедіатора до синаптичної щілини. Молекули нейромедіатору зв'язуються з відповідними рецепторами на постсинаптичній мембрані, що призводить до відкриття іонних каналів і деполяризації мембрани, внаслідок чого генерується потенціал дії і передача імпульсу продовжується. У функціонуванні хімічних синапсів ендоцитоз відіграє важливу роль, по-перше, постачаючи для повторного використання синаптичні ве-

зикули з плазматичної мембрани, і, по-друге, регулюючи кількість рецепторів та іонних каналів на постсинаптичній мембрані, що впливає на силу вхідного струму і, відповідно, на рівень передачі імпульсу в синапсі. Інтерсектин 1 є складовою частиною ендцитозних білкових комплексів, тому його участь у синаптичній передачі імпульсу є ймовірною.

Матеріали і методи

Антитіла. В роботі були використані моноклональні антитіла anti-STOP (Chemicon), поліклональні антитіла anti-Syn1 (Santa-Cruz Biotechnology) та поліклональні антитіла до інтерсектину 1 власного виробництва [3]. Для імуофлуоресценції: поліклональні антитіла FITC-Conjugate anti-mouse IgG (Vector Laboratories Inc.) та Alexa Fluor 405 goat anti-rabbit IgG і Alexa Fluor 603 horse anti-goat IgG (Invitrogen).

Отримання рекомбінантних білків. Нуклеотидні послідовності, що відповідають SH3-домени інтерсектину 1 (A+20/-20, B, C, D, E), було клоновано у векторі для прокаріотичної експресії pGEX-4T-3 раніше [3]. Рекомбінантні GST-білки були отримані з бактеріальних лізатів *E. coli* BL21(DE3)pLysE, трансформованих відповідними конструкціями. Білки індукували 1 mM IPTG 18 год при кімнатній температурі. GST-білки були очищені за допомогою глутатіон Sepharose 4B (Amersham Biosciences) згідно протоколу фірми-виробника.

Преципітація з використанням GST-злитих білків (GST-Pull-down). GST-SH3-домени іммобілізувалися на глутатіон-сефарозі та після відмивки інкубувалися з лізатом мишачого мозку. Надалі, після повторної відмивки, зв'язані білки видалялися з сефарози шляхом кип'ятіння та розділялися методом електрофорезу у 7,5% поліакріламідному гелі (ПААГ) з подальшою візуалізацією за допомогою фарбування сріблом або фарбником SYPRO Ruby.

Культивування нейронів та імуопреципітація. Клітини мозку новонароджених щурів лінії Wistar були хімічно дисоційовані розчином трипсину (1мкг/мл, 5 хв.) і висіяні на скельця, покриті ламініном або полі-L-орнітином. Поживне середовище, в якому інкубувалися клітини, містило: мінімальне середовище Ігла з 10% сироваткою коня (GIBCO, USA), 6 мкг/мл інсуліну, 2 г/л NaHCO₃, 25 од./мл пеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину. Через три дні після висівання до середовища додавали цитозин-β-d-арабінофуранозид для інгібування проліферації гліальних клітин, і після інкубації протягом 24 годин промивали свіжим середовищем. Експерименти проводили після 2-х тижнів інкубації у інкубаторі з контролем вологості (5% CO₂). Лізис клітин та імуопреципітації проводили в буфері с 1% NP-40, як описано [3].

Конфокальна мікроскопія. Нейрони вирощували на покривних скельцях, промивали від середовища розчином 1xPBS. Після цього інкубували 15 хв. у 3,7% розчині формальдегіду. Від формальдегіду промивали тричі по 5 хв розчином 1xPBS з 0,2% Triton-X100. Далі клітини 30 хв блокували у розчині 1xPBS з 0,2% Triton-X100 і 2% бичачого сироваткового альбумі-

ну. Після цього інкубували по годині з кожним антитілом, між інкубаціями промиваючи препарат розчином 1xPBS з 0,2% Triton-X100. Конфокальну мікроскопію проводили на мікроскопі Zeiss LSM 510 Meta.

Результати та обговорення

Для пошуку нових білків-партнерів інтерсектину 1 було проведено преципітацію з використанням GST-злитих SH3-доменів ITSN1 з білками лізату мозку миші. Зв'язані білки видалялися з сефарози шляхом кип'ятіння та розділялися методом електрофорезу у 7,5% поліакріламідному гелі з подальшою візуалізацією за допомогою фарбування сріблом або фарбником SYPRO Ruby. Для ідентифікації за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії було обрано три смуги (рис. 1).

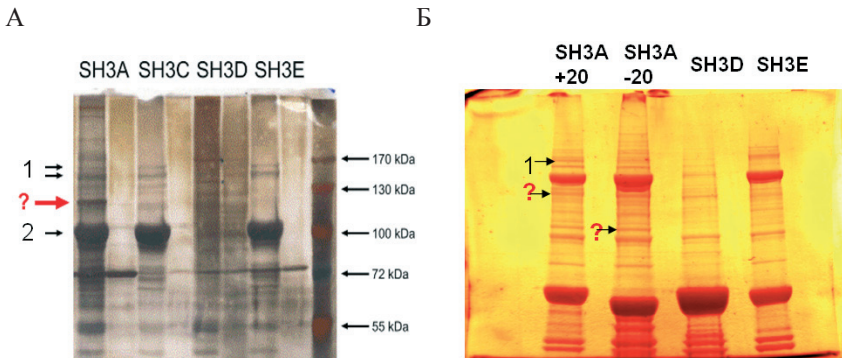


Рис. 1. Електрофореграма результатів GST-pull-down GST-SH3-доменів з лізатом мишачого мозку. А – фарбування сріблом; Б – фарбування SYPRO Ruby. 1 – синаптоянін, 2 – динамін, ? – смуги, обрані для ідентифікації

На електрофореграмі в доріжці, що відповідає SH3A-домену було виявлено смугу, яка відповідає розміру близько 125 кДа (рис. 1А). Її було вирізано з гелю та відправлено до Інституту біомедичної хімії (м. Москва) для проведення мас-спектрометричного аналізу (MALDI-TOF). За його результатами цю смугу було ідентифіковано як MAP6 (microtubule-associated protein 6, МТАР6, STOP). Крім того, для обох варіантів SH3A-домену також були виявлені дві смуги розміром 70 та 50 кДа (рис1Б). Їх було ідентифіковано як синапсин 1 та синапсин 2 відповідно.

Для підтвердження результатів MALDI-TOF було проведено ряд експериментів. Так, взаємодію SH3-доменів інтерсектину 1 з MAP6 було підтверджено повторного GST-pull-down з лізатом мишачого мозку. Білки, що зв'язалися, було проаналізовано методом Вестерн-блот аналізу з використанням моноклональних антитіл anti-STOP (Chemicon). Було показано, що MAP6 взаємодіє з обома варіантами SH3A-домену, а також з SH3C- та SH3E-доменами (рис.2).

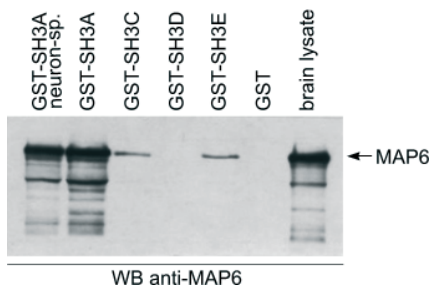


Рис.2. GST-pull-down SH3-доменів інтерсектину 1 з лізатом мишачого мозку.

Для підтвердження наявності взаємодії інтерсектину 1 з MAP6 та синапсином 1 *in vivo* було проведено коімунопреципітації білкових комплексів з лізату мишачого мозку. Таким чином було підтверджено взаємодію інтерсектину 1 з обома білками (рис.3).

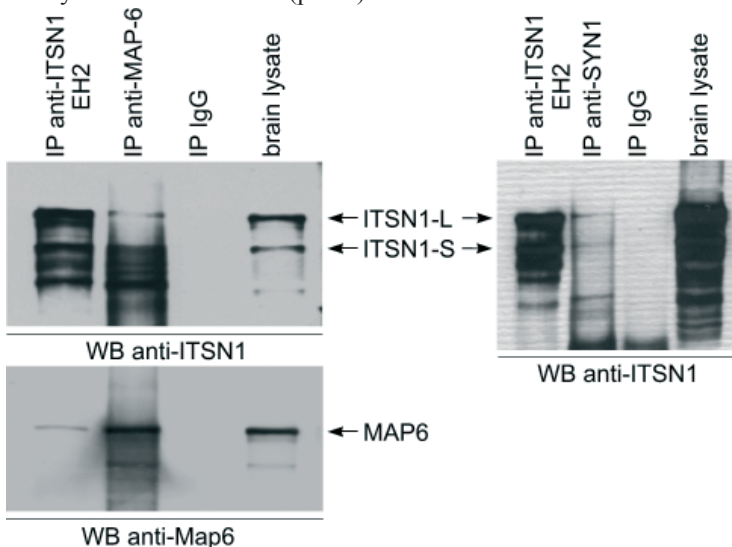


Рис.3. Вестерн-блот-аналіз комплексів, імунопреципітованих за допомогою антитіл до інтерсектину 1 (EH2), MAP6 та синапсину 1 (SYN1) з лізатів мозку миші

Нами було досліджено також розподілення цих трьох білків у культивованих нейронах гіпокампі пацюків методом флуоресцентної конфокальної мікроскопії. Використовувалися моноклональні антитіла anti-STOP до білка MAP6, поліклональні антитіла anti-Syn1 до синапсину 1 та поліклональні антитіла до ITSN1 власного виробництва. Було виявлено, що у цих клітинах вищеперераховані білки частково колокалізуються (рис.4).

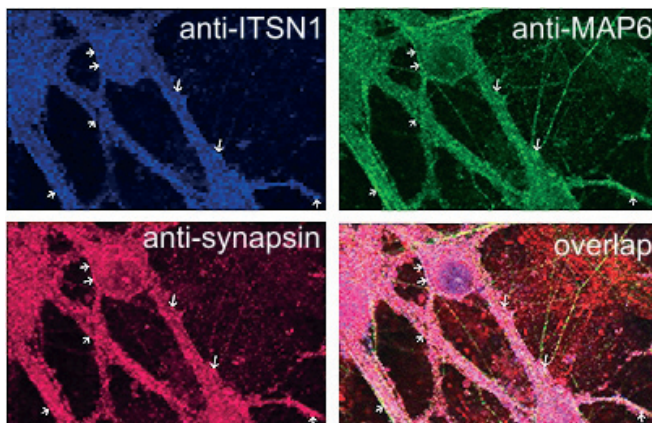


Рис. 4. Імунофлуоресцентний аналіз субклітинної локалізації ITSN1, МТАР6 та синапсину 1. Візуалізація антитілами: ITSN - anti-ITSN1-EH2, вторинні – AlexaFluor405; MAP6 – anti-STOP, вторинні – FITC; синапсин 1- anti-Syn1, вторинні - AlexaFluor603.

Вивчення молекулярних механізмів функціонування синапсів та, зокрема, участі в них інтерсектину 1 має важливе практичне значення. Цей білок вважається одним з факторів, що зумовлюють розвиток симптомів синдрому Дауна і пов'язаних з ним психічних розладів. Відомо, що саме синаптичні процеси, зокрема явище синаптичної пластичності, є молекулярним підґрунтям психічних процесів. Зокрема, довготривалу потенціацію вважають молекулярною основою пам'яті. У зв'язку з цим цікавим видається той факт, що у хворих на синдром Дауна морфогенез дендритних шипиків порушений, і, ймовірно, відбуваються альтерації у синаптичній передачі. З іншого боку, новий партнер інтерсектину 1 також пов'язаний з психічними захворюваннями – миша з нокаутом цього гена була запропонована для використання в якості тваринної моделі шизофренії. Таким чином, ці дослідження сприятимуть проясненню механізмів функціонування синапсів на молекулярному рівні і можуть поглибити розуміння розвитку різноманітних патологій.

Література

1. Pucharcós C, Fuentes JJ, Casas C, de la Luna S, Alcántara S, Arbonés ML, Soriano E, Estivill X, Pritchard M. Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome // Eur. J. Hum. Genet.-1999.–Vol.7-№6.–P.704-12.
2. Tsyba, L.O., Skrypkinska, I.Ya., Rynditch, A.V. et al. Alternative splicing of mammalian Intersectin 1: domain associations and tissue associations and tissue specificities. // Genomics.- 2004.- vol.84.- P.106-113.
3. Nikolaienko O, Skrypkinska I, Tsyba L, Fedyshyn Y, Morderer D, Buchman V, de la Luna S, Drobot L, Rynditch A. Intersectin 1 forms a complex with adaptor protein Rukl/

CIN85 in vivo independently of epidermal growth factor stimulation. Cell Signal. 2009 May;21(5):753-9. Epub 2009 Jan 8. PubMed PMID: 19166927.

Резюме

В результаті цієї роботи за допомогою pull-down-експериментів та імунопреципітацій було визначено нові нейрон-специфічні партнери ITSN1: MAP6 та синапсин 1. Показано, що MAP6 взаємодіє з обома варіантами SH3A-домену, та SH3C- і E-доменами ITSN1. Також показана колокалізація цих білків в нейронах гіпокампу пацюка.

В результате этой работы с помощью pull-down-экспериментов и иммунопреципитаций были определены новые нейрон-специфические партнеры ITSN1: MAP6 и синапсин 1. Показано, что MAP6 взаимодействует с обоими вариантами SH3A-домена, а также с SH3C- и E-доменами ITSN1. Также показана колокализация этих белков в нейронах гиппокампа крысы.

Using GST pull down assay and immunoprecipitation experiments we identified two novel ITSN1 neuron-specific partners: MAP6 and synapsyn 1. We showed that MAP6 interacts with both variants of SH3A-domain, SH3C- and E-domains of ITSN1. We also showed that these proteins colocalize in rat hippocampal neurons.

ПИСКУН Р.П., ГОРБАТЮК С.М., НИКОЛАЕНКО О.О., ШЕВЧУК Т.И.

Винницький національний медичинський університет ім. Н.И. Пирогова, Україна, 21021, Винниця-21, ул. Пирогова, 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru

ГЕНОМОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ – ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

XX век без преувеличения можно назвать веком генетики. За 100 лет своего существования генетика прошла огромный путь - от описания формальных законов наследования признаков через гипотетические наследственные задатки (позже названные генами) до расшифровки молекулярных механизмов точного воспроизведения наследственной информации из поколения в поколение, её изменчивости, принципов действия и взаимодействия генов. Интенсивность внедрения биотехнологических достижений в настоящее время существенно превышает скорость разработки методик защиты от их опасных последствий, в связи с чем целью нашей работы явилась оценка разных эффектов внедрения результатов развития генных биотехнологий с учетом природы человека и его генетической стабильности.

Материалы и методы

Генетика человека вобрала в себя достижения общей генетики и медицины, стала ведущей медико-биологической дисциплиной и теоретической основой клинической медицины [11]. В последнее время генная инженерия, бывшая ранее скорее теоретической дисциплиной, стала тем фактором, с которым принципиально невозможно не считаться [9]. Это связано и с появлением на рынке пищевых продуктов, полученных с применением этой самой инженерии, из генетически модифицированных растений и животных.

Результаты и обсуждение

По данным М. Дженкинс [5] первой из модифицированных животных появилась корова по кличке Розы. Ее рождение означало надежду на успешное выживание многих детей, рождающихся ранее положенного срока. Ученые специально вырастили Розы и еще восемь коров при помощи методов генной инженерии, чтобы они синтезировали человеческий белок в составе своего молока. Этот белок служит богатым и сбалансированным источником аминокислот, необходимых для новорожденных. Он в больших количествах производится в организме Розы, далее его можно выделить, очистить и добавить в сухое молоко для недоношенных детей. Порода коров, к которой принадлежит Розы, дает 10 000 литров молока в год. Еще до успешного эксперимента с Розы, учёные создали овец с внедрёнными генами человека. Эти животные были модифицированы для образования в составе их молока человеческого белка, способствующего свёртыванию крови и необходимого для больных гемофилией. При кистозном фиброзе помогает белок альфа-1 антитрипсин, и его производство также можно наладить из овечьего молока. Уже имеются данные о трансгенных свиньях, в которых экспрессируется человеческий гемоглобин, а также материалы по экспрессии гена человеческого лактоальбумина в организме коровы и хорошо известные всем данные об инсулине и интерфероне человеческого происхождения, синтезированные в микробных клетках.

На протяжении 1990-2010 х. годов учёные вывели много генетически модифицированных животных - в том числе и насекомых, - спасающих жизнь людям. На протяжении многих лет предпринимались попытки пересадить органы животных людям. Многочисленные неудачи связаны с тем, что организм отторгает чужеродные ткани. То же самое относится к попыткам пересадки органов от человека человеку. Специально для решения этой проблемы были выведены свиньи с человеческими генами. Возможно, в наступившем столетии удастся вырастить свиней с «запасными частями», то есть почками, сердцами и лёгкими, которые можно будет пересаживать больным людям.

Трансгенным растительным материалом засеяны уже десятки тысяч гектаров: это растения, не чувствительные к классическим вредителям, устойчивые к действию пестицидов и т.д. В 1980-х годах был выведен первый сорт генетически модифицированных растений - картофель, который сам может производить инсектицид. Инсектицидом является ядовитое вещество, производимое почвенной бактерией *Bacillus thuringiensis*. Оно безвредно для людей, но убивает насекомых, в том числе и колорадского жука. Токсин быстро расщепляется, поэтому это безвредный инсектицид для пауков и многих полезных насекомых. Учёные выделили ген, контролирующий производство токсина, и внедрили его в растение так, чтобы картофель сам производил его в своих листьях. Существует опасность, что у насекомых вырабатывается устойчивость к токсину, и перед тем как использовать модифицированное растение в широких масштабах, нужно провести дополнительные испытания [5].

В декабре 1996 года Европейское Содружество разрешило продажу генетически модифицированной кукурузы, которая содержит гены устойчивости к гербицидам, а также ген естественного инсектицида - бактерии *Bacillus thuringiensis*. Методами генной инженерии в организм внедряется ген-маркер, с помощью которого идентифицируют клетки, содержащие модифицированную ДНК. Маркер придает устойчивость к наиболее распространённым антибиотикам. Критики этого метода говорят, что, после того как коровы съедят модифицированную кукурузу, ген может перейти в бактерии, которые обитают в органах пищеварительной системы коров, и вызвать устойчивость к антибиотикам. Исходя из этого, правительство Великобритании высказало сомнения в целесообразности продажи модифицированной кукурузы в Европе, но Содружество было вынуждено принять во внимание и финансовые последствия запрета. США ежегодно экспортируют в страны Европы кукурузу на миллионы долларов, и запрет на эти поставки может привести к торговой войне. Кроме этого правительство США продало технологии выращивания модифицированных растений многим африканским странам. В связи с чем правительства европейских стран отказало им в рынке сбыта.

Наши украинские магазины и базары буквально завалены импортными окороками. Куры, которые держатся на таких ножищах, похоже, только из-за кончины не вымахали до размеров страуса. Американские ученые давно забили тревогу - люди с избыточным весом и особенно юные подростки-«бройлеры»- плод употребления мяса этих генетических монстров. Конечно, генные продукты в 5-6 раз дешевле. И это главный довод в развернувшейся борьбе. Натуральные вкуснее, полезнее, безопаснее - но их дорого производить. Цены на них растут. Любопытно, что польские сосиски, сделанные из «быстрого» мяса, уже не раскупаются в коммерческих киосках и их выдают за украинские, чтоб народ покупал. Импортные упаковки, которые раньше привлекали внимание жителей Польши и других зарубежных стран теперь многих отпугивают.

Известно, что в шоколаде «Таблерон» лецитин получен из сои с изменённой наследственной информацией. Ту же сою можно найти в импортных маргаринах, картофельных чипсах, в общем, в продуктах, которых до 30 тысяч наименований! В ближайшее время ожидается появление еще 150 видов генетически измененных продуктов, начиная с зелёного горошка и морковки [2].

Заведующий отделением агроэкологии и биотехнологии УААН В.И. Глазко видит у этой проблемы две стороны [6]. Одна из них – это пищевые качества продуктов, полученных искусственным путём. Мы ежедневно употребляем фармакологические препараты, в нашей пище постоянно присутствуют пищевые красители, консерванты, сахарозаменители, частички удобрений и стимуляторы роста. Все изделия проходят традиционную проверку на токсичность и отсутствие канцерогенных эффектов - то есть способности провоцировать рост злокачественных опухолей. И в принципе, если трансгенная продукция прошла лабораторные тесты, то не должна

представлять опасность. Вторая сторона проблемы - это специфика изготовления трансгенной продукции - введение нового генетического материала в старый вид, по сути, получение нового вида организмов, который не существовал до сих пор. Само появление новой формы организмов не может не повлиять на существующие «пищевые цепи», межвидовые взаимоотношения. Это - экологическая проблема, которая ещё не достаточно изучена. Последствия введения новой формы организма в окружающую среду, тем более в массовом количестве, - не прогнозировано. К нежелательным последствиям можно отнести, к примеру, перенесение генных комплексов от сельскохозяйственных видов растений к сорнякам или опасность использования при образовании новых комплексов гена стойкости против фармакологических препаратов. Науке не известно, что будет с генотипом после употребления новых растений и животных, которые ещё не водились на матушке Земле. Исследования показывают, что комплексное воздействие негативных факторов на человека как на биологический вид становится с каждым годом все более ощутимым [11]. Поэтому вряд ли подтвердятся прогнозы демографов, предполагающих, что к 2060 году численность населения на нашей планете достигнет 10 миллиардов человек. Не исключено, что такое «питание» приведет к появлению *Homo sapiens* нового образца. Учитывая имеющиеся сведения можно выделить следующие основные этапы эволюционного развития вида:

I этап - возникновение вида - характеризуется формированием вида при очень малой численности популяции и благоприятных условиях окружающей среды;

II этап - расцвет вида - характеризуется расширением ореола обитания, увеличением численности популяции и равновесием потребностей вида с возможностями окружающей среды;

III этап - кризис вида - характеризуется появлением противоречий между потребностями вида и возможностями среды обитания или несоответствием между состоянием окружающей среды и необходимыми условиями для существования вида, что приводит к началу массовых мутаций;

IV этап - гибель вида - характеризуется резким сокращением численности популяции за счет регрессивных мутаций и появления отдельных индивидуумов нового биологического вида за счёт прогрессивных мутаций [4, 7,8,10].

Приведём примеры регрессивных мутаций человечества, происходящих на нашей планете в разных странах. По данным президентской комиссии США по душевному здоровью, у 15% населения страны наблюдается нарушение психического здоровья, 5 -15% детей в возрасте от 5 до 15 лет страдают различными стрессовыми нарушениями или замедленным психическим развитием, 25% населения подвержены депрессиям, тревожности, эмоциональному дискомфорту. От употребления мутантов и их производных у людей не только страдает пищеварение и связанные с этим органы, но и

падает зрение, слух, ускоряются процессы старения. Не всегда термообработка убивает антибиотики, которыми пичкают животных. А уж про генные изменения и говорить нечего. Их усвояемость нашими организмами провоцирует раковые заболевания и ведёт «к патологическим изменениям потребителя на геномном уровне». Причём зависимость не всегда прямая. Съедая растения-гиганты или бройлеров-монстров можно и не стать великаном (хотя на Западе среди ряда подростков из бедных слоев акселератов немало), а превратиться во что-то неопределённое: больное, маленькое, ни на кого не похожее существо. В сравнительно благополучной Швеции каждый третий взрослый страдает от недомогания, усталости, нарушения сна, отверженности, тревожности. В большинстве случаев это связано со стрессовыми состояниями. Эти недуги передаются и потомству. В той же Швеции каждый третий ребёнок в возрасте 4-х лет имеет симптомы неблагополучия (чрезмерная агрессивность, ночные кошмары, недержание мочи) [1]. На Украине с 1992 года смертность преобладает над рождаемостью. Все эти данные убедительно говорят о том, что процесс массовых регрессивных мутаций давно начался. Куда там фантастам с их пришельцами и кошмарными коллапсами! Всё будет буднично и незаметно. Ужаснутся ли этому потомки? Вряд ли, ведь сравнить будет не с кем - все станут такими! А огромные мощные фирмы с грандиозным рекламным потенциалом успокоят потребителей и даже навяжут моду на генетический продукт!

Прежде чем создавать трансгенные растения и животных, необходимо очень серьёзно оценить все возможные последствия. Вполне понятны меры предосторожности, предпринимаемые всеми высокоразвитыми странами в отношении этих новых биотехнологий.

Генетика уже революционизировала медицину, вторгаясь как в область наследственных заболеваний, так и в фармакологию. Достижения современной генетики, включая создание трансгенных животных и растений, при правильном использовании сулят человечеству огромнейшие блага. Если же они будут использованы с совершенно другими целями, последствия не поддаются никакому описанию.

Выводы

1. Человечество вступило в завершающую стадию своего развития. При этом вид *Homo sapiens* находится в конце третьего этапа - кризиса вида, который в наибольшей степени стимулирован именно антропогенной деятельностью.

2. В настоящий момент не представляется возможным надеяться на полное запрещение биотехнологической деятельности, однако разработка мер, ограничивающих масштабы этой деятельности, являются настоятельной необходимостью в связи с тем, что последствия такой деятельности существенно опережают разработку методов защиты от них.

Литература

1. *Абарин В.* Франкенштейны XXI века. Атака на клонов// Совершенно секретно -2002.-№6.

2. Арчаков А., Семёнова Н. От наследственных заболеваний к клонированию и компьютерной фармакологии //Врач. -1999. - №6. - с.16-18.
3. Бочков Н.П. Генетика человека и медицина// Врач -1999. -№6. - с. 24-27.
4. Горбунова В.Н. Молекулярные основы медицинской генетики. - С.-Пб.: Интерметка, 1999. - 520с.
5. Дженкинс М. 101 ключевая идея: генетика.-М.:Гранд, 2002.
6. Інтерв'ю завідувача відділення агрокології і бітехнології УАН професора В.І.Глазка //Науковий світ - 1999,-№6.
7. *Медицина генетика: Підручник* / Кол. авт. за ред. О.Я. Гречаніної, Р.В. Богатирьової, О.П. Волосовця.- К.: Медицина, 2007. - 536 с.
8. *Медицина генетика: Підручник для вузів* / В.М. Запорожан, Ю.І. Бажора, А.В. Шевеленкова, М.М. Чеснокова. - Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2005. - 260 с.
9. *Ніколайчук В.І, Горбатенко І.Ю.* Генетична інженерія.-Ужгород, 1999.- 182с.
10. *Путинцева Г.И.* Медицина генетика: підручник. - 2-е вид., перероб. та доп. - К.: Медицина, 2008. - 392 с.
11. *Фогель Ф., Мотульский А.* Генетика человека (в 3 т.).-М.: Мир, 1990.

Резюме

Методы генной инженерии позволили получить новые виды организмов, которых раньше не было на земном шаре. Это - экологическая проблема, которая еще не достаточно изучена. Последствия употребления модифицированных продуктов, полученных с трансгенных растений и животных в пищу, наукой еще не исследованы.

Методи генної інженерії дозволили отримувати нові види організмів, які раніше не існували на земній кулі. Це - екологічна проблема, яка ще достатньо не вивчена. Наслідки вживання модифікованих продуктів, отриманих з трансгенних рослин і тварин в їжу, наукою ще не дослідженні.

Methods of genetic engineering give the possibility to get new species of organisms which hadn't existed on the Earth formerly. This is an ecological problem, which hasn't been studied yet. Nobody exactly knows the consequences of using modified plants and animals in food.

ПОЧЕРНЯЕВ А.К., ХУ ЯН, АХМАТ К. КИВАН, ПОЧЕРНЯЕВА К.К.

*Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина,
Украина, 61077, Харьков, пл. Свободы,4, e-mail: pochernyaev.ak84@mail.ru*

СТРУКТУРА ЦЕНТРАЛЬНОУКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПО SNP Q223R ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЛЕПТИНА *lepr*

Исследование популяционной структуры локального населения имеет не только теоретическое значение: данные о распределении генетических вариантов могут служить базой для поиска маркёров наследственной предрасположенности к развитию патологических состояний. Одной из наиболее тяжёлых проблем для многих цивилизованных стран является высокая частота ожирения [1]. Как и большинство сложных признаков, ожирение зависит от наследственных факторов и факторов внешней среды, важнейшим из которых является объём потребляемой пищи [2,3]. Началом сигнально-

го пути, ответственного за регуляцию количества потребляемой пищи, является гормон лептин. Он вырабатывается жировой тканью, проходит через гематоэнцефалический барьер путём специфического связывания гормона с рецептором и последующим переносом образовавшегося комплекса в мозг с участием растворимой формы рецептора, которая выполняет роль транспортёра гормона. В гипоталамусе лептин включает выработку меланокортина, который снижает потребление пищи. В качестве кандидатных генов патологического ожирения рассматривают до 118 генов [4]. В развитии ожирения могут оказать определённые полиморфизмы всех генов кодирующие белки лептин-меланокортинового пути: лептина (*LEP*), рецептора лептина (*LEPR*), рецептора меланокортина 4 (*MC4R*), адипонектина (*ADIPOQ*) [5] и липопротеин липазу (*LPL*) [6]. Из этих белковых факторов лептин и его рецептор играют ключевую роль. Рецепторы лептина присутствуют не только в гипоталамусе. Они обнаружены в жировой ткани, скелетной мускулатуре, в печени, поджелудочной и предстательной железе, яичниках, плаценте, почках, лёгких. Однонуклеотидный полиморфизм в 223 триплексе гене рецептора лептина *Gln223Arg* (*Q223R*) приводит к аминокислотной замене и, как следствие, к изменению функциональных особенностей рецептора.

Число людей с ожирением и сопутствующими эндокринными и сердечно-сосудистыми болезнями в Украине, как и во всём мире, растёт. Поэтому исследование генетических вариантов, ассоциация которых с этими патологическими состояниями доказана, актуальна и своевременна. Целью исследования было изучить распределение однонуклеотидного полиморфизма *Q223R* гена *lepr* среди населения Полтавской области.

Материалы и методы

Исследованы образцы букального эпителия случайной группы 50 не состоящих в родстве людей – украинцев и русских, жителей г. Полтавы и области. Забор образцов произведён в 2007-2009 гг. Генотипирование образцов проведено в лаборатории генетики Института свиноводства НААН Украины. ДНК выделена с помощью ионообменной смолы Челекс-100. Идентификацию однонуклеотидного полиморфизма *Q223R* гена рецептора лептина *lepr* осуществляли с использованием метода ПЦР-ПДРФ [7]. Амплификацию фрагмента гена *lepr* проводили с помощью полимеразной цепной реакции на программируемом термоциклере “Терцик” фирмы ДНК-технология (Россия). Для амплификации были использованы праймеры LEPR223F: aaactcaacgacactctcctt и LEPR223R: tgaactgacattagaggtgac синтезированные «Metabion International AG» (Германия). Рестрикцию продуктов амплификации для идентификации однонуклеотидного полиморфизма *Q223R* гена рецептора лептина *lepr* осуществляли эндонуклеазами *Msp* I «Fermentas» (Литва) согласно рекомендации изготовителя. В качестве маркера молекулярной массы была использована ДНК *pUC19*, гидролизованная эндонуклеазой *Msp* I «Fermentas» (Литва). Разделение фраг-

ментов ДНК после рестрикции проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле. Визуализацию проводили окрашиванием бромистым этидием с последующим документированием на цифровую камеру. Проверку гипотезы о равенстве фактических и теоретического рядов проводили с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05. Расчёты выполнены с использованием программы GENALEX 6 [8].

Результаты и обсуждение

Электрофореграмма продуктов рестрикции амплифицированных в ПЦР фрагментов гена *lepr* (рис. 1) даёт представление о генотипах.

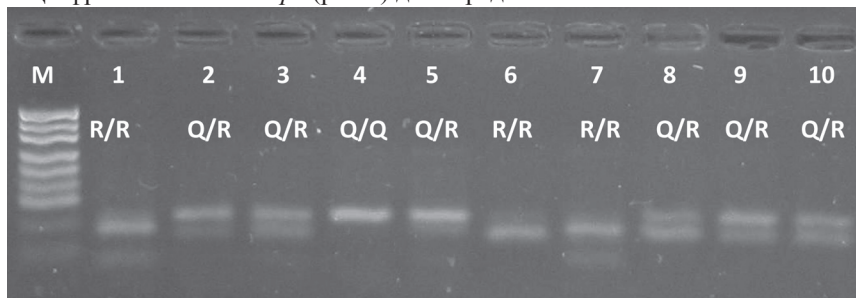


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции амплифицированных в ПЦР фрагментов гена *lepr* (M – маркер ДНК *pUC19*, гидролизованная эндонуклеазой *Msp* I; 1-10 – ДНК доноров).

Таблица 1

Результаты генотипирования SNP *Q233R* гена рецептора лептина *lepr*

Группа	Генотипы			Частоты аллелей (p_Q, p_R)
	<i>QQ</i>	<i>QR</i>	<i>RR</i>	
Мужчины	15	4	6	$p_Q = 0,68; p_R = 0,32$
Женщины	12	5	8	$p_Q = 0,58; p_R = 0,42$
Всего	27	9	14	$p_Q = 0,63; p_R = 0,37$
Теоретически	19,8	23,4	6,8	$\chi^2=19,1; \chi^2_{0,001}=13,8; p<0,001$

Распределение генотипов у мужчин и женщин представлено в табл. 1. Различия в частоте аллелей у мужчин и женщин оказались статистически не значимыми, поэтому данные объединили в общую группу. Мажорным аллелем в изученном населении является *Q* с частотой 0,63. Распределение генотипов в населении не соответствует равновесию Харди-Вайнберга, популяция отклоняется от панмиксного состояния к избытку гомозигот. Удельный вес гомозигот *QQ* превышает теоретически ожидаемое в 1,4 раза, а гомозигот *RR* – в 2,1 раза. Соответственно число гетерозигот составляет 40% от теоретически ожидаемого. Полученные данные послужат основой для создания базы, которая будет использована для поиска маркёров пред-

расположенности к заболеваниям, предиктором которых является ожирение. Что касается теоретического значения результатов, то они дают материал для анализа таких популяционно-генетических явлений, как отбор, инбридинг, дрейф генов. Однако окончательное заключение относительно структуры генофонда изученного населения будет сделано после сбора более обширной информации.

Авторы выражают благодарность проф. Л.А.Атраментовой за помощь в анализе данных и обсуждении результатов.

Выводы

Частоты аллелей гена в славянском населении Полтавской области составляют 0,63 и 0,37, значительно не различаясь у мужчин и женщин.

Популяционная структура населения отклоняется от равновесия Харди-Вайнберга к избытку гомозигот.

Литература

1. *Kopelman P.G.* Obesity as a medical problem // *Nature*. – 2000. – V.404. – P.635-643.

2. *Stunkard A.J., Harris J.R., Pedersen N.L., McClearn G.E.* The body-mass index of twins who have been reared apart // 1990. – *N. Engl. J. Med.* – V.322. – P.1483–1487.

3. *Maes H.H., Neale M.C., Eaves L.J.* Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity // *Behav. Genet.* – 1997. – V.27. – P.325–351

4. *Stephen O’Rahilly, I. Sadaf Farooqi, Giles S. H. Yeo and Benjamin G. Challis.* Minireview: Human Obesity—Lessons from Monogenic Disorders // *Endocrinology*. – 2003. Vol. 144. – No. 9. P.3757-3764.

5. *Jiao H, Kaaman M, Dungen E, Kere J, Arner P, Dahlman I.* Association analysis of positional obesity candidate genes based on integrated data from transcriptomics and linkage analysis // *Int. J. Obes. (Lond)*. – 2008. – V.32. – P. 816-825.

6. *Chagnon Y.C., Wilmore J.H., Borecki I.B., Gagnon J., Pérusse L., Chagnon M., et al.* Associations between the leptin receptor gene and adiposity in middle-aged Caucasian males from the HERITAGE family study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005. – V. 85 –P.29-34.

7. *Gotoda T., Manning B.S., Goldstone A.P., Imrie H., Evans A.L., Strosberg A.D., McKeigue P.M., Scott J., Aitman T.J.* Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population // *Human Molecular Genetics*. – 1997. – V. 6. – P.869-876.

8. *Peakall, R. and Smouse P.E.* (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – V.6. –P. 288-295.

Резюме

Частоты аллелей однонуклеотидного полиморфизма (SNP Q233R) гена рецептора лептина *lepr* в населении Полтавы составляют 0,63 и 0,37. В популяции наблюдается избыток гомозигот (*QQ*) превышает теоретически ожидаемое в 1,4 раза, *RR* – в 2,1 раза) и недостаток гетерозигот (40% от теоретически ожидаемого).

Частоти алелів однонуклеотидного поліморфізму (SNP Q233R) гена лептину *lepr* серед населення Полтави складають 0,63 та 0,37. В популяції спостерігається надлишок гомозигот гомозигот (генотип *QQ* перебільшує теоретично очікуване у

1,4 рази, генотип RR – у 2,1 рази) та дефіцит гетерозигот (40% від теоретично очікуваного).

Allele frequencies of single nucleotide polymorphism (SNP Q233R) of a leptin receptor gene *lepr* in the population of Poltava are 0,63 and 0,37. The excess of homozygotes (QQ exceeds theoretically expected in 1,4 times, RR - in 2,1 times) and a deficiency of heterozygotes (40 % from theoretically expected) are observed in population.

РУДЕНКО Є.Є., ГЕРАЩЕНКО Г.В., ГОРДІНОК В.В., КОНДРАТОВ А.Г., КАШУБА В.І.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України

Україна, 03680, Київ, вул. академіка Заболотного, 150, e-mail: Rudenko_Jene@ukr.net

PPM1M ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ГЕН СУПРЕСОР РОСТУ ПУХЛИН У СВІТЛОКЛІТИННИХ КАРЦИНОМАХ НИРОК ЛЮДИНИ

Рак нирок є злоякісним захворюванням, що розвивається переважно з вистилки каналців і має епітеліальне походження. Світлоклітинний рак нирок складає 70-80% від усіх випадків злоякісних новоутворень нирок. Пухлини нирок характеризуються хіміо- і радіорезистентністю та мають значний метастатичний потенціал. На сьогодні основним і єдиним ефективним лікуванням є хірургічне втручання, яке проводять навіть при наявності одиничних метастазів у інші органи. [1]

Відомо, що гени-супресори пухлинного росту є важливою ланкою регуляції розвитку злоякісних новоутворень і суттєво впливають на швидкість прогресування хвороби. [2] Раніше було отримано та проаналізовано дані NotI-мікрочіпів для більш ніж 181 локусів/генів хромосоми 3 людини у пухлинах нирок. Згідно з даними NotI-мікрочіпів, було виявлено зміни (делеції/метилування) у 15 генах/локусах більш ніж 30%. Один з них - локус, асоційований з промоторною зоною гену *PPM1M* (protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent, 1M) показав зміни у 38.46% зразків. Встановлено, що фосфатази грають важливу роль у регулюванні клітинних функцій, в тому числі, регуляції клітинного циклу [3] та потенційно є генами супресорами росту пухлин [4], тому в процесі канцерогенезу для них характерне зниження експресії. Участь *PPM1M* у канцерогенезі не відома. Дана робота присвячена детальному вивченню профілю експресії *PPM1M* у світлоклітинних карциномах нирок.

Матеріали і методи

Зразки тканин. Хірургічно видалені заморожені пухлини і оточуючі пухлину нормальні тканини були одержані у Київському Національному Урологічному Центрі (Київ, Україна). Пухлини були класифіковані згідно з WHO критеріями по TNM класифікації. В цій серії були 10 світлоклітинних карцином нирок 1-4 стадії. Вік пацієнтів варіював від 46 до 69 років, в се-

редньому $56,2 \pm 8.04$, зі співвідношенням чоловіків і жінок 2:3 відповідно. Всі зразки були отримані згідно вимог Комітету з питань Етики.

Виділення ДНК та РНК. Зразки ДНК були виділені GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas). Загальна РНК була виділена з заморожених пухлин і умовно нормальних навколорухлинних тканин за допомогою E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek, Inc), згідно з протоколом виробника. З кожного зразка РНК була отримана кДНК за допомогою набору RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas), згідно протоколу виробника.

NotI-мікрочіпи. Мікрочіпи та проби для гібридизації було виготовлено як вказувалося раніше [6,7].

Визначення відносної експресії. Відносний рівень експресії *PPM1M* було визначено за допомогою Real Time PCR на IQ5 Cycler (BioRad) з Master mix SYBR Green (Fermentas) згідно протоколу виробника. В якості референсного гену використовували *TBP* [8]. Кожний зразок аналізували в триплетах у двох незалежних сетах вимірювання. Кількісний аналіз проведено за допомогою Bio-Rad iQ5 програмного забезпечення.

Експресію гена *PPM1M* оцінювали по 2- $\Delta\Delta C_P$ методу відносного визначення кількості [9].

Статистичний аналіз. Всі статистичні процедури виконувалися, використовуючи програмне забезпечення BioStat [10]. Непараметричний тест Вілкоксона був використаний, щоб порівняти відносну експресію мРНК *PPM1M* у пухлині та умовній нормі для одного й того ж зразка. Непараметричні тести Крушкала-Веліса та Мана-Уїтні були використані для перевірки відмінностей у рівнях відносної експресії між зразками пухлин та умовно нормальними тканинами з P -values < 0.05.

Метил специфічна PCR. Бісульфитну обробку ДНК було зроблено за допомогою EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research Corporation, USA). Для метил специфічної PCR були використані дві пари праймерів: для метильованої і не метильованої матриці.

Результати та обговорення

Щоб підтвердити дані NotI-мікрочіпів (Рис.1) було проведено дослідження експресії гену *PPM1M* за допомогою методики відносної кількісної Real Time PCR.



Рис. 1. Дані NotI-мікрочіпів.

Для даного дослідження були використані РНК з 10 зразків світлоклітинної карциноми нирок і відповідних їм умовно нормальних тканин. До-

сліджені зразки були згруповані по стадіям розвитку пухлин і розташовані в порядку зростання атипії.(Рис.2).

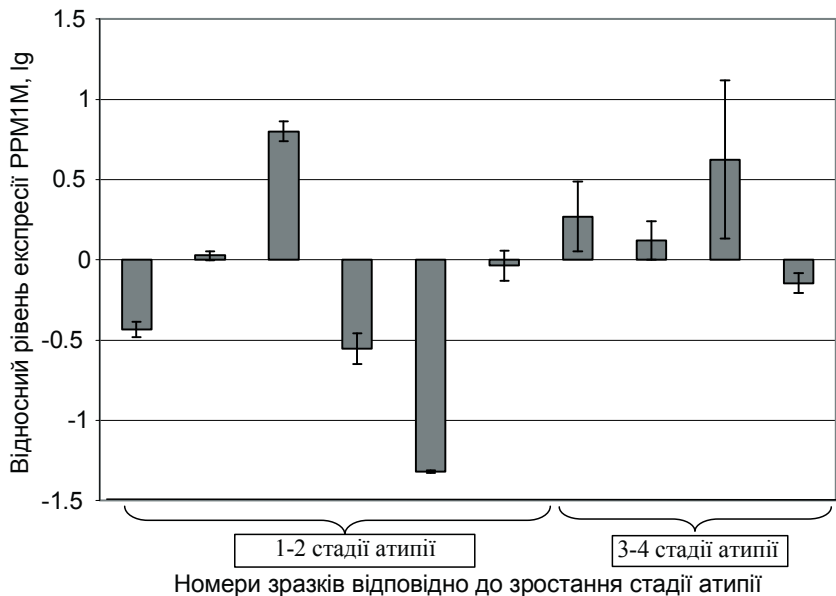


Рис. 2. Відносна експресія гена *PPM1M* (10 зразків) у світлоклітинних карциномах нирок.

Таблиця

Експресія гена *PPM1M* в світло клітинних карциномах людини.

№ зразка	TNM класифікація	Стать	Вік	R, рівень експресії
65	T2N0M0	Ж	49	0,37(0,28-0,45)
26	T2N0M0	Ж	57	1,06(1,11-1,01)
43	T2N0M0	Ж	69	6,30(6,41-6,19)
56	T2N0M0	Ж	50	0,28 (0,11-0,45)
32	T2N0M0	Ч	55	0,05(0,03-0,06)
5	T3N0M0	Ж	66	0,92(1,08-0,76)
12	T2N0M0	Ч	46	1,86(1,48-2,23)
14	T3N0M0	Ч	51	1,32 (1,53-1,11)
21	T2N1M1	Ч	58	4,2(3,30-5,00)
6	T3N0M0	Ж	61	0,71(0,61-0,82)

Згідно з даними діаграми, зниження експресії спостерігається в 4 зразках з 10 досліджених. При чому 3 з них на ранніх стадіях атипії. В таблиці

ці наведені клінічні дані і результати статистичної обробки результатів відносної експресії (R) гена *PPM1M*.

Методом метил специфічної PCR зразків ДНК світлоклітинних карцином було перевірено наявність метилування промоторного регіону гена *PPM1M*. Кореляції зі зниженням експресії виявлено не було (дані не наведені).

Продукт гена *PPM1M* локалізований переважно в ядрі і має консервативні фосфатазні домени, що дає можливість припускати, що *PPM1M* дефосфорилує специфічні субстрати в ядрі. На даний час точна фізіологічна роль даної фосфатази не відома [11].

Висновки

Дане дослідження підтверджує дані NotI-мікрочіпів, згідно з якими зміни спостерігалися у 38.46% зразків світлоклітинних карцином нирок людини. При аналізі рівня відносної експресії за допомогою Real Time PCR зниження експресії спостерігалось у 4 зразках з 10, при чому у 3 з цих зразків достовірне зниження ($P < 0.05$). Перевірка наявності метилування у промоторній області гена *PPM1M* методом метил специфічної PCR кореляції зі зниженням експресії не виявила. Відсутність кореляції між результатами експресії та метилування свідчить про те, що зміни експресії гена *PPM1M* у світлоклітинних карциномах нирок можуть відбуватися за іншим механізмом.

Література

1. *Bhat S.* Role of surgery in advanced/metastatic renal cell carcinoma// *Indian J Urol.*-2010.- №2.- P.167-176.
2. *Ayerbes V., Gallego A., Prado D. et al.* Origin of renal cell carcinomas//*Clin Transl Oncol.*-2008.- №11.- P.697-712.
3. *Скрипкіна І.Я., Каиуба В.І., Гордіюк В.В. та ін.* Ідентифікація змін у локусах генів, які потенційно задіяні в розвитку раку нирок, за допомогою нової технології NotI-мікрочіпів// *Доповіді Національної академії наук України.* - 2006. - №11. - С. 188-192.
4. *Зинченко В.П., Долгачева Л.П.* Внутриклеточная сигнализация. Пушино, 2003.- 84с.
5. *Kashuba V.I., Li J., Wang F. et al.* RBSP3 (HYA22) is a tumor suppressor gene implicated in major epithelial malignancies// *Proc Natl Acad Sci U S A.*- 2004.- vol. 101, №14.- P.4906-4911.
6. *Pavlova T.V., Kashuba V.I., Muravenko O.V. et al.* Technology of analysis of epigenetic and structural changes of epithelial tumors genome with NotI-microarrays by the example of human chromosome // *Mol Biol (Mosk).*- 2009.- vol. 43, №2.- P.339-347.
7. *Kashuba V. I., Skrypkins I. Ya., Saraev D. V. et al.* Identification of changes in gene loci potentially associated with cervical cancer using NotI microarrays // *Ukr. Biochem. J.*- 2006, №2.- P. 5-12.
8. *Jung M, Ramankulov A, Roigas J, et al.* In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR // *BMC Mol Biol.*- 2007.- №8.- P.47.

9. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.*- 2001.- vol. 29, №9.- P.2002-2007.

10. Senchenko V.N., Anedchenko E.A., Kondratieva T.T. et al. Simultaneous down-regulation of tumor suppressor genes RBSP3/CTDSPL, NPRL2/G21 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer // *BMC Cancer.*- 2010.- №10.- P.75.

11. Komaki K., Katsura K., Ohnishi M. et al. Molecular cloning of PP2C η , a novel member of the protein phosphatase 2C family // *Biochim Biophys Acta.* – 2003.- vol. 1630, №2-3. – P.130-137.

Резюме

Відповідно до результатів NotI-мікрочіпів ген *PPM1M* має значний відсоток генетичних/епігенетичних змін у світло клітинних карциномах нирок людини. Продукт цього гену є фосфатазою з ядерною локалізацією, який може відігравати важливу роль у регуляції процесів росту і поділу клітин. Виявлено зниження рівня відносної експресії у 4 з 10 зразків. Отримані результати відносної експресії підтвердили дані NotI мікрочіпів.

В соответствии с результатами NotI -микрочипов ген *PPM1M* имеет значительный процент генетических/эпигенетических изменений в светлоклеточных карциномах почек человека. Продукт этого гена является фосфатазой с ядерной локализацией, который может играть важную роль в регуляции процессов роста и деления клеток. Обнаружено снижение уровня относительной экспрессии в 4 из 10 образцов. Полученные результаты относительной экспрессии подтвердили данные NotI-микрочипов.

In accordance with the results of the NotI -microarray *PPM1M* gene has a considerable percent of genetic/epigenetic changes in renal cell carcinomas in human. A product of this gene is phosphatase with nuclear localization, which can play an important role in cell growth and division. We detected decreasing of level of relative expression in 4 from 10 samples. The obtained results of relative expression confirmed information of NotI -microarray.

ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В., СОСНІНА К.О., ГЕЛЬНЕР Н.В.

ДУ «Інститут шадкової патології АМН України»

Львів, вул.М.Лусенка 31а, e-mail:oresta.terp@gmail.com

ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ HLA-АНТИГЕНІВ ТА АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ HLA-ГЕНІВ У ПОДРУЖНІХ ПАР З РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ ЗАХІДНОУКРАЇНСЬКОГО РЕГІОНУ

Участь у процесах репродукції є однією з важливих фізіологічних функцій головного комплексу гістосумісності (МНС - Major Histocompatibility Complex), який у людини ще називається HLA-системою (Human Leukocyte A-system) [3,10]. Роботи, присвячені вивченню ролі антигенів HLA у виникненні патології вагітності, почали проводитися з 70-х років минулого століття. Встановлено, що у жінок з невиношуванням вагітності частіше, ніж у вагітних з фізіологічним плином гестації зустрічалися на-

ступні HLA – антигени: A3, A23, A29, A9, A1, B12, B52, B7, DR7, DR3, а підвищення числа збігів подружжя за антигенами HLA було виявлено у подружніх пар з навиковим невиношуванням вагітності [34]. Зокрема показано, що при невиношуванні вагітності сумісність за антигенами HLA чоловіка і дружини зустрічається в 6,3 рази частіше, ніж при нормальній вагітності [4].

В даний час, завдяки розвитку методів молекулярної генетики, є реальна можливість проводити HLA-типування на рівні генів (генотипування). Комплекс генів HLA-системи розташований на короткому плечі 6 хромосоми, займає 3500 kb та містить більше, ніж 220 генів. Це – одна з найбільш поліморфних структур в геномі. Комбінація алелів дає необмежену кількість антигенних варіантів в популяції, що обумовлює імунологічну індивідуальність організму і забезпечує, в певній мірі, його схильність до того чи іншого захворювання [1,10].

Особливо інтенсивно дослідження з проблеми «HLA і порушення репродуктивного здоров'я» проводяться в останні 20 років [6-9]. Коротко підсумовуючи такого роду дослідження, можна констатувати, що участь головного комплексу гістосумісності у схильності до непліддя розглядається під кутом зору пошуку конкретних генів HLA, причетних до репродуктивних втрат, подібності подружжя по HLA – антигенах, або вивчення модулюючих властивостей HLA – системи в комплексі генної сітки. В Україні дослідження особливостей HLA – системи при репродуктивних втратах людини практично не проводяться. У зв'язку з цим **метою** даної роботи було вивчення особливостей розподілу HLA-антигенів I класу та алельний поліморфізм *HLA-генів* II класу у подружніх пар з репродуктивними втратами західноукраїнського регіону.

Матеріал і методи

Обстежено подружні пари з первинним непліддям (ПН), коли вагітність не наступала жодного разу протягом щонайменше 2-річного сумісного подружнього життя та подружні пари з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ) при 2-3-разовому мимовільному перериванні вагітності до 12 тижнів вагітності в анамнезі, які звернулися у Львівський ММГЦ на консультацію. Всього обстежено 77 подружніх пар (154 індивідів) з ПН, 81 подружню пару з ННВ (162 індивіди), контроль склали 154 індивіди з 2-а і більше здоровими дітьми.

HLA-типування проводили з використанням типуючих сироваток фірми “Гисанс” (м. Санкт-Петербург, РФ), типування проводили по 19 сироватках локусу A та 36 сироватках локусу B HLA-антигенів I класу. Для проведення ПЛР генів II класу *HLA-DRB1* та *HLA-DQA1* локусів головного комплексу гістосумісності використовували набір реагентів «GenPak HLA-DRB1 PCR test» та «GenPakHLA-DQA1 PCR test» (фірма ООО «Лаборатория Изоген», Москва РФ).

Результати та обговорення

Імуногенетичному тестуванню подружніх пар з репродуктивними втратами передувало вивчення розподілу HLA-антигенів у контрольній групі. Всього обстежено 154 індивіди західноукраїнського регіону без обтяженого акушерсько-гінекологічного анамнезу, в яких є здорові діти. Результати досліджень показали, що дана контрольна група характеризується нормальним розподілом HLA-антигенів, про що засвідчили сумарні частоти генів, які становили 0,944 в локусі А та 0,89 в локусі В. Серед антигенів локусу А найчастіше зустрічалися антигени А2 (61%), А10 (35%), А9 (23%), а серед антигенів локусу В – В18 (19%), В8 (15%), В13 (14%), В14 (13%), В27 (13%), В35 (12%), В12 (11%).

При невиношуванні вагітності відзначені підвищені (щодо контрольної групи) частоти антигенів: А2, А10, В8, В38, В14 та В51 і заниженими були антигени: А1, А3, А9, В7, В12, В13, В14, В16. За допомогою критерію Пірсона χ^2 виділені групи антигенів, які володіли позитивною, чи негативною асоціацією з обстеженою групою людей. Встановлено, що в групі з ННВ позитивною асоціацією володіли А10, В38, В41 – антигени, а А9 та В5 володіли у цій групі негативною асоціацією.

Аналізуючи отримані дані можна стверджувати, що обстежувані групи з ННВ та ПН характеризуються певним діапазоном антигенів, і цей діапазон при ПН відрізняється від діапазону при ННВ. В групі ПН до виділених антигенів належать: А19, В7, В13, при цьому позитивною асоціацією володіли А19, В7, а негативною – В13.

В практичному застосуванні дані про МНС-комплекс використовують, зокрема, для передбачення імунних причин непліддя. Для цього визначають наскільки подружжя подібне між собою за HLA-антигенами [2]. Отже, ще одним етапом наших досліджень було встановлення подібних HLA-фенотипів у обстежуваних подружніх пар. Отримані нами результати засвідчили, що ідентичними HLA – антигенами (від 2 до 4) володіли 55% подружніх пар з ННВ та 58% - з ПН проти 16% в контрольній групі.

Наступним етапом роботи було дослідження розподілу та частоти алельних варіантів генів II-го класу HLA-системи, що за даними літератури [4,12] є важливими маркерами репродуктивних втрат у людини. Для проведення дослідження відібрана дослідна група з 61 подружньої пари з ННВ та 45 пар з ПН. Встановлено частоту та розподіл алельних варіантів генів *HLA-DRB1* та *DQA1*.

Генотипування гену II класу *HLA-DRB1* проводили по 21 алельних варіантах. Оцінка результатів проводилася окремо в групах жінок з ННВ та ПН та у відповідних групах чоловіків. Паралельно проведено порівняння між собою дослідних груп з ННВ та ПН з використанням коефіцієнта Пірсона χ^2 , коефіцієнта шансів (OR) та коефіцієнта вірогідності (P). Отримані результати засвідчили, що у групі жінок з ННВ серед досліджуваних алельних варіантів найчастіше з частотою 14,75% зустрічалися *DRB1* *0101-0103

алелі. Ця алельна група була одним з найчастіших також і у жінок з ПН, її частота складала 14,44%. З високою частотою (причому як в групі жінок з ПН так і ННВ) зустрічалися також *1501-1502, *0401-0411, *0301, *1101-1104, *1301-1302 - алелі DRB1-гена. Слід особливо зазначити, що по частоті та особливостях алельного розподілу HLA-DRB1-гена між групами жінок з ПН та ННВ не відзначено вірогідної різниці.

Дослідження частоти та особливостей алельного розподілу HLA-DRB1-гена у чоловіків з досліджуваної групи подружжя з ННВ показало, що з найвищою частотою зустрічалися *0701-0702-алелі, 18,85% чоловіків цієї групи були носіями таких алелів. Далі за частотою слідували *0401-0411*1501-1502*1101-1104-алелі DRB1-гена, їх частота складала 15,57%-, 14,75%-, 13,11%, відповідно. Що до чоловіків з групи сімей з ПН, то в цій групі найчастіше зустрічалися *0101-0103-алелі DRB1-гена, ця алельна група зустрічалася у 12,22% обстежених чоловіків. З частотою 11,11% зустрічалися *0301-0701-0702- та *1101-1104 – алелі DRB1-гена, а 8,89% чоловіків з групи «ПН» були носіями *0401-0411- та *1301-13-алелів. Слід особливо зазначити, що (на відміну від жінок), чоловіки по частоті та особливостях алельного розподілу HLA-DRB1-гена з двох обстежуваних груп відрізнялися між собою. Зокрема, вірогідно значимо вищими показниками відзначена частота *1601-1611-алелів в групі чоловіків з «ПН» у порівнянні з групою чоловіків з «ННВ» ($\chi^2=3,87$, $p<0,05$). І навпаки суттєво вищою ($\chi^2=3,01$) була частота *1401, 1404, 1405-алелів в групі чоловіків з «ННВ» у порівнянні з групою чоловіків з групи з ПН.

Також було встановлено частоту та розподіл алельних варіантів гена HLA-DQA1 у подружніх пар з ННВ та ПН. Генотипування проводили по 8 алельних варіантах. Отримані результати засвідчили, що в обстежуваних групах жінок з найвищою частотою зустрічався алель HLA-DQA1*0501 (30,33% при ННВ та 27,78% при ПН), та *0102 (20,49% при ННВ і 20,00% при ПН). Більше 13% обстежуваних жінок були носіями DQA1*0101-алелю. Високими показниками відзначився також *0301-алель (14,44% при ПН та 11,48% при ННВ). По частоті та особливостях алельного розподілу HLA-DQA1-гена між групами жінок з ПН та ННВ не відзначено вірогідної різниці. Група чоловіків з «ННВ» та «ПН», як і група жінок з репродуктивними невдачами, також відзначалися високими частотами алеля DQA1*0501. Він зустрічався у 35,25% чоловіків з групи подружжя з ННВ та 27,78% чоловіків з «ПН». Наступними за частотою, як і у жінок, були *0102-алель (18,03% при ННВ і 22,22% при ПН) та *0301-алель (11,11% при ПН та 14,75% при ННВ). Високою частотою, на відміну від жінок, відзначений *0201-алель, його частота складала 16,39% та 10%, відповідно при ННВ та ПН. За частотою та особливостями алельного розподілу у HLA-DQA1-гені між групою чоловіків з «ННВ» та «ПН» вірогідної різниці не виявлено.

В продовження вище представлених результатів щодо встановлення подібних HLA-фенотипів у обстежуваних подружніх пар по HLA-антиге-

нах I класу, ще одним розділом наших досліджень було вивчення ступеню гомології за *DRB1* та *DQA1* алелями між обстежуваними подружжями. Отримані нами результати засвідчили, що середньою (на 40-59%) та високою (на 60-100%) гомологією відзначалися 40% пар з ПН та 49% пар з ННВ.

Вище представлені результати співзвучні з окремими літературними даними. Разом з тим, погоджуємося з іншими авторами [5,11], що такого роду дослідження залежать від етнічних особливостей та коректності підбору дослідних груп, що передбачає доцільність продовження такого роду досліджень в українській популяції з подальшим глибоким аналізом отриманих результатів.

Висновки

1. Імуногенетичними маркерами навикового ненавикового невиношування вагітності є HLA-антигени A10, B41 та B38 HLA-системи I-го класу.

2. Імуногенетичними маркерами первинного непліддя є HLA-антигени A19, B7 HLA-системи I-го класу.

3. Передбачаємо, що наявність *1601-1611 та *1401, 1404, 1405-алелів HLA-DRB1 у чоловіків є імуногенетичною передумовою репродуктивних втрат.

4. Наявність спільних HLA-антигенів у подружньої пари та більше ніж 50%-а гомологія за *DRB1* та *DQA1* алелями є прогностично негативним фактором для настання та протікання вагітності.

Література

1. Колчанов Н.А. Генные сети /Н.А.Колчанов, Е.А.Ананько, Ф.А.Колпаков, [и др.] // Молекулярная биология.– 2000.– №5.– С.56-59.

2. Мутовин Г.П. Геномика и протеомика иммунного ответа у человека / Г.П. Мутовин, В.В. Шахтарин, Л.Ф. Марченко, [и др.] // Учебно-методическое пособие для студентов медицинских и биологических специальностей, врачей и биологов. – Москва – 2004.- С.1-11.

3. Chong P.J. Immunology of recurrent spontaneous abortion / P. J. Chong, W. L. Manner, W. T. Ching // The Female patient. – 1995. – Vol. 20. – P. 1-4.

4. Sierra S. Genetics of recurrent pregnancy loss / S. Sierra, M. Stephenson // Semin. Reprod. Med. – 2006. – Vol. 24. – P. 17-24.

5. Speed T.P. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G-possible implications for human reproduction and autoimmune disease/ T.P. Speed, K. Jin K., T.J. Gill // Am.J.Hum.Genet. – 2005. – Vol.56, No 6. – p. 1456-1467.

6. Grzywacz M. Association between HLA-G01018 allele pregnancy complications / M. Grzywacz, B. Gorski, A. Jakubowska [et al.] // J. Reprod. Immunol. – 2003. – Vol. 58, № 2. – P. 162-163.

7. Kovats S. HLA-G expressed in human trophoblast / S. Kovats, E. Main, C. Li-brach // Science. – 2000. – Vol. 248. – P. 220-223.

8. Kruse C. A study of HLA-DR and -DQ alleles in 588 patients and 562 controls confirms that HLA-DRB1*03 is associated with recurrent miscarriage / C. Kruse, R. Steffensen, K. Varming // J. Hum. Reprod. Sci. – 2004. – Vol. 19, №5. – P. 1215-1221.

9. Matsuzaki J. Immunosteroid as a regulator for Th1/Th2 balance: its possible role in autoimmune diseases / J. Matsuzaki, T. Tsuji, I. Imazeki [et al.] // *Autoimmunity*. – 2005. – Vol. 38. – P. 369-375.

10. Robinson J. I MGT/HLA Database-a sequence database for the human major histocompatibility complex / James Robinson, Matthew J. Waller, Peter Parham, [et al.] // *Nucleic Acids Research* – 2007. – Vol.29 – No1 – P.210-213.

11. Takakuwa K. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population / K. Takakuwa, H. Adachi1, I. Hataya // *J. Hum. Reprod. Sci.* – 2003. – Vol. 18, №4. – P. 728-733.

Резюме

Участь у процесах репродукції є однією з важливих фізіологічних функцій HLA-системою (Human Leukocyte A-system). Розглядається вплив HLA-системи на репродуктивні втрати під кутом зору пошуку конкретних HLA-антигенів I класу та генів HLA II класу, подібності подружжя за HLA-антигенами та алейними поліморфізмами *DRB1* та *DQA1-генів*.

Участие в процессах репродукции является одной из важных физиологических функций HLA-системы (Human Leukocyte A-system). Влияние HLA-системы на репродуктивные неудачи рассматривается с точки зрения поиска конкретных HLA-антигенів I класса и генов HLA II класса, сходства супругов по HLA-антигенам и за аллельными полиморфизмами *DRB1* та *DQA1-генов*.

Involvement in reproduction processes is an important physiological function of HLA-system (Human Leukocyte A-system). Influence of HLA-system on reproductive losses is considered from the standpoint of search for specific HLA genes, the similarity of spouses with HLA-antigens and with allele polymorphism *DRB1* and *DQA1*-genes

ТКАЧ І.Р., ГУЛЕЮК Н.Л., БЕЗКОРОВАЙНА Г.М., МІКУЛА М.І., КРУК Ю.А.

ДУ"Інститут спадкової патології АМН України"

Україна, 79000, м. Львів, вул. Лисенка 31а, e-mail: mandarinka2903@rambler.ru

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КАРІОТИПУ В ЧОЛОВІКІВ З ПОРУШЕННЯМИ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ

За останні роки спостерігається неухильне зростання порушень репродукційної функції людини, яке відображається у зростанні кількості подружніх пар з первинним та вторинним непліддям та народженням дітей з вадами розвитку. На даний момент кожна 7-ма пара в загальній популяції страждає непліддям. Серед неплідних пар у 10-20% випадків відхилення у статевій сфері відзначається у обидвох партнерів, а у 40% – тільки у чоловіків. Не вдається встановити причину у половині випадків непліддя чоловічої етіології [1]. В основному воно зумовлене генетичними чинниками: чисельними або структурними аномаліями хромосом або мутаціями у генах, відповідальних за сперматогенез. На стан репродукції впливають також ендокринні, імунні порушення, захворювання загальносоматичного і нервово-психічного характеру, а також локальна патологія - захворювання власне статевих органів [2]. В більшості випадків зниження фертильності є поліетіологічним, що значно ускладнює лікування і погіршує прогноз.

Відомо, що в статевих клітинах людини фіксується висока частота чисельних хромосомних аномалій. Цей показник в сперматозоїдах досягає 1 - 2%, в ооцитах – біля 20% [3]. Тому часто при заплідненні утворюється зигота з аномальним каріотипом. До 95% зачатъ з хромосомними аномаліями елімінується до моменту встановлення вагітності [4]. Приблизно від 15% до 20% вагітностей закінчується спонтанними викиднями, найчастіше у першому триместрі. Вроджені аномалії у ембріонів, що загинули у першому триместрі, у 60-80% зумовлені хромосомними аномаліями [4-6]. Частота анеуплоїдії серед мертвонароджених плодів складає 4%, серед живонароджених – 0,3% [3].

Частота носіїв збалансованих структурних перебудов хромосом в загальній популяції складає приблизно 1:400 або 1:500 новонароджених [7], вона сягає 0,6% серед неплідних пар, 2-3,2% серед чоловіків з різною формою непліддя, та 9,2% фертильних подружніх пар з повторними викиднями [8]. Отже, частота подружніх пар, в яких один з партнерів є носієм збалансованої транслокації, приблизно 1:100-200 [7, 8]. Для таких пар характерний підвищений ризик зачаття дитини з незбалансованим каріотипом внаслідок утворення гамет з частковою моно- чи трисомією. Серед порушень каріотипу фіксують транслокації, інверсії, кількісні аномалії статевих хромосом (гоносом), додаткові маркерні хромосоми [9-11].

Серед чоловіків з різною формою неплідності зміни каріотипу фіксують у 3,08%, причому в групі з первинним непліддям – 4,57%, з вторинним непліддям – 2,51%. При первинному неплідді переважають чисельні зміни гоносом – 71,4%, при вторинному – збалансовані хромосомні перебудови – 80% [3].

Тому каріотипування належить до обов'язкових обстежень подружніх пар з непліддям. Воно проводиться з метою виявлення носіїв регулярних хромосомних та геномних змін, а останнім часом також для вивчення анеуплоїдій в статевих клітинах, зокрема в сперматозоїдах. Це зумовлене тим, що у таких осіб значна частина статевих клітин несе незбалансований хромосомний матеріал [7, 9, 12, 13].

Метою даного дослідження було вивчення цитогенетичних особливостей каріотипу у чоловіків з подружніх пар з різною формою неплідності.

Матеріали і методи

Цитогенетичні дослідження виконували на препаратах метафазних хромосом, отриманих з культури лімфоцитів периферійної крові. Культивування лімфоцитів проводили напівмікрометодом за стандартною методикою [14] з деякими модифікаціями. Зупинку мітозу виконували шляхом додавання 0,5мкг/мл колхіцину на 66-68 год. культивування. З метою отримання якісних середньомітотичних та ранньомітотичних хромосом одночасно з колхіцином вводили бромистий етидій в концентрації 10 мкг/мл.

Препарати витримували до наступного дня в термостаті при +65°C та забарвлювали GTG- або CBG-методами [14, 15]. Стандартно аналізували

по 20-25 метафазних пластин задовільної якості із кількістю 400-550 бендів на гаплоїдний набір.

Результати та обговорення

Обстежили 191 чоловіка з подружніх пар із порушеннями репродукційної функції, зокрема, з первинним непліддям (у подружжя вагітність не наступала протягом року і більше) – 88 осіб, з іншими формами непліддя (в анамнезі - навикове невиношування, завмирання вагітності на ранніх термінах, вторинне непліддя) – 103 особи. У таблиці 1 викладені показники частоти змін каріотипу серед чоловіків із неплідних подружніх пар в абсолютних числах та відсотках.

Таблиця 1

Частота змін каріотипу серед чоловіків із неплідних подружніх пар в абсолютних числах та відсотках

Тип непліддя	Кількість цитогенетичних обстежень	Зміни каріотипу
первинне непліддя	88	8 (9,09%)
інші форми непліддя	103	3 (2,91%)
Разом	191	11 (5,76%)

Отже, відхилення каріотипу зафіксовані в 11 осіб, що становить 5,7%. Цей показник співпадає з результатами інших досліджень [3]. Слід зазначити, що при первинному неплідді хромосомні зміни зустрічаються в 3 рази частіше - 9,09%, ніж при інших формах непліддя - 2,91%.

В таблиці 2 висвітлений спектр чисельних та структурних хромосомних аномалій серед чоловіків із подружніх пар в залежності від типу непліддя.

Таблиця 2

Структура відхилень каріотипу у чоловіків із неплідних подружніх пар

Зміни каріотипу	Кількість випадків
Первинне непліддя	
47,XXY	2
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	2
46,XY,der(1)t(1;7):(1p22.3 or 1p22.1→1q44::7p15.1 or 7p15.2→7pter), der(7)t(1;7)(1pter→1p22.3 or 1p22.1::7p15.1 or 7p15.2→7qter)	1
46,XY,t(2;8)(q21;q22)	1
46,XY,t(3;9)(q27;q22.3)	1
46,XY,t(9;13)(q11;p11)	1
Інші форми непліддя	
46,XY,t(7;10)(p21.2;q26.13)	1
45,XY,der(13;14)(q10;q10)	1
45,XY,der(13;15)(q10;q10)	1

Як видно з таблиці 2, гоносомні анеуплоїдії характерні для первинного непліддя, а збалансовані транслокації, в тому числі й робертсонівські, зустрічаються як при первинному, так і при інших формах непліддя.

Отже, основний внесок у виникнення непліддя „хромосомного” генезу складають чисельні анеуплоїдії статевих хромосом та робертсонівські транслокації – більше 54%. Слід вказати, що випадки гоносомної анеуплоїдії зафіксовані виключно в простій немозаїчній формі. Робертсонівські транслокації у 75% випадків встановлені як der(13;14). Вони становлять більше 36% всіх аномалій каріотипу та більше 44% аутосомних перебудов, виявлених у чоловіків з порушеннями репродукційної функції.

Висновки

Серед чоловіків із неплідних подружніх пар зміни каріотипу встановлені в 5,76%. Основний внесок у виникнення непліддя „хромосомного” генезу вкладають чисельні анеуплоїдії гоносом та робертсонівські транслокації – більше 54%.

Серед чоловіків із подружніх пар із первинним непліддям хромосомні перебудови виявлені у 9,09%. Основну частку складають дисомії по X-хромосомі - 25% та робертсонівські транслокації – 25%.

Частота змін каріотипу серед чоловіків із подружніх пар з іншими формами непліддя є у декілька разів нижчою порівняно з попередньою групою - 2,91%. У цій групі робертсонівські транслокації складають 66,66% від усіх аномалій. Не спостерігали дисомії по X-хромосомі.

Робертсонівські транслокації у 75% випадках зафіксовані як der(13;14). Вони становлять 36,36% від усіх аномалій каріотипу та 44,44% аутосомних перебудов. Це підтверджує тезу про винятковий вплив таких транслокацій на репродукційну функцію чоловіків.

Література

1. *Кравцова О.М.* Вивчення частоти аномалій каріотипу у мужчин в безплідній популяції/ О.М. Кравцова, Л.Г. Шаповаленко, П.Н. Веропотвелян [та ін.] // Матеріали науково-практичної конференції „Актуальні проблеми медичної генетики”. Київ.-2007.-С.73.
2. *Ruiz Merino.* Male sterility and its association with genital disease and environmental factors/ Merino Ruiz M.C, De León Cervantes M.G, García Flores R.F. // Ginecol. Obstet.Mex. -1995.-V.63.-P.427-431.
3. *Hassold T.* To error (meiotically) in human: the genesis of human aneuploidy / T. Hassold, P. Hunt // Nat.Rev.Genet.-2001.- V.2.-P.280-291.
4. *Балахонов А.В.* Ошибки развития / А.В. Балахонов // Ленинград. -Изд-во. Лен.ун-та.-1990.-278с.
5. *Юдина Е.В.* Трисомия 18: анализ 28 случаев пренатальной диагностики / Е.В. Юдина // Пренатальная диагностика – 2002 - Т.1, №1.- С.35-42.
6. *Delhanty J.* The origin of genetic defect in the human and their detection in the preimplantation embryo / J. Delhanty, A. Handyside // Hum.Rep.Update - 1995.- V.1.- P.201-215.

7. Баранов В.С. Цитогенетика эмбрионального развития / В.С. Баранов, Т.В. Кузнецова // Санкт-Петербург. - Из-во Н-Л.-2007.-639с.

8. Munne S. Analysis of chromosome segregation during preimplantation genetic diagnosis in both male and female translocation heterozygotes / S. Munne // Cytogenet Genome Res.-2005.-V.111.-P.305-309.

9. Anton E. Sperm studies in heterozygote inversion carriers:a review. / E. Anton, J. Blanco, J. Egozcue, F. Vidal // Cytogenet.Genom.Res.-2005.-V.111.-P.297-304.

10. Gekas J. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ISCI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men / J. Gekas, F. Thepot, C. Turleau [et al.] // Hum.Reprod.-2001.-V.16.-P.82-90.

11. Mau U. Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counseling prior to intracytoplasmic sperm injection / U. Mau, I. Baskert, P. Kaiser [et al.] // Hum. Reprod.-1997.-V.12.-P.930-937.

12. Anton E. Genetic reproductive risk in inversion carriers. / E. Anton, J. Blanco, J. Egozcue, F. Vidal // Fertil.Steril.-2006b.-V.85.-P.661-666.

13. Brugnon F.Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. / F.Brugnon, E.Van Assche, G.Verheyen [et al.] // Hum.Reprod.-2006.-V.21.-P.685-693.

14. Лівшиць Л.А. Створення та впровадження в медичну практику тест-систем для генної діагностики тяжких спадкових захворювань / Л.А. Лівшиць, В.М. Пампуха, О.А. Ясінська [та ін.] // Наука та інновації.- 2005.-Т1, №3.-С.62-69.

15. Hungerford D.A. Leucocytes culture from smoll inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl / D.A. Hungerford // Stain. Technol.– 1965.– V.40, №6.– P.333–338.

Резюме

Виконали цитогенетичні дослідження у 191 чоловіка із неплідних подружніх пар. Зміни каріотипу встановлені у 5,7% випадків. Основний внесок у виникнення непліддя „хромосомного” генезу вкладають чисельні анеуплоїдії гоносом та робертсонівські транслокації. При первинному неплідді хромосомні зміни зустрічаються в 3 рази частіше, ніж при інших формах непліддя.

Провели цитогенетические исследования у 191 мужчины из бесплодных супружеских пар. Изменения каріотипа выявлены у 5,7% случаев. Основная доля в структуре бесплодия «хромосомного» генеза принадлежит численным анеуплоидиям гоносом и робертсоновским транслокациям. При первичном бесплодии хромосомные изменения встречаются в 3 раза чаще, чем при других формах бесплодия.

Cytogenetic investigations among 191 males from infertile couples have been performed. Karyotype changes were established in 5.7% cases. Numerous aneuploidies of gonosomes and Robertsonian translocations contribute to the development of “chromosomal” genesis infertility. In primary infertility the frequency of chromosomal changes is 3 times higher than in other forms of infertility.

**ПЮТЮННИКОВА А.П., КРАВЧУК І.В., МАЛЮТА О.В., ДИБКОВ М.В.,
МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЄЄВ Г.Д.**

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
Україна, 03680, Київ, вулю Заболотного, 150; e-mail: g.d.telegeev@imbg.org.ua*

РОЛЬ BCR ТА АСОЦІЙОВАНИХ ІЗ НИМ БІЛКІВ У РОЗВИТКУ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Bcr-Abl – гібридний білок, який є продуктом транслокації t(9;22), вважається ключовим фактором злоякісної трансформації у випадку Ph-позитивних лейкоемій. Існування резистентності до традиційних лікарських засобів створює необхідність розробки нових підходів для терапії. Потенційною мішенню для таких розробок може слугувати Bcr фрагмент у складі Bcr-Abl. У нашому дослідженні ми зосередили увагу на PH домені вищезгаданого білка.

Вторинна та третинна структури PH домена білка Bcr на даний момент невідомі. Їхнє вивчення не тільки має фундаментальне значення, але і може служити підґрунтям для розробки нових стратегій терапії Ph-позитивних лейкоемій. Функція білка часто реалізується через взаємодію з іншими білками. Попередньо нами було виявлено ряд білків, потенційних кандидатів по зв'язуванню з PH доменом білка Bcr (серед них кортактин та FBP17), проте факт взаємодії потребує ґрунтовнішого експериментального підтвердження. Для фосфоліпази Cε (PLCε) ця взаємодія була показана [1]. Крім того, було доведено, що коекспресія в культурі клітин білків Bcr/Abl та PLCε веде до зниження рівня останнього. Відомо, що PLCε є одночасно і мішенню, і регулятором малих ГТФаз родини Ras – білків, що є одними із ключових у розвитку Bcr/Abl-залежного лейкомогенезу, а клітини, трансформовані Bcr/Abl, мають надзвичайно високий рівень активної форми Ras [2]. Однак сигнальні механізми всіх цих процесів залишаються невідомими і потребують вивчення.

Метою роботи є: встановлення взаємодії PH домена білка Bcr з кортактином та FBP17, аналіз кореляції між експресією фосфоліпази Cε (PLCε) та наявністю і типом перебудови Bcr/Abl у пацієнтів з мієлопроліферативними захворюваннями (МПЗ), експресія рекомбінантного білка, що відповідає ділянці доменів RA1 та RA2 білка PLCε, а також визначення співвідношення елементів вторинної структури в рекомбінантному білку PH домена.

Матеріали і методи

Рекомбінантний білок PH-домена білка BCR отримували в системі експресії рQE30-PH/E.coli TG1. Генетична конструкція містить фрагмент ДНК, що відповідає повнорозмірному PH домену, який експресується з мінімальною кількістю векторних амінокислот. Проводили афінну очистку білка на Ni-NTA агарозі (Qiagen) в денатуруючих умовах в присутності 8М сечовини. Ренатурацію білка з фракцій елюції проводили діалізом протягом 24 годин проти розчинів (50 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 10% глі-

цери́на, рН 7,0) у співвідношенні об'ємів 1:100 з ступінчатим зниженням концентрації сечовини 6М-4М-2М-1М-0М.

Для визначення співвідношення елементів вторинної структури в рекомбінантному білку РН домену спектри кругового дихроїзму вимірювали на дихрографі Aviv Circular Dichroism Spectrometer, Model 202 (Aviv, Lake-Wood N.J., США) в 50 мМ натрій-фосфатному буфері, рН 7,0; 100 мМ NaCl; при температурі 25 °С в УФ-діапазоні від 200 до 240 нм. Товщина кювети становила 0,1см . Концентрація білку становила 0.3мг/мл. Для проведення аналізу отриманих даних використали програму K2d (<http://www.embl.de/~andrade/k2d/>), яка дає можливість визначати вміст трьох основних типів вторинної структури – а-спіралей, b-тяжів і нерегулярної конформації.

Отримання рекомбінантного білка, що відповідає RA1 та RA2 доменам PLCε. кДНК отримували за стандартним протоколом на матриці тотальної РНК, виділеної з лейкоцитів периферійної крові хворих на різні МПЗ. Рекомбінантну конструкцію створювали за допомогою методів генетичної інженерії (дизайн специфічних олігонуклеотидних праймерів, ПЛР, клонування ампліфікованого фрагмента в вектор експресії, перевірка отриманих конструкцій за допомогою автоматичного секвенсу). Оптимізація експресії рекомбінантного білка здійснювалась шляхом підбору найефективнішої системи для експресії та умов культивування бактерій. Очищення білків здійснювалась на GST сефарозі.

Експресія PLCε визначалась за допомогою олігонуклеотидних праймерів, специфічних до регіону, що кодує RA1 та RA2 (Ras/Rap associating) домену, наявність яких відрізняє PLCε від усіх інших фосфоліпаз родини C. Наявність і тип транскрипта Vsg/Ab1 визначали за допомогою геноспецифічних праймерів.

Трансфекцію клітин еукаріотів проводили згідно [3]. Для експресії білка кортактина використовували ДНК-конструкцію на основі вектора pRK5тус, для білка FBP17 – на основі вектора рJ3Н, а ДНК-последовність, яка кодує РН домен білка Vsg, була заклонована у плазміді рEGFP-С3. Коїмунопреципітацію проводили за стандартним протоколом [4].

Результати та обговорення

Вимірювання спектру кругового дихроїзму рекомбінантного білка РН-домена білка BCR. Отриманий спектр (Рис.1.) характеризується мінімумом в області 208нм. Теоретично така форма спектру характеризує білки класу β, які переважно представлені β-тяжами. Розрахований вміст b-тяжів у структурі ренатурованого рекомбінантного РН-домена становить 39,0 % , вміст а-спіралей – 10,0 % , а вміст нерегулярних конформацій – 51,0% . Для аналізу отриманих результатів ми порівнювали вміст а-спіралей і b-тяжів у білків з визначеною структурою. За допомогою біологічних баз даних UniProt та PDB були відібрані білки, що містять РН домену, а також отримані дані про їх вторинну структуру. За даними рентгеноструктурного або ЯМР аналізу РН домену середній вміст а-спіралей дорівнює 10%, а b-тяжів-

приблизно 37%. Таким чином, дані для РН домену Vcr корелюють з літературними даними для інших РН доменів, структура яких була визначена. Це свідчить про те, що отриманий нами білок має нативну конформацію, що дозволяє використовувати його для подальших експериментів на визначення функціональної активності та досліджень структури.

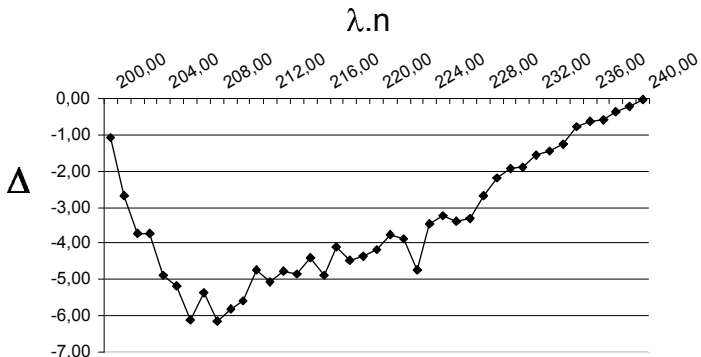


Рис. 1. Спектр кругового дихроїзму РН-домена білка Vcr, скорегований відносно буфера.

Аналіз кореляції між експресією фосфоліпази Cε (PLCε) та наявністю і типом перебудови Vcr/Abl у пацієнтів з МПЗ. Було проаналізовано 12 пацієнтів із різними МПЗ. Результати досліджень показали, що у всіх пацієнтів із проаналізованої групи спостерігалась експресія PLCε (Рис.2а), в той час як наявність p210 Vcr/Abl спостерігалась у 9 пацієнтів. Експресія PLCε в лейкоцитах периферійної крові хворих на МПЗ може бути маркером онкогенної трансформації в процесі розвитку хронічного мієлолейкозу. Подальший аналіз механізмів сигналіngu, до якого залучені як PLCε, так і Vcr/Abl, може стати в нагоді при розробці нових методів лікування Ph-позитивних лейкозів.

На основі вектора pGEX-6P-1 було створено генетичну конструкцію, що несе нуклеотидну послідовність, яка відповідає ділянці RA1 та RA2 доменів білка PLCε. Було проведено експресію та очищення білка – доменів RA, здійснено підбір умов для оптимізації цього процесу (Рис.2б). Отриманий рекомбінантний білок можна використовувати для вивчення його взаємодії із РН доменом білка Vcr/Abl.

Дослідження взаємодії білків кортактина та FBP17 з РН доменом білка Vcr за допомогою котрансфекції з подальшою коїмунопреципітацією. Коїмунопреципітація кортактина та FBP17 з РН доменом не дала підтвердження взаємодії, (Рис.3) , проте цей результат не варто вважати остаточним. У майбутньому планується оцінка взаємодії за допомогою метода far-Western.

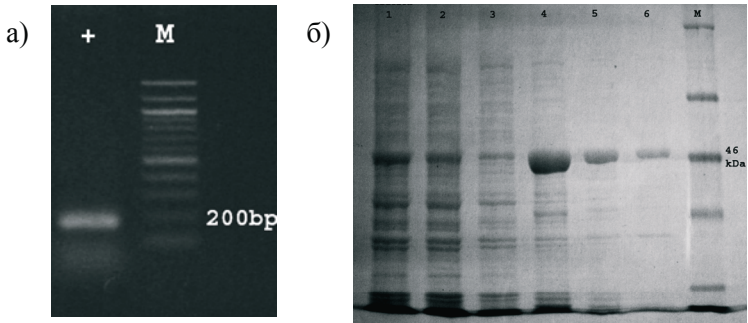


Рис. 2. а) Експресія PLCε (розмір продукту – 174 п.н.) у зразку периферійної крові хворого на МПЗ: + - PLCε, М – ДНК-маркер молекулярної маси; б) Очищення рекомбінантного білка, що відповідає RA1 та RA2 доменам фосфоліпази Сε: 1 – розчинна фракція до очищення, 2 – розчинна фракція після зв’язування з GST сефарозою, 3 – фракція промивки, 4-6 – фракції елюції, М – маркерна су-міш.

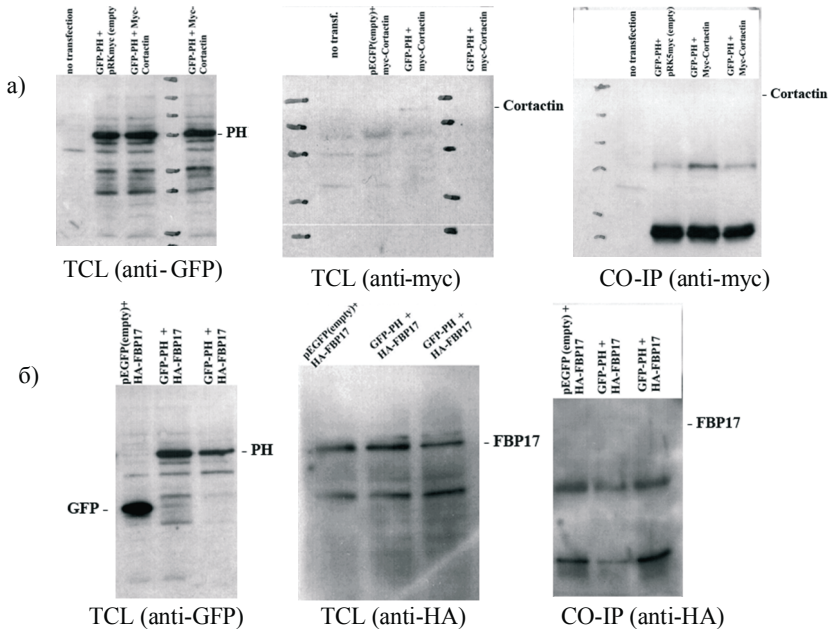


Рис.3. а) Коїмунопреципітація білка кортактина з PH доменом Src. б) Коїмунопреципітація білка FBP17 з PH доменом Src. TCL – загальний лізат клітин, CO-IP – коїмунопреципітація.

Література

1. *Miroshnychenko D., Dubrovska A., Maliuta S., Telegeev G., and Aspenström P.* Novel role of pleckstrin homology domain of the Bcr-Abl protein: Analysis of protein-protein and protein-lipid interactions // *Exp Cell Res.* – 2010. – V.316. – N4. – P.530-542.
2. *Raepple D., von Lintig F., Zemojtel T., Duchniewicz M., Jung A., Lübbert M., Boss G. R. and Scheele J. S.* Determination of Ras-GTP and Ras-GDP in patients with acute myelogenous leukemia (AML), myeloproliferative syndrome (MPS), juvenile myelomonocytic leukemia (JMML), acute lymphocytic leukemia (ALL) and malignant lymphoma: assessment of mutational and indirect activation // *Ann Hematol.* – 2008. – 88. – N4. – P. 319-324.
3. *Chen C., Okayama H.* High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA // *Mol. Cell. Biol.* – 1987. – V.7. – P.2745-2752.
4. *Elion E.A.* Detection of Protein-Protein Interactions by Coprecipitation / *Current Protocols in Protein Science.* – Unit 19.4.

Резюме

Вивчалась структура PH домена білка Bcr методом кругового дихроїзму, а також функція цього домена за допомогою встановлення з'язування з іншими білками та з'язування ролі цієї взаємодії у розвитку мієлопроліферативних захворювань.

Изучалась структура PH домена белка Bcr методом кругового дихроизма, а также функция этого домена с помощью установления связывания с другими белками и определение роли этого взаимодействия в развитии миелопролиферативных заболеваний.

We studied the structure of PH domain of Bcr protein with circular dichroism method, and also the function of this domain via identification of binding to other proteins and verification of role of this interaction in development of myeloproliferative disorders.

УТЕВСКАЯ О.М.¹, ПШЕНИЧНОВ А.С.^{2,3}, БАЛАНОВСКИЙ О.П.^{3,4},
ФРОЛОВА С.А.³, КУЗНЕЦОВА М.А.³, РОМАНОВ А.Г.², ШАНЬКО А.В.³,
ЧУХРЯЕВА М.И.⁵, БАРАНОВА Е.Е.⁴, ТЕУЧЕЖ И.Э.⁶, СХАЛЯХО Р.А.⁶,
ТЫЖНЕНКО Т.В.⁷, ПОЧЕШХОВА Э.А.⁶, ВИЛЛЕМС Р.⁸,
БАЛАНОВСКАЯ Е.В.³, АТРАМЕНТОВА Л.А.¹

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, Украина, 61077,
Харьков, пл. Свободы, 4, e-mail: outevsk@ukr.net

²НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

³Медико-генетический научный центр РАМН, Москва, Россия

⁴Институт общей генетики имени Вавилова РАН, Москва, Россия

⁵Южный Федеральный Университет Ростов-на-Дону, Россия

⁶Адыгейский государственный университет, Майкоп, Россия

⁷ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им.В.Я.Данилевского» Харьков, Украина

⁸Эстонский биоцентр, Тарту, Эстония

ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ И ИСТОРИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ В ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНОФОНДА НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ И ЮГА РОССИИ (АНАЛИЗ ДНК-МАРКЁРОВ)

Территория современной Украины и прилегающих южных областей России издавна была ареной многочисленных миграций и контактной зоной кочевников степи и оседлого земледельческого мира. Украинский и русский народы, ныне населяющие эту территорию, объединены общим происхождением, множеством потоков миграций и длительным взаимодействием с различными по происхождению кочевыми племенами Причерноморских степей. Можно ожидать, что генофонд восточных славян хранит память о многочисленных событиях этногенеза – неолитической волны земледельческого населения, расселения славян, влияния различных групп степных кочевников, взаимодействия с Литвой и Польшей, освоения славянами «Дикого Поля», формирования казаков и др.

Для решения вопросов о происхождении и истории народов всё активнее привлекаются популяционно-генетические методы. Наиболее эффективным инструментом в настоящее время являются однородительские маркёры – передающаяся по материнской линии мтДНК и передающаяся по отцовской линии нерекombинирующая часть Y хромосомы (NRY – non-recombining Y). И NRY, и мтДНК наследуются в виде единого гаплотипа, причём в результате мутационного процесса возникают новые гаплотипы. Передаваясь из поколения в поколение, мутации образуют «родословное дерево» гаплотипов мтДНК и Y хромосомы, отражающее порядок их происхождения друг от друга и позволяющее проследить отдельно материнскую и отцовскую линии в эволюции генофонда. Всё это даёт возможность реконструировать процесс формирования каждой гаплогруппы, определить время и место её образования, а также использовать маркёры мтДНК

и Y хромосомы для прослеживания миграций населения и других событий этнической истории.

Цель данной статьи – представить обобщённые результаты исследования гаплогрупп Y хромосомы и мтДНК среди этнических украинцев и южных русских. Используются ранее опубликованные данные [1, 2], а также новые данные, полученные при выполнении исследований по международному проекту «The Genographic» (www.nationalgeographic.com/genographic). Суммарный объём выборок – более 1500 коренных украинцев и южных русских из 13 областей Украины и юга России.

Yхромосома. Около 90% генофонда Украины и юга России составляют семь основных Y-гаплогрупп: **R1a1a, I2a, R1a1a1g, E1b1b1a, R1b1b2, I1, N1c1**. На долю остальных 26 обнаруженных гаплогрупп (**E1b1a, E1b1b1, G1, G2a, G2a1a, G2a3a, G2a3b1, H, I, I2b1, J1, J1e, J2, J2a4b, J2a4b1, J2b, L2, N1, N1b, O2, O3, Q, R, R1b1b, R2a, T**) суммарно приходится лишь около 10 % генофонда (номенклатура согласно www.isogg.org/tree, 2011).

В украинских и южнорусских популяциях с наибольшей частотой встречается типичная для восточной Европы Y гаплогруппа **R1a1a** (M198). В некоторых популяциях её частота превышает 50% (рис. 1а). Более глубокое субтипирование с использованием нового маркера M458 позволило выделить в пределах **R1a1a** субгаплогруппу **R1a1a1g** (рис. 1б), которая приурочена к славянским (главным образом западнославянским) популяциям и может маркировать относительно недавнее (в генетическом масштабе времени) расселение славян в пределах их современного ареала [3].

Относительно высокие частоты гаплогруппы **I2a** (P37.2) (рис. 1в) отражают связи изученного региона с южноевропейскими балканскими популяциями [4]. Геногеография гаплогруппы **E1b1b1a** (M78) (рис. 1д) указывает на миграции из средиземноморского региона [5], а присутствие гаплогрупп **I1** (M253) и **R1b1b2** (M269) отражает западноевропейское влияние [4,6]. В то же время сравнительно невысокими в населении Украины и юга России оказались частоты гаплогруппы **N1c1** (M178) (рис. 1г), широко распространённой в северорусских популяциях [1].

Очень редки (частоты менее 1%) в изученном регионе варианты гаплогруппы **G**, характерные для народов Кавказа (рис. 1е). И только в популяции терских казаков (Кабардино-Балкария, Россия) обнаружено резкое повышение частоты «кавказских» гаплогрупп, что указывает на ассимиляцию терским казачеством мужского коренного населения Северного Кавказа [7]. И в украинских, и в южнорусских популяциях крайне редко встречаются гаплогруппы **C, Q, L и O**, характерные для монголоидных народов степей Евразии.

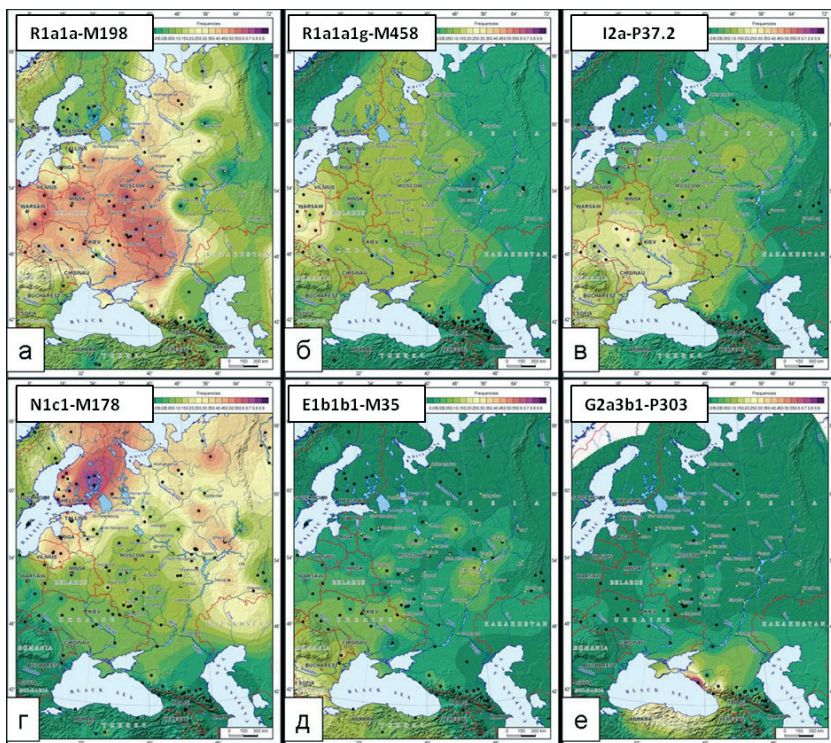


Рис. 1. Карты распространения гаплогрупп Y хромосомы в Восточной Европе: а – R1a1a(M198), б – R1a1a1g(M458), в – I2a(P37.2), г – N1c1(M178), д – E1b1b1(M35), е – G2a3b1(P303).

Карты построены в программе GeneGeo и на основе информации базы данных Y-base (созданы коллективом лаборатории популяционной генетики человека МГНЦ РАМН, www.genofond.ru)

Митохондриальная ДНК. В украинских популяциях наиболее частыми являются гаплогруппы мтДНК **H**, **H1**, **T**, **J1**. Гаплогруппа **H** характерна для западной Евразии, её подгруппа **H1** – для северной части Европы. Гаплогруппы **T** и **J1** чаще всего встречаются в Европе и на Ближнем востоке. Такой спектр гаплогрупп мтДНК характерен для населения всего европейского региона, который в целом отличается высокой гомогенностью митохондриального генофонда. Все восточнославянские популяции демонстрируют большую степень сходства друг с другом, а также с западными славянами, южными славянами и неславянскими народами Балканского полуострова. Для украинцев и южных русских обнаружено наибольшее сходство их митохондриального генофонда с населением более северных

территорий (Польша, Белоруссия), отмечено и некоторое своеобразие западных популяций украинцев [2]. Генетическое сходство украинцев и южных русских с татарами по маркерам мтДНК значительно более выражено, чем по маркерам Y хромосомы [8], что указывает на давние процессы взаимодействия населения восточноевропейского сегмента степей и лесостепей Евразии, а не на последствия татаро-монгольских завоеваний, которые должны были (как все военные походы) отразиться на отцовских линиях Y хромосомы, а не на материнских линиях мтДНК. Карты частот гаплогрупп мтДНК в восточноевропейском регионе представлены на сайте www.genofond.ru.

Литература

1. *Balanovsky O., Rootsi S., Pshenichnov A., Kivisild T., Churnosov M., Evseeva I., Pocheshkhova E., Boldyreva M., Yankovsky N., Balanovska E., Villems R.* Two sources of the Russian patrilineal heritage in their Eurasian context // *Am J Hum Genet.* 2008. – 82. – P.236 – 250.

2. *Балановский О.П., Пшеничнов А.С., Фролова С.А., Васинская О.А., Дибирова Х.Д., Кузнецова М.А., Кошель С.М., Запорожченко В., Чурносов М.И., Атраментова Л.А., Утевская О.М., Тезако О.В., Почешхова Э.А., Микулич А.И., Виллемс Р., Балановская Е.В.* Основные черты митохондриального генофонда восточных славян // *Медицинская генетика.* 2010. – Т. 9. - №1. – С. 29-37.

3. *Underhill PA, Myres N M, Rootsi S, et al. (34 co-authors).* Separating the post-Glacial coancestry of European and Asian Y chromosomes within haplogroup R1a // *Eur. J. Hum. Genet.* 2010. – 18. – P.479-484.

4. *Rootsi S, Magri Ch, Kivisild T, et al. (42 co-authors).* Phylogeography of Y-Chromosome Haplogroup I Reveals Distinct Domains of Prehistoric Gene Flow in Europe // *Am. J. Hum. Genet.* – 2004. – 75. – P.128–137.

5. *Semino O, Magri C, Benuzzi G, et al. (16 co-authors).* Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean are // *Am. J. Hum. Genet.* – 2004. – 74. P.1023-1034.

6. *Myres N.M, Rootsi S, Lin A, et al. (18 co-authors).* A major Y-chromosome haplogroup R1b Holocene era founder effect in Central and Western Europe // *Eur. J. Hum. Genet.* –2010. – P.1–7.

7. *Балановский О.П., Дибирова Х.Д., Романов А.Г., Утевская О.М., Шанько А.В., Баранова Е.Г., Почешхова Э.А.* Взаимодействие генофондов народов Кавказа и восточных славян по данным о полиморфизме Y хромосомы // *Вестник Московского университета. Серия XXIII. Антропология.* – 2011. – № 1. – С. 69–75.

8. *Пшеничнов А.С., Балановский О.П., Утевская О.М., Атраментова Л.А., Кузнецова М.А., Фролова С.А., Дибирова Х.Д., Васинская О.А., Дружинина Е.Г., Захарова Т.А., Баранова Е.Г., Почешхова Э.А., Теучеж И.Э. Схаляхо Р.А., Чурносов М.И., Виллемс Р., Балановская Е.В.* Насколько велико влияние степных и северокавказских народов на украинский генофонд? / *Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков.* Ростов-на-Дону, 15-18 мая 2010 г. - С. 474.

Резюме

Проанализировано распространение гаплогрупп Y хромосомы и мтДНК в населении Украины и юга России. На фоне преобладания восточнославянских гаплогрупп

груп виявлено сходство с населением Балкан, отличия от Русского Севера, сильное отличие от населения Кавказа и монголоидного населения степей Евразии. Сходство с татарами более выражено по мтДНК, чем по Y хромосоме, что указывает на давние процессы взаимодействия населения, а не на последствия татаро-монгольских завоеваний.

Розглянуто розповсюдження гаплогруп Y хромосоми і мтДНК серед населення України і півдня Росії. На тлі переваги східнослов'янських гаплогруп виявлено схожість з населенням Балкан, відміна Російської Півночі, велика різниця з населенням Кавказу і монголоїдним населенням степів Євразії. Схожість з татарами значно більш виражена за мтДНК, ніж за Y хромосомою, що вказує на давні процеси взаємодії населення, а не на наслідки татаро-монгольських завоювань.

The distribution of Y chromosome and mtDNA haplogroups in the populations of Ukraine and south of Russia was analyzed. Against the background of the east Slavonic haplogroups prevalence, it was found the likeness to Balkan populations, difference from Russian North, considerable differences from Caucasus and Mongoloid populations. The more significant likeness to Tatars in mtDNA than in Y chromosome is a consequence of the ancient interaction of populations but not a result of Tatars-Mongol military expansion.

ФЕДОТА А.М.¹, МОВЧАН Н.В.¹, РЫЖКО П.П.², ВОРОНЦОВ В.М.²

¹Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина МОН Украины
Украина, Харьков, 61077, пл. Свободы 4, e-mail:afedota@mail.ru

²Харьковский областной клинический кожно-венерологический диспансер №1 МОЗ
Украины, Украина, Харьков, 61052, ул. К. Маркса 17, e-mail:okkvdl@gmail.com

ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИХТИОЗА В ХАРЬКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Ихтиоз обычный или вульгарный (ichthyosis vulgaris; OMIM 146700), аутосомно-доминантный [2, 5], с пенетрантностью у гетерозигот более 90% [1,4], обусловлен мутациями в гене филаггрина (FLG; OMIM 135940), локализованного в регионе 1q21. У больных и их родственников в Харьковской области обусловлен мутациями 2282del4 и R501X в гене FLG. Обычный ихтиоз встречается в различных популяциях с частотой 1:2500-1:5000 [2]. Фенотипические характеристики вульгарного ихтиоза в первом приближении близки к описаниям фенотипа при X-сцепленном ихтиозе. X-сцепленный рецессивный ихтиоз (X-linked ichthyosis; OMIM 308100) обусловлен дефицитом стероидной сульфатазы вследствие мутации в STS гене (STS; OMIM 300747), локализованном в Xp22.3 или делеции STS гена или участка X-хромосомы [2,3].

Различные формы ихтиоза, как и другие моногенные дерматозы, в первом приближении практически не используются в качестве “сторожевых” или “индикаторных” фенотипов для оценки динамики параметров генетического груза [6,7,8] в силу невысокой распространенности в популяциях, трудностей ее оценки в связи с необходимостью высококвалифицированно-

го подхода при диагностике различных форм этих патологий. Однако авторы данной работы предлагают показать приемлемость генодерматозов, при соблюдении вышеописанных условий, при исследовании факторов популяционной динамики, в данном случае величины инбридинга [9], для оценки степени генетической безопасности населения. Кроме того, поскольку обычный и X-сцепленный ихтиоз являются одними из наиболее распространенных моногенных заболеваний человека, проблемы генодерматозов особенно актуальны в социальном отношении, и они практически не изучены в украинских популяциях, то анализу взаимосвязи распространенности ихтиоза среди населения харьковской области с факторами популяционной динамики посвящена данная работа.

Материалы и методы

В настоящем исследовании использованы материалы экспедиций 2008-2010 гг. из 4 районов Харьковской области: Красноградского, Змиевского, Богодуховского и Волчанского. Для изучения распространенности простого аутосомно-доминантного (OMIM 146700) и X-сцепленного (OMIM 308100) ихтиоза, в результате скрининга населения исследуемых районов Харьковской области, проведен сплошной учет больных, находящихся под наблюдением в ХОККВД №1 и диспансерах области. При накоплении первичной информации динамичные осмотры больных и родственников, анализ генеалогической информации, полученной путем их личного опроса, и молекулярно-генетический анализ мутаций 2282del4 и R501X в гене FLG позволили точно установить все формы исследуемого генодерматоза в исследуемых населенных пунктах области.

Данные о численности населения, площади и количестве населенных пунктов районов были получены в Главном управлении статистики Харьковской области.

Разница в распространенности обычного ихтиоза в разных популяциях оценивалась с помощью ф-преобразования Фишера путём угловой трансформации. Оценка генетической структуры популяций проведена с помощью величин случайного инбридинга F_{st} , рассчитанных на основании коэффициентов миграции [9]. Для оценки линейной связи между значениями распространенности ихтиоза и случайного инбридинга F_{st} рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона и Спирмена. Проверку статистических гипотез осуществляли на уровне значимости не менее 0,03 [10,11].

Результаты и обсуждение

Распространённость ихтиоза в нескольких районах области (таблица 1) составляет от 1:121 (в с. Октябрьское Красноградского района) до 1:21018 (в Волчанске), что в среднем, в том числе и по Харьковской области в целом, составляет 1:3000, что сопоставимо с показателями для других европейских популяций ($p > 0,05$).

Таблица 1

Значения случайного инбридинга Fst и распространенности ихтиоза в городах и селах Харьковской области

Населенный пункт	Численность населения	Значение Fst	Распространенность ихтиоза	Коэффициент корреляции, r±s	
г. Красноград	21431	0,000046	0,00028	N=22 r =0,74 p < 0,000064 (по Пирсону)	
с.Песчанка	5346	0,000213	0,00019		
с.Октябрьское	121	0,003846	0,04800		
с.Владимировка	403	0,001320	0,00250		
с.Лукашовка	164	0,003793	0,01220		
Красногр. р-н	46363	0,000053	0,00024		
г. Змиев	14836	0,000048	0,00020		
с.Зидьки	4701	0,000143	0,00085		
с. Гинеевка	3400	0,000371	0,0003		
п.Комсомольский	15621	0,000046	0,00019		
Змиевской р-н	73400	0,000017	0,00020		r =0,41 p < 0,03 (по Спирмену)
г. Богодухов	21581	0,000035	0,00065		
с.Гуты	1828	0,000384	0,00100		
с.П.Никитовка	964	0,000509	0,00200		
Богодух. р-н	40800	0,000031	0,00039		
Волчанск	21018	0,000052	0,00005		
с. Б.Колодец	4086	0,000254	0,00073		
с.Гонтаровка	667	0,001245	0,00150		
с.Резниково	335	0,002176	0,00300		
с.Рубежное	691	0,000987	0,00145		
с.Юрченково	1078	0,000912	0,00093		
с.Червоноармейское	2508	0,002508	0,00440		
Волчанский р-н	28700	0,000036	0,00024		

Для выявления различий в величинах генетического груза и определения механизма территориального распространения ихтиоза был проведен анализ прямой зависимости отягощенности населения от параметров генетической структуры изученных популяций.

Коэффициент линейной корреляции между распространенностью ихтиоза в селах и городах исследуемых районов и значениями случайного инбридинга Fst, находящихся в пределах от 0,000017 (Змиевской район) до 0,003793, (с. Лукашовка Красноградского района), составил 0,41 ($p < 0,03$)-0,74($p < 0,000064$), что показывает высокую положительную взаимосвязь исследуемых параметров.

Подобные исследования, характеризующие уровень подразделенности изученных популяций, с помощью оценки величины и территориальных различий в распространенности моногенной патологии, представлены для

отдельных российских популяций. Например, для пяти районов Ростовской области коэффициент корреляции между значениями аутосомно-рецессивной наследственной глухоты и случайного инбридинга составил $0,89 \pm 0,10$ [12,13]. Генодерматозы, применяемые авторами в настоящей работе, представлены в подобном свете впервые.

Анализ результатов проведенных исследований позволит разработать меры профилактики угрозы генетической безопасности населения [6-8,14]. Кроме того, выявление и территориальной и этнической приуроченности редких моногенных заболеваний имеет существенное значение для генетического мониторинга и генетического прогнозирования для отдельных семей, что решает проблемы личной генетической безопасности.

Выводы

При решении проблем общей и личной генетической безопасности населения возможными путями снижения частоты наследственной патологии может быть в первую очередь профилактика снижения частоты ассортативных родственных браков, а генодерматозы могут использоваться при оценке факторов популяционной динамики как параметры генетического груза.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность профессору кафедры генетики и цитологии ХНУ имени В. Н. Каразина Л. А. Атраментовой за консультацию и поддержку при выполнении исследования.

Литература

1. *Presland R.B.* Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris / R. B. Presland, D. Boggess, S. P. Lewis et.al. // *J. Invest. Derm.* – 2000. - №115. – p.p. 1072-1081.
2. *Рыжко П.П., Федота А.М., Воронцов В.М.* Генодерматозы: буллезный эпидермолиз, ихтиоз, псориаз. - Харьков: Фолио. - 2004. -334с.
3. *Shapiro L.* Molecular studies of deletions at the human steroid sulfatase locus / L. J. Shapiro, P. Yen, D. Pomerantz [et.al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1989. - №86. P. 8477-8481.
4. *Smith F. J. D.* Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris / F. J. D. Smith, A. D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski [et.al.] // *Nature Genet.* – 2006. - №38.– p.p.337-342.
5. *Суворова К. Н., Антоньев А. А.* Наследственные дерматозы. / К. Н. Суворова, А.А. Антоньев - М.: Медицина, 1977. - 232 с.
6. *Курбатова О.Л.* Этнодемографические процессы и экологическая ситуация в Москве в свете проблемы генетической безопасности населения // *Безопасность России., т. Безопасность и устойчивое развитие крупных городов.* М.: МГФ “Знание”, - 1998, -с.311-335.
7. *Калабушкин Б.А., Курбатова О.Л., Понедоносцева Е. Ю., Климанов А.Е.* Загрязнение окружающей среды и проблема генетической безопасности городского населения // *Доклады III Международной конференции “Экополис-2000: Экология и устойчивое развитие города”.* М.: Изд-во РАМН, - 2000, -с.216-217.
8. *Федота А. М., Козлов А. Н.* Исследование уровня генетической безопасности городского населения // *Цитология и генетика.* - 2005. - т. 39. №4. - с. 41-44.

9. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Под ред. Ю. П. Алтухова. – М.: Наука. - 2004.- 619 с.

10. *Атраментова Л.О., Утевська О.М.* Статистичні методи в біології. – Харків, 2007. – 288с.

11. *Armitage P., Berry G.* Statistical methods in medical research. 3rd ed. – Blackwell Scientific Publications, 1994. – 620p. .

12. *Зинченко П. А., Осипова Е. В., Галкина В.А.* Медико-генетическое изучение населения Республики Удмуртии. Сообщение II. Разнообразие наследственной патологии в четырех районах республики Удмуртии // Медицинская генетика. – 2005. – т. 3. – № 11. – с. 507 -513.

13. *Шокарев Р.А., Амелина С.С., Кривенцова Н.В.* Генетико-эпидемиологическое и молекулярно-генетическое изучение исследование наследственной тугоухости в Ростовской области // Медицинская генетика. – 2005. – т. 4. – № 12. – с. 556 -567.

14. *Ревазов А. А., Парадеева Г. М., Ельчинова Г. И.* Медико-генетическое изучения населения Костромской области // Генетика. - 1988. - т. XXIV, № 11. - с. 2035-2041.

Резюме

Представлены результаты генетико-эпидемиологического исследования ихтиоза в харьковской популяции. Подсчитан коэффициент корреляции ($r=0,41-0,74$) между значениями распространенности ихтиоза и Fst. Показано, что величина и территориальные различия в распространенности патологии обусловлены уровнем подразделенности субпопуляций.

Наведено результати генетико-епідеміологічного дослідження іхтіозу у Харківській області. Підраховано коефіцієнт кореляції ($r=0,57-0,61$) для розповсюдженості іхтіозу та Fst. Показано, що величина та територіальні різниці у розповсюдженості захворювання пов'язані з рівнем підрозділеності субпопуляцій.

Results of genetic-epidemiological study of ichthyosis in Kharkov region are analysed. Correlation coefficient ($r=0,57-0,61$) between the loads of disorder and Fst were calculated. It is shown that the size and territorial distinctions on frequencies of ichthyosis are dependent on level of genetical subdivision of subpopulations.

**ФЕДОТА А.М.¹, СОЛОДЯНКИН А.С.², СОЛОДЯНКИНА Е.А.³,
РЫЖКО П.П.⁴, ВОРОНЦОВ В.М.⁴, РОЩЕНИЮК Л.В.⁴**

*¹Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина МОН Украины
Украина, Харьков, 61077, пл. Свободы 4, e-mail:afedota@mail.ru*

*²ННЦ Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины НААН
Украина, Харьков, 61023, ул. Пушкинская 83, e-mail:alex_solod@mail.ru*

³ЗАО Биолек, Украина, Харьков, 61070, ул. Померки 70, e-mail:alex_solod@mail.ru

*⁴Харьковский областной клинический кожно-венерологический диспансер №1 МОЗ Украины
Украина, Харьков, 61052, ул. К. Маркса 17, e-mail:okkvd1@gmail.com*

ПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ С677Т И А1298С ГЕНА МТНFR У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ

МТНFR (метилентетрагидрофолатредуктаза) играет ключевую роль в метаболизме фолиевой кислоты. Ген метилентетрагидрофолатредуктазы (МТНFR, methylenetetrahydrofolate reductase, 1p36.3, OMIM 607093) расположен в локусе р36.3 длинного плеча 1-й хромосомы. Наиболее изученными SNP гена МТНFR являются однонуклеотидные полиморфизмы С677Т и А1298С. У гомозигот по полиморфному аллелю Т в позиции 677 гена МТНFR отмечается термоллабильность фермента и снижение его активности до 70% от среднего значения, полиморфный вариант С в позиции 1298 в гомозиготном состоянии снижает активность МТНFR до 60%, что приводит не только к нарушению метаболизма фолатов и процессов метилирования в клетке, но и избыточному накоплению гомоцистеина в плазме крови [10,11]. В настоящее время известно, что гипергомоцистеинемия является фактором риска развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, атеросклероза, атеротромбоза, осложнений беременности [12], приводящих к врожденным порокам развития [9], предраковых и раковых состояний колоректальной области [8]. Поскольку комбинации полиморфных вариантов позиций 677 и 1298 гена МТНFR могут приводить к снижению активности фермента и гипергомоцистеинемии в различной степени, представляется актуальным проанализировать распределение этих полиморфизмов у больных псориазом [5], поскольку в мировой литературе для генодерматозов не представлены данные о результатах исследований полиморфизмов генов фолатного обмена, являющихся факторами риска развития нарушений с широким спектром клинических симптомов [2-4].

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы периферической крови 56 больных с различными формами псориаза, находящихся на диспансерном учете в ХОККВД №1. От всех участников исследования или их родственников было получено письменное согласие на участие в данной работе. Выделение ДНК проводилось с помощью наборов для экстракции ДНК Diatom DNA Prep 100 производства фирмы Isogene Lab.Ltd. Для по-

лиморфизма С677Т реакция амплификации проведена с использованием наборов GenPak MTHFR PCR test производства фирмы Isogene Lab.Ltd на термоциклере BIOMRTRA T3000 по стандартной методике производителя. Генотипирование полиморфизма А1298С проводилось методом ПДРФ, с использованием однонуклеотидных праймеров [7] и эндонуклеазы рестрикции MboII. Электрофоретический анализ проведен с помощью наборов для электрофореза производства фирмы АмплиСенс (Москва, Российская Федерация), в 2% и 3% агарозном геле. Маркером молекулярной массы служила ДНК Ladder M50. Примеры электрофореграмм представлены на рис.1,2.

Разница частот генотипов и оценка равенства рядов распределения проведена с помощью критерия χ^2 на уровне значимости 0,05 [1,6].

Результаты и обсуждение

Проведено молекулярно-генетическое исследование полиморфных локусов С677Т и А1298С гена MTHFR у больных псориазом (рис. 1,2).

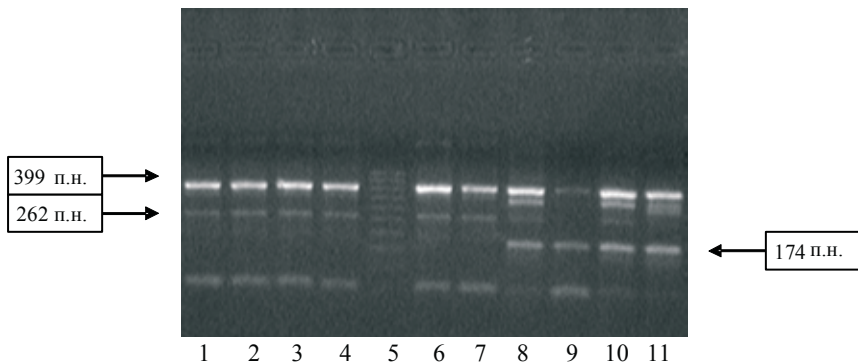


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР специфической последовательности ДНК, генотипированной по SNP полиморфизму С677Т гена MTHFR

Примечание: 1–4, 6–7 – гомозиготы по аллелю С; 5 – маркер молекулярной массы; 8, 10 – гетерозиготы СТ; 9, 11 – гомозиготы по аллелю Т.

При условии, что полиморфные аллели исследуемых позиций внутри одного гена не являются сцепленными, следует ожидать, что анализируемая выборка будет равновесной по всем независимым комбинациям. Однако анализ рядов распределения генотипов больных показал статистически значимую разницу между теоретически ожидаемыми частотами и фактическими (табл. 1).

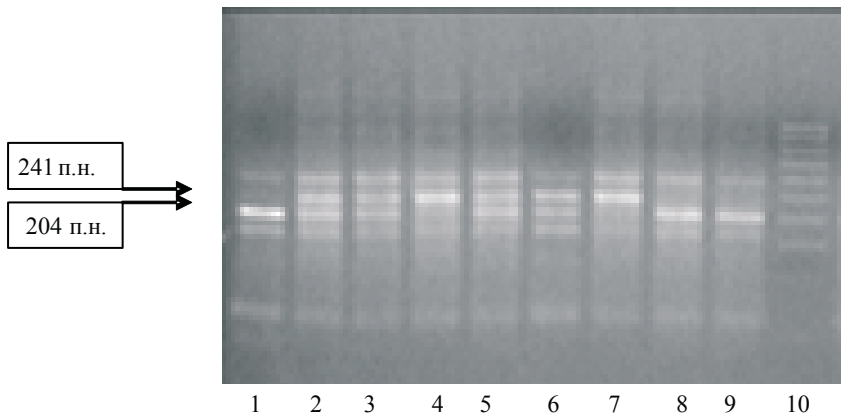


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР (RFLP-PCR) специфической последовательности ДНК, генотипированной по SNP полиморфизму A1298C гена MTHFR

Примечание: 1,8,9 – гомозиготы по аллелю А; 2,3,5,6 – гетерозиготы СТ; 4,7 – гомозиготы по аллелю Т, 10 – маркер молекулярной массы;

Таблица 1.

Частоты генотипов по полиморфизмам С677Т и А1298С гена MTHFR у больных псориазом

Генотип	Частота генотипа	Количество наблюдений		Статистики
		теоретически	фактически	
ТТ СС	0,013	1	0	df=8, χ^2 ст=15,51, $\chi^2\phi=15,61$ p< 0,05
ТТ АС	0,038	2	0	
ТТ АА	0,055	3	6	
СТ СС	0,071	4	2	
СТ АС	0,203	11	16	
СТ АА	0,296	17	14	
СС СС	0,040	2	5	
СС АС	0,115	7	4	
СС АА	0,166	9	9	

Выборка больных псориазом демонстрирует отклонения от равновесия по комбинациям полиморфных аллелей анализируемых позиций. Подобные отклонения от равновесия могут означать, что носители одних генотипов, вероятно, обладают селективным преимуществом, других, например, ТТСС, ТТАС - пониженной адаптивностью и жизнеспособностью, и их отсутствие может быть обусловлено действием отбора, что вполне объяснимо при наличии в гомозиготном состоянии двух полиморфных аллелей, снижающих активность MTHFR. Возможно, отдельные аллели могут

быть сцеплены, что требует дальнейшего анализа гаплотипов у больных псориазом.

Выводы

Анализ рядов распределения частот генотипов по полиморфизмам C677T и A1298C гена MTHFR, являющимися факторами риска развития нарушений с широким спектром клинических симптомов, показал актуальность их исследования у больных псориазом. выдвинутые гипотезы, однако, требуют дальнейших исследований и подтверждения на более обширном материале.

Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность профессору кафедры генетики и цитологии ХНУ имени В. Н. Каразина Л. А. Атраментовой за консультации, заведующему лабораторией молекулярной диагностики ННЦ «ИЭКВМ» А. П. Герилевичу за поддержку при выполнении исследования.

Литература

1. *Атраментова Л.О., Утевська О.М.* Статистичні методи в біології. – Харків, 2007. – 288с.
2. *Генетический паспорт* – основа индивидуальной и предиктивной медицины / Под ред. В.С.Баранова. – СПб: Изд-во Н-Л, 2009. – 528с.
3. *Горovenko Н.Г., Ольхович Н.В., Россоха З.І. та ін.* Вплив поліморфізму C677T гену MTHFR на фолатний статус та рівень гомоцистеїну в сироватці крові у дітей з когнітивними розладами // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. – Київ-Луганськ, 2010. – С. 61–70.
4. *Гречанина Е.Я., Гусар В.А.* Распространенность полиморфизмов C677T MTHFR и A66G MTRR генов системы фолатного цикла в популяциях восточной Украины // Актуальні проблеми акушерства і гінекології, клінічної імунології та медичної генетики. – Київ-Луганськ, 2010. – С. 91–97.
5. *Рыжко П.П., Федота А.М., Воронцов В.М.* Генодерматозы: буллезный эпидермолиз, ихтиоз, псориаз. –Харьков: Фолио, 2004. – 334с.
6. *Armitage P., Berry G.* Statistical methods in medical research. 3rd ed. – Blackwell Scientific Publications, 1994. – 620p. .
7. *Bagheri M., Rad I.A., Omrani M.D. et al.* C677T MTHFR and A1298C Mutations in the Methylentetrahydrofolate Reductase Gene in Patients with Recurrent Abortion from the Iranian Azeri Turkish //In. J. of Fert. And Ster. – 2010. - №3. – P.134-139.
8. *Martin D.N., Boersma B.J., Howe T.M. et al.* Association of MTHFR gene polymorphisms with breast cancer survival BMC // Cancer. – 2006. – №6. – P.257.
9. *Doolin M.-T., Barbaux S., McDonnell M. et al.* Maternal genetic effects, exerted by genes involved in homocysteine remethylation, influence the risk of spina bifida // Am. J. Hum. Genet. – 2002. – №71. – P. 1222–1226.
10. *Ioannidis J.P., Ntzani E.E., Trikalinos T.A.* ‘Racial’ differences in genetic effects for complex diseases // Nat. Genet. – 2004. – №36(12). – P. 1243–1244.
11. *Guttormsen A.B., Ueland P.M., Nesthus I. et al.* Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study // J. Clin. Invest. – 1996. – №98 (9). – P. 2174–2183.

12. Zetterberg H., Regland B., Palmér M. et al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos // Eur. J. Hum. Genet. – 2002. – №10 (10). – P. 578–579.

Резюме

На образцах ДНК 56 больных псориазом исследованы однонуклеотидные полиморфизмы C677T и A1298C гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR). Анализ рядов распределения частот генотипов по полиморфизмам C677T и A1298C гена MTHFR у больных показал статистически значимую разницу между теоретически ожидаемыми частотами и фактическими ($\chi^2\phi=15,61$, $p < 0,05$).

На зразках ДНК 56 хворих на псоріаз досліджено однонуклеотидні поліморфізми C677T та A1298C гена метилентетрагідрофолатредуктази (MTHFR). Аналіз розподілу частот генотипів по поліморфізмам C677T і A1298C гену MTHFR у хворих на псоріаз показав статистично значущу різницю між теоретично очікуваними частотами та фактичними ($\chi^2\phi=15,61$, $p < 0,05$).

DNA samples from 56 psoriasis patients were studied for single nucleotide polymorphisms C677T and A1298C of MTHFR gene. Analysis of distribution of genotype frequencies of genetic variations C677T and A1298C MTHFR in psoriasis patients had demonstrated a break of genetic equilibrium in comparison with respectively theoretical frequencies.

ШАПОШНИК Л.А., ЛЫЛО В.В., ЛУКАШ Л.Л.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
03680, Киев – 680, ул. Акад. Заболотного, 150, e-mail: lukash@imb.org.ua*

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Белки участвуют во всех клеточных процессах. Уровень их экспрессии обусловлен степенью активности кодирующих их генов. Разные типы клеток имеют разный белковый состав, что связано с их строгой специализацией, которая формируется в процессе клеточной дифференцировки. Под воздействием факторов внешней среды происходит изменение уровня экспрессии некоторых белков, продукция других – крайне стабильна. На экспрессию генов влияют изменения самого наследственного материала (мутации, одонитевые разрывы ДНК, гиперметилирование генов и др.), особенно те, которые приводят к онкогенной трансформации клетки. При таких превращениях клетки, в ней происходят различные изменения, в том числе – изменения экспрессии некоторых белков. Они позволяют опухолевым клеткам получать новые свойства, которых не имели их нормальные клетки-предшественники. Изучение биохимической основы этих свойств дает интересные результаты. При исследовании белков у клеточных линий меланомы и карциномы молочной железы были выявлены отличия в спектре протеинов у разных линий [1]. После длительного культивирования линий, их клетки сохраняли этот специфический белковый спектр [2]. Сравнивая состав протеинов нормальных клеток почки и клеток реналь-

ной карциномы, в последних были обнаружены белки TPI-1 и Hsp27, которые могут рассматриваться как онкомаркеры [3]. Также сравнивались спектры протеинов, полученных из клеток нескольких глиомных линий и из мультиформных глиом. Исследования выявили различия в этих спектрах [4]. Для выполнения подобных работ важно выбрать метод, который давал бы возможность выявить такие изменения. Одним из этих методов является электрофорез. Комбинирование различных его видов позволяет очень точно разделять белки и анализировать уровень их экспрессии. Такой способ может помочь создать белковую карту определенного типа клеток [5] или даже отдельных клеточных органелл [6].

Материалы и методы

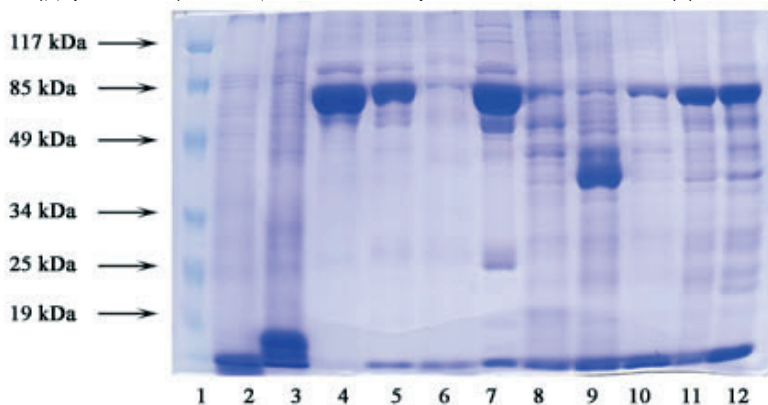
В работе использовались установленные клеточные линии человека Her-2 (рак гортани) и U937 (лейкоз); лейкоциты периферической крови и образцы опухолей больных с миксомами сердца (любезно предоставлены Национальным Институтом сердечно-сосудистой хирургии им. Н. М. Амосова НАМНУ) и со злокачественными глиомами (любезно предоставлены Институтом нейрохирургии им. А. П. Ромоданова НАМНУ). Клетки линий Her-2 и U937 культивировали в стандартной ростовой среде Игла (MEM, Sigma, USA) с 10%-ной эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (Sigma, USA) и антибиотиками. Белковый экстракт из клеток и опухолевой ткани получали по методике, описанной в [7]. Концентрацию общего белка определяли по методу Бредфорда [8]. SDS-электрофорез белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле по методу Лэммли [9], после чего окрашивали гель Coomassie R250 [10].

Результаты и обсуждение

Объем пробы, наносимой в каждую лунку, был рассчитан так, чтобы общее количество белка было одинаково во всех пробах. Однако, как видно из приведенной электрофореграммы, электрофоретические спектры образцов сильно отличаются между собой по количеству полос, их расположению и интенсивности.

Линия Her-2 (дорожка 2) имеет однородный спектр белков и четкую полосу с молекулярной массой в области менее 19 кДа. Линия U937 (дорожка 3) имеет аналогичный спектр с двумя интенсивными полосами в той же области. Электрофоретические спектры миксом сердца двух разных пациентов (дорожки 4 и 5) схожи: несколько тонких полос в области 50-85 кДа, более интенсивная – около 100 кДа, и очень широкая полоса в области 80 кДа. В нижней же части геля полосы вообще не идентифицируются. Эта же особенность характерна и для лейкоцитов периферической крови больного с миксомой (дорожка 6). В спектре этой пробы также отсутствуют низкомолекулярные белки и присутствуют лишь две тонкие полосы – около 80 и 100 кДа. В отличие от предыдущей пробы, спектр белков лейкоцитов больного с глиомой (дорожка 7) имеет совершенно другой вид: преобладают белки в средней части спектра, есть полосы в областях око-

ло 25 кДа, 50 кДа, 100 кДа и очень интенсивная полоса 80 кДа. Злокачественные глиомы одинакового гистологического типа (дорожки 8-12) отличаются друг от друга, хотя есть некоторые общие особенности. Все спектры глиомных образцов имеют достаточно хорошее разрешение, преобладают полосы в средней части (40-80 кДа), но более четко выделяются две из них – в областях 40 и 80 кДа. В спектре первой глиомы (дорожка 8) все полосы однородны по ширине, в то время как во второй глиоме (дорожка 9) полоса около 40 кДа гораздо интенсивнее полосы 80 кДа. У остальных глиом (дорожки 10-12) наоборот – более широкая полоса в области 80 кДа, а третья глиома (дорожка 10) вообще не имеет выраженной полосы 40 кДа.



Электрофореграмма белковых экстрактов, полученных из разных образцов. Дорожки: 1 – маркер; 2 – клеточная линия человека Нер-2; 3 – клеточная линия человека U937; 4 – миксома сердца (1-й пациент); 5 – миксома сердца (2-й пациент); 6 – кровь 3-го пациента с миксомой сердца (3); 7 – кровь пациента с глиомой; 8 – глиома (1-й пациент); 9 – глиома (2-й пациент); 10 – глиома (3-й пациент); 11 – глиома (4-й пациент); 12 – глиома (5-й пациент).

Выводы. Из полученных результатов видно, что опухолевая трансформация меняет биохимические процессы в клетке. При этом меняется не только её морфология, но и качественный и количественный белковый состав. Хотя одинаковые типы опухолей происходят из одного типа клеток, в них могут наблюдаться совершенно разные генетические изменения. Это, в свою очередь, ведет к изменению экспрессии кодируемых такими генами белков, что и выявляется на электрофореграмме.

Литература

1. *Sefior R. E. B.* Electrophoretic analysis of proteins associated with tumor cell invasion // *Electrophoresis.* - 1994. - vol. 15. - P.454-462.
2. *Sefior E. A., Sefior R. E. B., Hendrix M. J. C.* Selection of invasive and metastatic subpopulations from a heterogeneous human melanoma cell line // *BioTechniques.* - 1990. - vol. 9. - P.324-331.

3. Valera V. A., Li-Ning-T E., Walter B. A., Roberts D. D., Linehan W. M., Merino M. J. Protein expression profiling in the spectrum of renal cell carcinomas // Journal of Cancer. - 2010.- vol. 1.- P.184-196.

4. Vogel T. W., Zhuang Z., Li J. et al. Proteins and Protein Pattern Differences between Glioma Cell Lines and Glioblastoma Multiforme.- Clin Cancer Res.- 2005.- vol. 15, № 11.- P.3624.

5. Xu S. J., Li X., Lü L. C., Li X. H. Establishment of protein spectrum of nasopharyngeal carcinoma cell line HNE-1 by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.- 2003.- vol. 23, № 12.-P.1310-1313.

6. Fu Y. R., Yi Z. J., Yan Y. R., Qiu Z. Y. Changes in the protein spectrum of mitochondria isolated from hydroxycamptothecin-treated hepatoma cells // Anticancer Drugs.- 2007.- vol. 18, № 9.- P.1045-1052.

7. Morton E. N., Margison G. P. Increased O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in Chinese hamster V-79 cells following selection with chloroethylating agents // Carcinogenesis.- 1988.-vol. 9.- P.45-49.

8. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding // Anal. Biochem.- 1976.- vol. 72, № 1-2.- P.248-254.

9. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.- 1970.- vol. 227, № 5259.- P.680-685.

10. http://www.molbiol.ru/protocol/17_01.html.

Резюме

Данная работа посвящена изучению особенностей электрофоретических спектров белков, выделенных из установленных клеточных линий человека, лейкоцитов периферической крови и опухолевого материала миксом сердца и злокачественных глиом человека.

Дана робота присвячена вивченню особливостей електрофоретичних спектрів білків, які були виділені зі сталих клітинних ліній людини, лейкоцитів периферичної крові та пухлинного матеріалу міксом серця і злоякісних гліом людини.

This paper studies the particularity of electrophoretic spectra of proteins isolated from the established human cell lines, peripheral blood leukocytes, human myxomas of heart and malignant gliomas tumors.

ШАПОШНИКОВА В.М., КЛИМЕНКО С.В., НЕУМЕРЖИЦКА Л.В.,

БАРИЛЯК І.Р.

*ДУ «Науковий Центр Радіаційної Медицини АМН України»,
Україна, 04050 Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail:*

СТРУКТУРА ВРОДЖЕНОЇ ПАТОЛОГІЇ СЕРЕД НОВОНАРОДЖЕНИХ ЧЕРКАСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Катастрофа на Чорнобильській АЕС, що спричинила за собою різноманітні широкомасштабні соціальні та медичні проблеми класифікується Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ), як одна з глобальних. Населення, яке постраждало внаслідок аварії на ЧАЕС, до сьогоднішнього часу піддається впливу не одного, а цілого ряду пошкоджуючих факторів: це радіаційний фактор у переважній більшості в «малих дозах», хроніч-

не психоемоційне напруження, забруднення навколишнього середовища чинниками нерадіаційної природи. І вже сьогодні, через 25 років від початку Чорнобильської катастрофи, вантаж негативних віддалених наслідків хронічного низькодозового опромінення став проявлятися в репродуктивному здоров'ї. Очевидні й загальновідомі проблеми народження дітей з вродженими вадами розвитку і дитячої смертності, які призводять до значної інвалідизації населення і займають одне з провідних місць в структурі малюкової смертності.

За даними офіційної статистики в Україні щорічно народжуються до 13 тис. дітей з вродженими вадами розвитку і спадковою патологією, її частота близько 30 на 100 народжених живими. За даними МОЗ України генетичні хвороби стабільно займають друге місце в структурі захворюваності дітей першого року життя, а загальна поширеність та їх структура серед новонароджених має виражені регіональні відмінності. Крім того, забруднення навколишнього середовища є причиною виникнення вроджених вад розвитку (ВВР) [1-4].

Виходячи із вищенаведеного, очевидно, що основні зусилля повинні бути спрямовані на попередження народження дітей з вродженими вадами розвитку. Серед таких досліджень важливе місце займає генетичний моніторинг, який визначається як система багатокомпонентного динамічного відстеження частоти і поширеності вроджених та спадкових хвороб, контролю факторів, які можуть становити загрозу для генофонду популяції з одночасною реалізацією заходів, спрямованих на зменшення генетичного вантажу для наступних поколінь.

Важливим питанням для клінічної медицини та організації охорони здоров'я залишається довгострокова оцінка динаміки рівня вродженої та спадкової патології та її структура в популяціях людини.

Метою проведеної роботи було визначення частоти та структури вроджених вад розвитку в Черкаській області.

Матеріали та методи

Проведені інтра регіональні дослідження частоти ВВР в Черкаській області за період 1997-2007 роки. Розрахована структура ВВР серед новонароджених, у тому числі, живонароджених та мертвонароджених. Дослідження здійснено у відповідності з основами Законодавства України про охорону здоров'я (1992 рік, стаття 29) та Цільовою комплексною програмою генетичного моніторингу населення на 1999-2003 роки, затвердженої Указом Президента 09.1998 року. В ході дослідження були використані дані обласної Черкаської медико-генетичної консультації, проаналізована документація пологових будинків. Проведена комплексна оцінка стану здоров'я батьків новонароджених та перебіг вагітностей у жінок даної області, було враховано екстрагенітальну патологію, особливості харчування, виробничі шкідливості, наявність шкідливих звичок у вагітних.

Результати та обговорення

В ході нашого дослідження було виявлено, що середня частота ВВР у Черкаській області за період 1997–2007 роки складає 27,4 випадків на 1000 новонароджених, при середньоукраїнському рівні за той же період - 26,6 на 1000 новонароджених.

У структурі вродженої патології серед новонароджених (живонароджені і мертвнонароджені) переважали такі вади розвитку: вади кістково-м'язевої системи дорівнювали 32,3 % від загальної кількості ВВР, вади нирок і сечостатевої системи - 19,3 %, вади серцево-судинної системи - 17,3 %. Відмічено, що за одинадцятирічний період генетичного моніторингу структура вродженої патології серед новонароджених Черкаської популяції не змінювалась.

Аналіз структури вродженої патології серед живонароджених дітей показав наступне. (Рис.1).

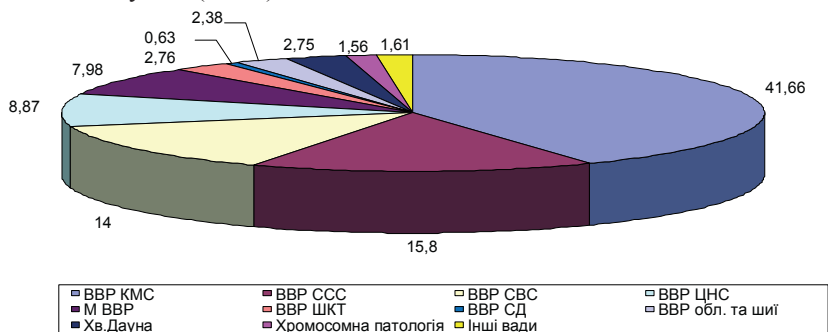


Рис. 1. Структура ВВР серед живонароджених по Черкаській області за період 1997-2007роки

В структурі вродженої патології серед живонароджених немовлят частіше спостерігаються вроджені вади кістково-м'язевої системи (КМС) які дорівнюють 41,66 %, на другому місці - вади серцево-судинної системи (ССС), що складають 15,8 %, третє місце займають вади сечостатевої системи (СВС) і дорівнюють 14,0 %. Інші вади, розташовуються в такому порядку: вади нервової системи (ЦНС) - 8,87 %, множинні вроджені вади розвитку (МВВР) - 7,98 %, вроджені вади системи травлення (ВВР ШКТ) - 2,76 %, хвороба Дауна - 2,75 %, вроджені вади обличчя та шиї - 2,38 %, хромосомна патологія - 1,56 %, вроджені вади системи дихання (ВВР СД) - 0,63%, інші вроджені вади розвитку - 1,56 %. Оцінюючи структуру вродженої патології серед живонароджених за 11 років спостереження, даний показник суттєво не змінювався.

Дослідження структури ВВР серед мертвнонароджених за період 1997-2007 роки відображено на діаграмі. (Рис. 2.) На представлений діаграмі видно, що в структурі вроджених вад серед мертвнонароджених, на відміну від

живонароджених, частка множинних вроджених вад розвитку (МВВР) досить висока і досягає - 37,0 %, друге місце по частоті займають вади нервової системи (ВВР ЦНС) – 28,0 %, третє і четверте місце поділяли вроджені вади сечостатевої системи та патологія передньої черевної стінки – гастрошизис (ВВР СВС) – 8,0 % та (ППЧС) - 8,0 %.

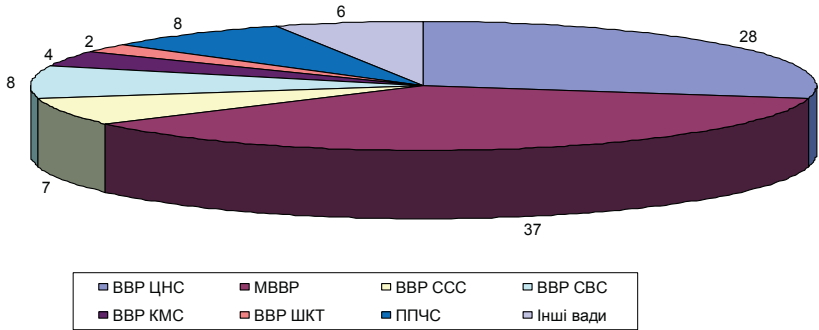


Рис. 2. Структура ВВР серед мертвонароджених Черкаської області за період 1997-2007 роки

Вроджені вади були розподілені за частотою розповсюдження їх в популяції. До групи вад, що зустрічалися найчастіше, тобто 1:1000 новонароджених, були віднесені такі вади розвитку, як вади кістково-м'язевої системи (1 : 90), вади сечостатевої системи (1 : 185), вроджені вади серцево-судинної системи (1 : 244) та синдром Дауна (1 : 714).

До групи рідкісних вад, які зустрічалися менше, ніж 1:10000 увійшли множинні вроджені вади розвитку (1:1334), вади шлунково-кишкового тракту (1 : 1315), вади ЦНС (1:1428), вади розвитку очей, вух, обличчя та шиї (1:1666) та вади системи дихання (1: 4545).

Висновки

Частота вроджених вад розвитку в Черкаській області за період з 1997 по 2007 роки складає 27,4 випадків на 1000 новонароджених, що перевищує середній рівень по Україні (26,6 на 1000).

Серед новонароджених Черкаської області переважали вроджені вади розвитку кістково-м'язевої, сечостатевої, та серцево-судинної системи, що склали відносно 32,3 %, 19,3 % і 17,3 %, від загальної кількості вроджених вад. Дані показники були порівнювальними з середніми по Україні.

Виявлені суттєві відмінності у структурі вродженої патології серед живо- та мертвонароджених дітей Черкаської області: серед живонароджених переважали вади кістково-м'язевої, серцево-судинної та сечостатевої систем, тоді як серед мертвонароджених частіше спостерігалися множинні вади та вади нервової і травної систем.

Література

1. *І.Р. Бариляк* . Моніторинг вроджених вад розвитку в радіактивно забруднених регіонах України //Л.В Неумержицька, В.М Шкарупа, С.В.Клименко та ін. // Проблеми Радіаційної медицини та радіології 36 наук.праць. - 2010, Вип. 15. - С.375-380.
2. Пренатальная диагностика наследственных и врожденных болезней // Под ред. Э.К. Айламазяна, С.В. Баранова.- М.: Триада-Х, 2007.-148с.
3. *Ю.В. Черненко, В.Н. Нечаев*. Диагностика, профилактика и коррекция врожденных пороков развития.// Саратовский научно-медицинский журнал, 2009, том 5, №3. - С.379-383.
4. *Wladimir Wertelecki*. Malformations in a Chernobyl-Impacted Region. PEDIATRICS Vol. 125 No. 4 April 2010. - P. 836-843.

Резюме

Представлены результаты мониторинга частоты врожденных пороков развития в Черкасской области за период с 1997 по 2007 год. Дан спектр врожденных пороков развития среди всех новорожденных, живорожденных и мертворожденных. Выявлено, что частота пороков развития в области за данный период превышает средний по Украине. Отмечены существенные различия в структуре врожденной патологии у живо - и мертворожденных детей.

Представлені результати моніторингу частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області за період с1997 по 2007 роки. Проаналізований спектр вроджених вад розвитку серед всіх новонароджених, живонароджених та мертво-народжених. Виявлено, що частоти вад розвитку в області за даний період перевищує середню по Україні. Визначені суттєві відмінності в структурі вродженої патології у живо - та мертвонароджених дітей.

Presents the results of monitoring the incidence of birth defects in the Cherkassy region for the period from 1997 to 2007. Analyzed the structure of congenital malformations in all fetuses, living and dead. Revealed that the frequency of malformations in the region is higher than in Ukraine. Significant differences from the spectrum of birth defects in live and dead fetuses

ШВАЧКО Л. П.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ
E-mail : l.p.shvachko@imb.org.ua

СПЕЦИФІЧНА ЕПІГЕНЕТИЧНА ДЕКОМПАКТИЗАЦІЯ ХРОМАТИНУ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗІ

Епігенетика є регуляцією експресії генів на рівні хроматину, що відбувається без змін у нуклеотидній послідовності ДНК [1]. Постреплікативне метилювання ДНК та пост- транскрипційне метилювання гістонів – ключові епігенетичні модифікації геному, які мають найбільш суттєве значення у створенні епігенетичної інформації на рівні хроматину [2]. Тому, у сучасному визначенні раку, як захворювання не геному, а його регуляції, епігенетичні зміни хроматину, що зумовлюють активацію або репресію транскрипції генів, можуть попереджувати механізм онкозахворювання [3] .

Нами було показано, що при онкологічній прогресії має місце суттєве деметилювання Alu ДНК повторів, переважних сателітних повторів центромерного/перичентромерного гетерохроматину [4]. Статус деметилювання сателітних ДНК повторів, частка яких у геномі - до 10%, вносить вагомий вклад у глобальне геномне гіпометилювання при канцерогенезі та пов'язується з аномальними змінами в компактизації та конденсації хроматину [5, 6]. Лінкерний гістон H1 є головною детермінантою конденсації та репресії хроматину [7]. В даній роботі досліджувались структурно-функціональні зміни ДНК-метил-залежного конденсованого хроматину (гетерохроматину) при онкологічному процесі за функціонування лінкерного гістону H1 та метил-специфічної геномної ДНК.

Матеріали та методи

Лімфоцити периферійної крові культивували з фітогемаглютиніном "Р", упродовж 48 годин, при 37⁰С, для отримання інтерфазних ядер та метафазних хромосом за стандартною методикою. Хромосомну ДНК виділяли за допомогою фенол-хлороформної екстракції та переосаджували етанолом, без депротейнізації протеїназою К.

Зразки хромосомних ДНК, канцер-асоційовані (від хворих на три типи солідного раку: тироїдний, колоректальний, Вільмса) та контрольну умовно здорового донора, інкубували з лінкерним гістоном H1 (Фірма "Fluka") в термостаті при 37⁰С , 1 год., з послідуною електрофоретичною детекцією препаратів гістону H1 у 15% ПААГ з 0,1% додецил-сульфату натрію за стандартною методикою *Laemly* в трис-гліциновому буфері, рН 8,8.

Обмежену рестрикцію Alu1 рестриктазою (AG↓CT) інтерфазної ядерної ДНК бласттрансформованих лімфоцитів та метафазних хромосом *in situ* вели упродовж 80 сек. та 40 сек. , відповідно, з послідуною мікроскопією Giemsa- препаратів на світловому мікроскопі (Фірма *Olympus*).

Результати та обговорення

Основою структурної організації геному є нуклеосомна організація хроматину. Нуклеосомний кор разом з лінкерним гістоном H1 та лінкерною ДНК, відомий як хроматосома, є структурно-функціональною одиницею хроматину [8]. Понад 80% нуклеосом хроматину поєднуються з гістоном H1, консервативному сімейству білків, що впливають на структуру та активність хроматину [9]. Модуляція епігенетичної конденсації хроматину пов'язується з основною функцією лінкерного гістону H1 [7]. Тому, метил-СрG-ДНК-залежний лінкерний гістон H1, взаємодіючи з міжнуклеосомною лінкерною ДНК, може виконувати ключову роль у епігенетичній компактизації та конденсації хроматину. З іншого боку, рекрутуючи до хроматину негістонові білки-репресори, лінкерний гістон H1 є також ключовим репресором транскрипції, запобігаючи доступу транскрипційних факторів та хроматин-ремодулюючих комплексів до молекули ДНК [10, 11]. Важливо, що функції гістону H1, як в конденсації хроматину, так і в репресії транскрипції на рівні хроматину, є епігенетично залежними від метилю-

вання ДНК. Найбільш суттєвою стадією у структурі хроматину є конденсація хромосом у мітозі.

Нами було показано, що обмежена Alu1-рестрикція метафазних хромосом зумовлює глобальну деконденсацію компактизованого хроматину (гетерохроматину) (Рис. 1), що може вказувати, зокрема, на лінкерну локалізацію Alu ДНК повторів в структурі H1-метил-залежного компактизованого хроматину.

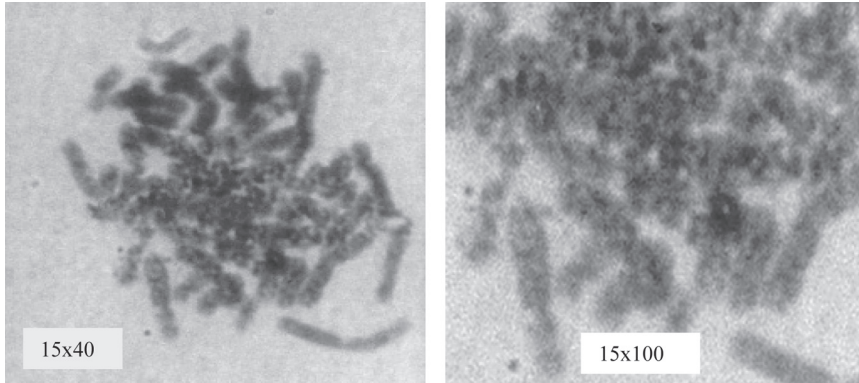


Рис. 1. Деконденсація гетерохроматину після обмеженої *in situ* Alu1-рестрикції метафазних хромосом.

Так, на стадії інтерфазного хроматину, при обмеженій *in situ* Alu1-рестрикції бласттрансформованих лімфоцитів показані окремі регіони нуклеосомної агрегації хроматину за відсутності лінкерної ДНК (Малюнок 2А), у порівнянні з класичною нуклеосомною організацією ДНК SV40 (Рис. 2 Б) [12].

Нами було показано, що функціональна організація репресивного хроматину з метил-ДНК-залежним лінкерним гістоном H1 може порушуватись у канцер-асоційованій геномній ДНК саме за рахунок її аномально-гіпометилування. Так, при інкубації лінкерного метил-залежного гістону H1 з хромосомною ДНК з лімфоцитів периферійної крові від хворих на три типи солідного раку (тироїдний рак, колоректальний рак та пухлина Вільямса) нами виявлена типова мінорна фракція кластеру хроматинових білків у складі канцер-асоційованої хромосомної ДНК, яка не зв'язувалась з лінкерним гістоном H1 та була відсутньою у контрольній не онкологічній ДНК, при електрофоретичному аналізі в 15% ПААГ з 0,1% додецил-сульфату натрію (рис. 3).

Як показано на електрофореграмі, при маленькій концентрації гістону H1 чітко видно його дві субодиниці H1А та H1В (Малюнок 3). Таким чином, за результатами проведеного дослідження можна бачити, що ДНК-метил-залежний лінкерний гістон H1 може мати дві структурно-

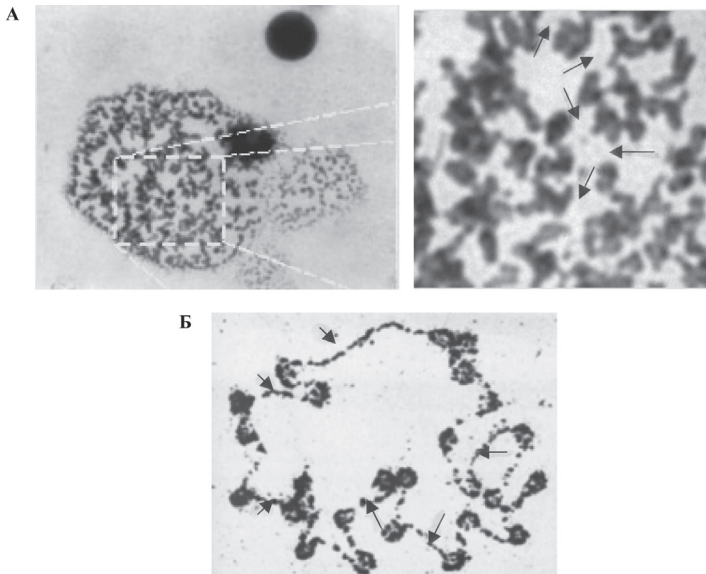


Рис 2. А. Деконденсація інтерфазного гетерохроматину після *in situ* Alu1-рестрикції в районах лінкерної ДНК. (→) Відсутність лінкерної ДНК. Б. Нуклеосомна організація ДНК вірусу SV40. (→) Лінкерна ДНК [12].

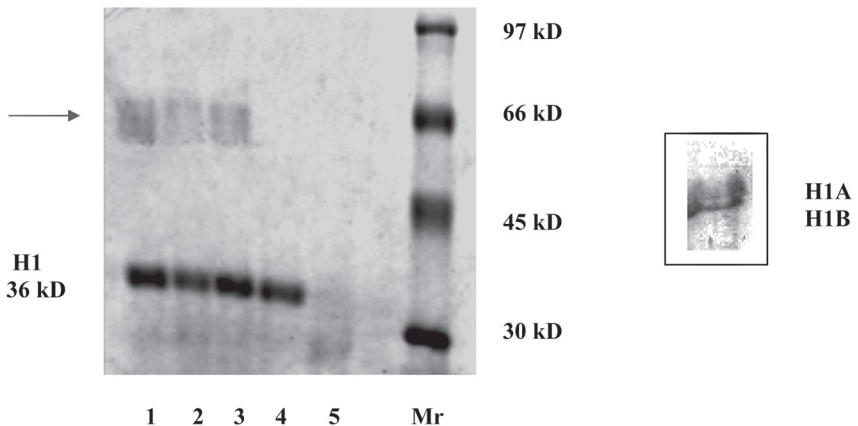


Рис. 3. 15% ПААГ електрофорез з 0,1% додецил –сульфатом натрія. Поява мінорної фракції кластеру хроматинових білків після інкубації канцер-асоційованої геномної ДНК з лінкерним гістоном Н1 (1-гіроїдний рак, 2-колоректальний рак, 3- пухлина Вільмса, 4- позитивний контроль, ДНК умовно здорового донора, 5- негативний контроль, гістон Н1 після обробки ДНКазою).

функціональні субодиниці в організації конденсованого гетерохроматину та транскрипційно репресивного хроматину. Вірогідно, що з одним з доменів лінкерного гістону H1 специфічно зв'язується метильована лінкерна ДНК при конденсації гетерохроматину, тоді як другий домен може бути функціональним для зв'язування ДНК-метил-залежних хроматинових білків репресивного комплексу в організації транскрипційно мовчачого хроматину. Обидві функції лінкерного пістону H1 можуть порушуватись у канцерогенезі.

Література

1. *Henikoff S., Grosveld F.* Welcome to epigenetics & chromatin / Epigenetics Chromatin – 2008, v.27, N1, p.1.

2. *Rountree M.R., Bachman K.E., Herman J.G., Baylin S.B.* 2001. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer / Oncogene –2001, v.20, N24, pp.3156-3165.

3. *Esteller M., Herman J.G.* 2002. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J. Pathol.- 2002, v.196, N1, pp. 1-7.

4. *Швачко Л.П., Бух І.Г., Степаненко А.П., Гульчій М.В., Цимбалюк С.М., Процик В.С., Кікоть В.О., Клімнюк Г.Г.* Спосіб ранньої діагностики злоякісних пухлин. / Деклараційний патент. UA 15873, 2006, Бюл. №7.

5. *Qu G., Dubeau L., Narayan A., Yu M.C., Ehrlich M.* Satellite DNA hypomethylation vs. overall genomic hypomethylation in ovarian epithelial tumors of different malignant potential. / Mutat. Res. – 1999, v. 423, N1, pp. 91–101.

6. *Shvachko L.P.* Alterations of constitutive pericentromeric heterochromatin in lymphocytes of cancer patients and lymphocytes exposed to 5-azacytidine is associated with DNA hypomethylation. / Experimental Oncology – 2008, v.30, N3, pp. 230-234.

7. *Buttinelli M., Panetta G., Rhodes D., Travers A.* The role of histone H1 in chromatin condensation and transcriptional repression. / Genetica. – 1999, v.106, N1-2, pp.117-24.

8. *Коряков Д.Е., Жимулев И.Ф.* Хромосомы. Структура и функция. / Новосибирск, изд-во Сибирское Отделение РАН, 2009. – 258 стр.

9. *Happel N., Doenecke D.* Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. / Gene – 2009, v. 431, N1-2, pp.1-12.

10. *Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M., Brown DT.* Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells / Nature – 2000, v. 408, N6814, pp.877-81.

11. *Sera T, Wolffe AP.* Role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on *Xenopus* oocyte 5S rRNA genes. . Mol Cell Biol.- 1998, v.18, N7, pp.3668-80.

12. *Saragosti S., Moyné G., Yaniv M.* The electronic microscopy of nucleosome DNA organization viruse SV40. / Cell – 1980, v. 20, p. 67.

Резюме

Епігенетика- регуляція експресії генів на рівні хроматину без змін послідовності ДНК. Метильовання ДНК та метильовання гістонів мають найбільш суттєве значення у створенні епігенетичної інформації на рівні хроматину. Тому, у визначенні раку, як захворюванні не геному, а його регуляції, епігенетичні зміни хроматину можуть попереджувати механізми онкозахворювання. Нами раніше було показано, що при онкологічній прогресії має місце суттєве деметильовання Alu ДНК повторів, переважних сателітних повторів центромерного/перичентромерного гетерохроматину, що вносить вагомий вклад в геномне гіпометильовання при канцерогенезі.

В даній роботі досліджувались аномальні структурно-функціональні зміни ДНК-метил – залежного хроматину при онкологічному процесі за участі лінкерного гістону H1, лінкерної ДНК та канцер-асоційованої хромосомної ДНК.

The highly compactive chromatin is originly associated with high levels of DNA methylation of satellite DNA as Alu centromeric repeats in centromeric/pericentromeric heterochromatin. Therefore, its highly condensed in metaphase and static in interphase cells. Have been emphasized that linker histone, H1, interacts with linker DNA between nucleosomes and functions in the compaction of chromatin into higher order structure.

The cancer-associated genome-wide DNA hypomethylation in carcinogenesis is consequently crucial for mitotic decompactisation and decondensation heterochromatine. In addition have been shown that patients with some certain solid cancers as the thyroid cancer, the colorectal cancer, and Wilms tumor have been revealed the commonly crucial minor fraction of DNA-methyl-binding chromatin proteins that non linked with linker histone H1. We suggest that H1A and H1B domains may be distinct link the methylated linker DNA and DNA-methyl –binding chromatin repressive assembly proteins in silencing chromatin formation.

ШПИЛЕВАЯ С.П., АНДРИЕНКО В.И., РЫМАРЬ С.Е., СУХОРАДА Е.М., КОРДИУМ В.А.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина, 03143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150, e-mail:kordium@imb.org.ua

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА

Мезенхимальные стволовые клетки (или стромальные) клетки (МСК), которые были впервые выделены из костного мозга (1), в настоящее время получают из многих органов и тканей взрослого организма. Этим клеткам присущи мультипотентные свойства т.е., способность дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении. Кроме того, МСК обладают свойствами самовосстановления и тропизма к поврежденным тканям или органам, а также к злокачественным опухолям (2). Еще одним основополагающим качеством МСК является их иммуномодулирующие свойства (3,4). Все эти особенности МСК создают огромный потенциал для их использования в регенеративной медицине. Одним из легкодоступных и этически оправданных источников МСК человека является пуповина. МСК, полученные из нее, могут быть дифференцированы не только в остеобласты, хондроциты, адипоциты, но и в кардиомиоциты, нейроны, гепатоциты и миобласты.

МСК, полученные различными методами и из различных источников, часто различаются по своим свойствам. Международное общество клеточной терапии предложило минимальные критерии определения мультипотентных стромальных клеток человека (5), куда входят способность к ад-

гезии на пластике, позитивная экспрессия таких маркеров, как CD 105, CD 73 и CD 90, отсутствие экспрессии поверхностных маркеров гемопоэтических клеток и дифференциация в остеобласты, адипоциты и хондроциты. Известно, что культивирование МСК *in vitro* приводит к клеточному старению, потере мультипотентности и их безопасности, если говорить о трансплантации этих клеток человеку. По этой причине крайне важно идентифицировать изменения, происходящие в клеточной популяции во время культивирования. Одной из простых и важных характеристик МСК, как свежeweделенных, так и культивируемых является их морфология, изучение которой проводится с использованием как различных возможностей микроскопии, так и с привлечением большого арсенала гистохимических методов. Поэтому целью данной работы явилось изучение морфологических характеристик МСК, выделенных из пуповины человека, по мере их культивирования.

Материалы и методы

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) получали из Вартанового геля пуповины человека (6). Клетки культивировали в CO₂ инкубаторе при 37°.

Цейтраферную микрофотосъемку вели на поляризационно-интерференционном микроскопе Biolar (Польша). Для микрофотосъемки МСК использовали специально сконструированные камеры объемом на 2 или 4 мл среды. Съемку проводили в течении 3-4 час с частотой съемки 1 кадр в 5секунд с последующей трансформацией снятых кадров в видеофильм.

Для цитохимических исследований материал фиксировали в парах формальдегида.

Микроскопические исследования препаратов проводили на конфокальном микроскопе AXIOSKOP – 2 ZEISS с лазерной программой LSM 5 PASCAL (Zeiss, Jena, Germany) и на люминесцентном микроскопе ЛМ-2 (ЛОМО, Россия).

Для окрашивания ядерной ДНК использовали реагенты-интеркаляторы: этидиум бромид (возбуждение 488нм, эмиссия 560нм); DAPI (возбуждение 350нм, эмиссия -470) и Hoechst 33342 (возбуждение – 350нм, эмиссия – 470нм).

Цитоплазматические белки МСК окрашивали Thiazine red R (возбуждение 514нм эмиссия при 530-600нм) и Fluorescein isothiocyanate (FITC) (возбуждение при 490нм и эмиссия при 525нм). Рабочие разведения красителей составляли 0,001% и 1:1000 соответственно (7).

Вещества липидной природы в цитоплазме МСК окрашивали Nile Red (8,9).. Нильский красный проявляет флуоресценцию в двух спектрах возбуждения люминесценции: желтое свечение - при возбуждении длиной волны 514нм и эмиссии 560-615нм; красное - при возбуждении 458нм и эмиссии 505-600нм. При обоих способах визуализации триглицеридов про-

является специфичность связывания красителя с липидными включениями в цитоплазме клеток.

В качестве антипригарного препарата (anti-bleach agents), предупреждающего выгорание люминесценции цитологического препарата в течение сеанса конфокальной микроскопии, использовали фенилендиамин (Phenylendiamine) (10).

Результаты и обсуждение

Исследование МСК методом цейтраферной микрофотосъемки на разных пассажах культивирования позволили наблюдать их постоянную подвижность, перемещения по камере наблюдения, формирование цитоплазматических выростов, контактирующих с соседними клетками, иногда - обмен с ними небольшими фрагментами цитоплазмы.

Во время движения по камере они заметно изменяли свою форму и объем – от классических - сильно вытянутых, веретеновидных до треугольных, округлых, неправильной формы, либо быстро округлялись перед делением ядра. Поэтому, по-видимому, нет обоснованной причины выделять какие-то константные фенотипы МСК, поскольку, похоже, что любая наблюдаемая нами на фиксированном материале форма клеток может оказаться не чем иным, как отражением определенного момента ее функционирования – перемещения или взаимодействия с соседними клетками.

Изучение фиксированных препаратов МСК нулевого, первого и второго пассажей на конфокальном микроскопе показано, что они наиболее часто имеют сильно удлинненную, фибробласто-подобную, игольчатую форму (рис1-3). Их цитоплазма тонким слоем располагается по поверхности стекла и выпуклое округлое ядро при наблюдении клетки в профиль (при построении 3D конфигурации) сильно выступает наружу. На более поздних пассажах МСК с характерной узкой, вытянутой фибробласто-подобной формой встречаются в реже и основной массив клеток представлен округлыми или треугольными клетками с большим количеством цитоплазмы. У незначительной части клеток кариокинез не сопровождается цитокинезом и в огромных (по сравнению с окружающими) клетках находится по 3-5 крупных интерфазных ядра.

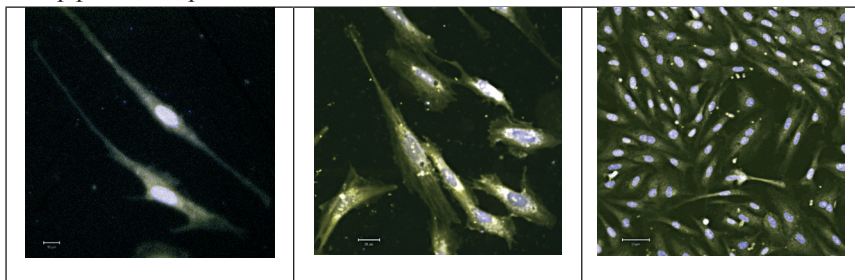


Рис. 1. 0 пасс.
НО+ThRed

Рис. 2. 1-й пасс.
DAPI+ThRed

Рис.3. 2-й пасс
DAPI+ThRed

Дифференциация адипоцитов. Спонтанное формирование адипоцитов и появление триглицеридов в цитоплазме МСК отмечалось на третьем пассаже (16суток культивирования), когда большинство МСК изменяли свою фибробласто-подобную форму на округлую. Мелкие липид-содержащие капли располагались по всей цитоплазме клетки, скапливаясь несколько более плотно в перинуклеарной зоне. На четвертом-пятом пассажах (22 сут. культивирования) количество адипогенных клеток значительно возросло. Размер и количество липидных капель в них увеличивался и вокруг ядер МСК формировались плотные скопления триглицеридов, выявляемых нильским красным. (рис. 4).

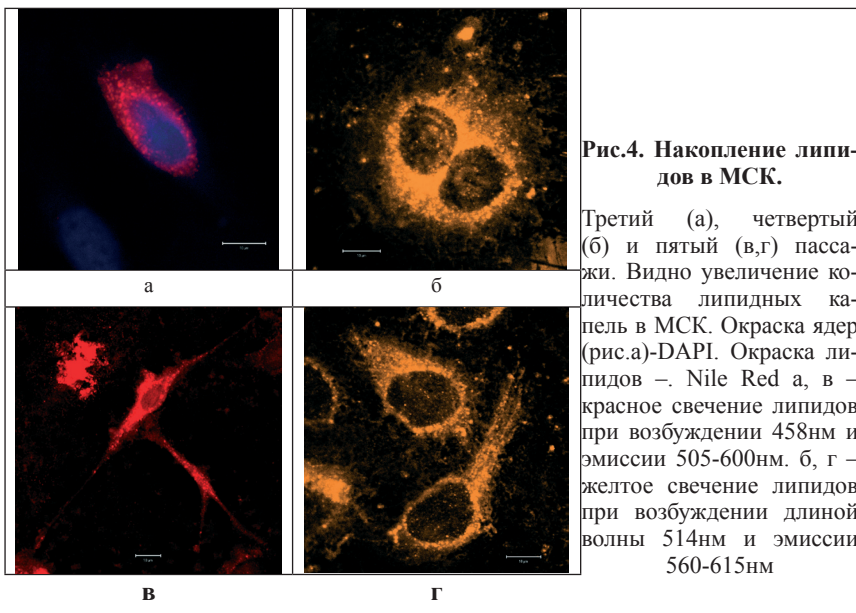


Рис.4. Накопление липидов в МСК.

Третий (а), четвертый (б) и пятый (в,г) пассажи. Видно увеличение количества липидных капель в МСК. Окраска ядер (рис.а)-DAPI. Окраска липидов – Nile Red а, в – красное свечение липидов при возбуждении 458нм и эмиссии 505-600нм. б, г – желтое свечение липидов при возбуждении длиной волны 514нм и эмиссии 560-615нм

Выводы

1. В условиях *in vitro* МСК разных пассажей демонстрируют активное движение, взаимодействие и трансформацию своей формы в процессе перемещения по камере наблюдения, что подтвердилось результатами цейтраферной микросъемки.

2. Свежевыделенные МСК на первых пассажах в основном имеют характерную удлиненную, игольчатую форму.

3. Появление липидных капель в цитоплазме МСК и начало дифференциации адипоцитов отмечено начиная с третьего пассажа. Количество отложений липидов значительно возрастает в последующих пассажах.

Литература

1. Freedenstein A.Y., Piatetzky-Shapiro I.I., Petrakova K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embriol.Exper.Morphol.* 1966, 16 (3), 381-390.
2. Spaeth E., Kloop A. Dembinski J., Andreeff M., Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 2008, 15, 730-738.
3. Ozaki K, K. Sato. J, Oh I, Meguro A., Tatara R., Muroi K., Ozawa K. Mechanism of immunomodulation by mesenchymal stem cells. *Internat. J. Hematology*, 2007, 86, N1, 5-7.
4. Horwitz E.M., Prather W.R. Cytokines as the major mechanism of mesenchymal stem cell clinical activity: expanding the spectrum of cell therapy. *Isr.Med.Assoc.J.*, 2009, 11, N 4, 209-211.
5. Horwitz E.M., Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005, 7, N5, 393-5.
6. Young-Jin Kim Culture of umbilical cord-and blood-derived stem cells. In: *Culture of human stem cells.* 2008. 159-184
7. П.Лилли Патогистологическая техника и практическая гистохимия. 1969. Изд. «Мир». М. 645с.
8. Greenspan P., Mayer E.P. and Fowler S.D. 1985. *The Journal of Cell Biology*, v.100, March, 965-973
9. Karahuseyinoglu S., Cinar O., Kilic E., Kara F., Akay G.G., Demiralp D.O., Turkun A., Uckan D., Can A. . Biology of stem cells in human umbilical cord stroma[^] in situ and *in vitro* surveys. *Stem Cells*, 2007; 25, 319-331.
10. Johnson G.D., Davidson R.S., McNamee K.C., Russell G., Holborow E.J.. Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomena and its remedy. *J. Immun. Meth.* 1982, 55, 231-242.

Резюме

Методом цейтраферной микрофотосъемки изучено поведение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) разных пассажей в специально сконструированных камерах. Показаны их перемещения, контакты, взаимодействия. Цитохимически прослежены начальные этапы аккумуляции липидов в цитоплазме клеток (nile red) и дифференциации адипоцитов, начиная с третьего пассажа культивирования (конфокальная микроскопия).

Методом цейтраферної мікрозйомки вивчалась поведінка мезенхіальних ствольових клітин (МСК) різних пасажів у спеціально сконструйованих камерах. Спостерігалися їх перемощення, контакти, взаємодія. Цитохімічними методами досліджені початкові етапи накопичення ліпідів у цитоплазмі клітин (Nile red) та диференціації адипоцитів, починаючи з третього пасажу культивування (конфокальна мікроскопія).

The behavior of mesenchymal stem cells (MSC) of different passages under the conditions of specially constructed chambers was investigated via ceitrafer micro-photo shooting. All bulk of migrations and contact interactions were shown. The first stage of the intra-cytoplasmic lipid accumulation was detected cyto-chemically (nile red) and the differentiation of adipocytes of the third passage was observed via CLSM.

З М І С Т

РАИСА ГЕОРГИЕВНА БУТЕНКО	3
---------------------------------------	---

ЕВОЛЮЦІЯ ГЕНОМІВ У ПРИРОДІ ТА ЕКСПЕРИМЕНТІ

БАТУРИН С.О.

СЕГРЕГАЦІЯ ПО ПОЛОВОМУ СТАТУСУ ЦВЕТКОВ В РЯДУ СЕМЕННЫХ ПОКОЛЕНИЙ <i>FRAGARIA</i> × <i>ANANASSA</i> DUCH. ПРИ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ.	9
---	---

ВАГИН Ю. В.

ПРЕНАТАЛЬНЫЙ ОТБОР У ПЛАЦЕНТАРНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: ИТОГИ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.	14
---	----

ВОЛЫНКИН В.А., ЗЛЕНКО В.А., ЛИХОВСКОЙ В.В., ОЛЕЙНИКОВ Н.П., ПОЛУЛЯХ А.А., РОШКА Н.А., ПЫТЕЛЬ И.Ф.

ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФОРМ ВИНОГРАДА СЕМЕЙСТВА VITACEAE L.	19
--	----

ЖУК О.И.

ЭВОЛЮЦИОННАЯ АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ К СУЩЕСТВОВАНИЮ В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ФАКТОРОВ БИОТИЧЕСКОЙ И АБИОТИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ.	24
---	----

ИВАНОВ Р.С., ТРОПЫНИНА Т.С., ВАФИНА Г.Х., ИВАНОВА Э.А.

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ В УСЛОВИЯХ ФАКТОРОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ.	29
---	----

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

ТИГУНЦОВА А.Е.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ТРИПЛОИДЫ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА И ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЕСТЕСТВЕННОЙ ПОЛИПЛОИДИИ У БИСЕКСУАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ.	34
---	----

КУНДА-ПРОНЬ И. В., РАДИОНОВ Д. Б., КУЧЕРОВ В. А.,

КОЗЕРЕЦКАЯ И. А.

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА КАРБОКСИЭСТЕРАЗЫ, РЕКОМБИНАЦИОННЫХ И МУТАЦИОННЫХ СОБЫТИЙ В ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> Г. ДРОГОБЫЧ.	40
---	----

ЛЕВИТЕС Е.В.

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ В АГАМОСПЕРМНЫХ ПОТОМСТВАХ РАСТЕНИЙ.	44
--	----

МАЛЕЦКИЙ С.И. БАВИЛОВСКИЙ ЗАКОН О ГОМОЛОГИЯХ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ РЕПРОДУКТИВНЫХ ПРИЗНАКОВ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (<i>BETA VULGARIS L.</i>)	49
МИХЕЕВ А.Н. ИНЕРЦИОННОСТЬ ЭВОЛЮЦИОННЫХ ПРЕОБРАЗОВАНИЙ И ИХ ФАКТОРЫ	59
ПОСКРЯКОВ А.В., ГАЙФУЛЛИНА Л.Р., САЛТЫКОВА Е.С. РОЛЬ КРИТИЧЕСКИХ ПЕРИОДОВ ОНТОГЕНЕЗА У КОМНАТНОЙ МУХИ В ПРОЯВЛЕНИИ ЭФФЕКТА ТРАНСГЕНЕРАЦИИ ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА	65
ПРОНИНА О.В., ПЕТРАЧКОВА Т.А., ШЕПЕТА Ю.Б., РУШКОВСКИЙ С.Р. ВЛИЯНИЕ ПОТЕРИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК НА ПРОЦЕССЫ СТАРЕНИЯ В КОЛОНИЯХ ДРОЖЖЕЙ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	69
РАУТИАН М.С. КОЭВОЛЮЦИЯ ВНУТРИЯДЕРНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ <i>HOLOSPORA</i> И ИХ ХОЗЯЕВ, ИНФУЗОРИЙ РОДА <i>PARAMESCIUM</i>	73
РУБАН Ю.Д. ПРИНЦИПЫ ЭВОЛЮЦИИ В СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКЕ	77
СЕМЕНОВА С. К. ЭВОЛЮЦИОННАЯ ГЕНОМИКА ТРЕМАТОД - ПАРАЗИТОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ	80
СЕМЧУК Л.И., РОМАШЕВ С.А., АНДРИЙЧУК Е. Н, ШЕВЧЕНКО Т.П. ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ДИКИХ ТИПОВ ФАГОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ, КАК НЕОБХОДИМЫЙ ЭТАП ПОНИМАНИЯ ЭВОЛЮЦИИ ИХ ГЕНОМОВ В ПРИРОДЕ	85
СУХАРЛЕВ В. А. ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТРОФИКИ ОВЕЦ	90
СУХАРЛЕВ В. А. ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ЭВОЛЮЦИИ ПОРОД ОВЕЦ	95
ФЕДОРОВА Н.Б., ЧАДОВА Е.В., ЧАДОВ Б.Ф. РОДИТЕЛЬСКИЕ ЭФФЕКТЫ УСЛОВНЫХ МУТАЦИЙ У ДРОЗОФИЛЫ	99
ХОХЛОВ А. М. МИКРОЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПОПУЛЯЦИИ ДОМАШНИХ И ДИКИХ СВИНЕЙ	105
ЧИГРИН А.В., БОНДУС Р.О., УПИР Л.М., БЕЗХИЖКО В.І., ВАЩЕНКО Г.І. ПАСЛЬОНОВІ КУЛЬТУРИ, ЯК ФАКТОР МІКРОЕВОЛЮЦІЇ КОЛОРАДСЬКОГО ЖУКА (<i>LEPTINOTARSA DECEMLINEATA SAY</i>)	109

ШТАРК О.Ю., ПРОВОРОВ Н.А., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А. ЭВОЛЮЦИЯ МУТУАЛИСТИЧЕСКИХ РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ СИМБИОЗОВ: ГИПОТЕЗЫ И ФАКТЫ	114
--	-----

МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

БЕЛОЗОРОВА О.А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗНЫХ ВЕКТОРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТОВ ГЕНА OMP1 CHLAMYDIA TRACHOMATIS	121
БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р., ФЕДОРОВИЧ Д.В., БОРЕЦЬКИЙ В.Ю., ФАЮРА Л.Р., ПИНЯГА Ю.В., СИБІРНИЙ А.А. РОЛЬ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ SEF1p ТА YAP1p У РЕГУЛЯЦІЇ БІОСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ ТА МЕТАБОЛІЗМУ ЗАЛІЗА У ДРІЖДЖІВ <i>PICHA GUILLIERMONDII</i>	125
ВИНИЧЕНКО Н.А. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОЙ ОБРАБОТКИ ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЯН ПШЕНИЦЫ И САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА ПЦР-ПРОФИЛИ ФЕРМЕНТНЫХ ЛОКУСОВ	131
ЖУКОВ В.А., ГРИШИНА О.А., ЖЕРНАКОВ А.И., НЕМАНКИН Т.А., РЫЧАГОВА Т.С., СУЛИМА А.С., ТИТОВ В.С., ФЕДОРИНА Я.В., ШТАРК О.Ю., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ В ИЗУЧЕНИИ МУТУАЛИСТИЧЕСКИХ СИМБИОЗОВ	136
КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В. ВЛИЯНИЕ ДОЗЫ АЛЛЕЛЕЙ <i>MDH1</i> И <i>MDH2</i> НА СООТНОШЕНИЕ ФЕНОТИПОВ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В АГАМОСПЕРМНОМ ПОТОМСТВЕ ТРИПЛОИДНОГО РАСТЕНИЯ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ.	141
КУЗОВКОВА А.А., РЕШЕТНИКОВ В.Н. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХЛОРОПЛАСТНЫХ НУ- КЛЕОИДОВ ОЗИМОЙ РЖИ (<i>SECALE CEREALE</i>) С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ПРОТЕОМНОГО АНАЛИЗА.	146
ПАНЧУК І.І., КАСІЯНЧУК Р.М., ВОЛКОВ Р.А. ДИФЕРЕНЦІЙНА ТРАНСКРИПЦІЯ ГЕНІВ <i>APX</i> АРАБІДОПСИСУ ЗА ДІЇ ІОНІВ КАДМІЮ ТА МІДІ	150
ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л. ФРАГМЕНТИ ЯДЕРНИХ ПСЕВДОГЕНІВ У МІТОХОНДРІАЛЬНИХ ГЕНОМАХ <i>PRIMATES</i>	155
РАЙКО М.П., РОДИОНОВ А.В. МУТАЦИИ В ГЕНЕ <i>trnL</i> И МЕЖГЕННОМ СПЕЙСЕРЕ <i>trnL-trnF</i> В ХОДЕ ДИВЕРГЕНЦИИ ТАКСОНОВ У ЗЛАКОВ ТРИБ <i>AVENEAЕ</i> И <i>POEAЕ</i>	162

РОЖОК А. І., ЄВДОКИМЕНКО К. С., КОЗЕРЕЦЬКА І. А. АНАЛІЗ ПОШИРЕННЯ БЛКІВ НАДРОДИНИ <i>THAP</i> ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК З ЕВОЛЮЦІЄЮ <i>P</i> ТРАНСПОЗОНА	166
САМОЙЛЕНКО І.О., ЯЦИШИНА А.П., ПІДПАЛА О.В., ВАГІНА І.М., ЛУКАШ Л.Л. АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ ВІДОМОГО ТА РЕФЕРОВАНОГО ПРОМОТОРІВ ГЕНА <i>MGMT</i> У ЕМБРІОНАЛЬНИХ ГЕРМІНАТИВНИХ КЛІТИНАХ МИШІ	170
СЛІЩУК Г.І., КОЖУХОВА Н.Е. БІОІНФОРМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ МІТОХОНДРІАЛЬНИХ АЛЬДЕГІДДЕГІДРОГЕНАЗ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ <i>POACEAE</i>	175
ШИЛІНА Ю.В., ГУЩА М.І., МОЛОЖАВА О.С., ДЯЧЕНКО А.І., МОРОЗ Ю.І. РОЛЬ ФАКУЛЬТАТИВНОГО КОМПОНЕНТУ ГЕНОМУ В АДАПТИВНИХ МОДИФІКАЦІЯХ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ БАКТЕРІЙ	180
TSYGANKOVA V. A. ROLE OF SMALL REGULATORY RNAs IN IMMUNO-PROTECTIVE PROCESSES OF PLANT CELLS	186
WNETRZAK J., BETTS S., EVANS A., HOWARTH C., HASTEROK R., LANGDON T. GENOME EVOLUTION IN AVENA– MOBILE ELEMENTS AS PHYLOGENETIC, CYTOLOGICAL AND AGRONOMIC TOOLS	191
БІОТЕХНОЛОГІЇ У СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ ТА МЕДИЦИНІ	
АБРАІМОВА О.Є., ДЕРКАЧ К.В., СМЕТАНІН В.Т., САТАРОВА Т.М. ВПЛИВ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ СЕРЕДОВИЩА НА КАЛЮСОГЕНЕЗ ТА РЕГЕНЕРАЦІЮ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i> У КУКУРУДЗИ.	193
АХТЕМОВА Г.А., ШТАРК О.Ю., ПЕРШИНА Е.В., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ І.А. ПОИСК ХОЗЯЙСТВЕНО-ЦЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ РЕГИОНАЛЬНОГО ПРОИЗВОДСТВА МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ.	198
БЛІНСЬКА О. В. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ІННОВАЦІЙНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ ГАПЛОІДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ У КУЛЬТУРІ ПІЛЯКІВ <i>IN VITRO</i>	202
БЕЛОКУРОВА В.Б. СОХРАНЕНИЕ <i>IN VITRO</i> РАСТЕНИЙ РАРИТЕТНОГО ВИДА <i>DIANTHUS GRATIANOPOLITANUS</i> VILL. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ УСЛОВИЙ МЕДЛЕННОГО РОСТА	208

БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПІРИДОНОВА К.В., КУНАХ В.А. МІНЛИВІСТЬ ПЛР-МАКЕРІВ НА ОСНОВІ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ХВОРОБ ТА ВІДПОВІДІ НА АБІОТИЧНИЙ СТРЕС В КУЛЬТУРІ ТКАНИН <i>UNGERNIA VICTORIS</i>	213
БУГАРА І.А., ЧМЕЛЕВА С.І., ОМЕЛЬЧЕНКО А.В., ЮРКОВА І.Н., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., ШИРИНА А.О. ПОЛУЧЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ФАТСХЕДЕРЫ ЛИЗЕ (<i>FATSHEDERA LIZEI</i>)	218
БУРЛАКА О.М., ПІРКО Я.В., ЄМЕЦЬ А.І., БЛЮМ Я.Б. ВИКОРИСТАННЯ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК ДЛЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ РОСЛИН	223
ВАГИНА І.Н., АНОПРИЕНКО О.В., ЗАХАРУК Е.А., ХРАНОВСКАЯ Н.Н., СКАЧКОВА О.В., СТРОКОВСКАЯ Л.І. ВЛИЯНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ, ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БАКУЛОВИРУСОМ С ГЕНОМ <i>IFN-β</i> , НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ МЫШИ <i>IN VITRO</i>	228
ВЕРЖУК В.Г., ПАВЛОВ А.В., НОВИКОВА Л.Ю., ОРЛОВА С.Ю. КРИОКОНСЕРВАЦІЯ ПОБЕГОВ И ПОЧЕК ЧЕРЕМУХИ (<i>PADUS MILL.</i>) С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ КРИОПРОТЕКТОРОВ И РЕЖИМОВ ЗАМОРАЖИВАНИЯ	233
ГОНЧАРУК О.М., БАВОЛ А.В., ДУБРОВНА О.В. МОРФОГЕНЕТИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ВИСОКОПРОДУКТИВНИХ СОРТІВ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ В КУЛЬТУРІ АПКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ ПАГОНІВ	237
ГУЗЕНКО Е.В., ЛЕМЕШ В.А. РИЗОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> У СОРТОВ ЛЬНА-ДОЛГУНЦА И ЛЬНА МАСЛИЧНОГО (<i>LINUM USITATISSIMUM L.</i>)	242
ДРОБИК Н.М., КОНВАЛЮК І.І., МЕЛЬНИК В.М., ТВАРДОВСЬКА М.О., КУНАХ В.А. МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ ДЕЯКИХ ВИДІВ <i>GENTIANA L.</i> НА ПЕРШИХ ЕТАПАХ ВИРОЩУВАННЯ <i>IN VITRO</i> : RAPD-АНАЛІЗ	248
ЕГОРОВА Н.А., СТАВЦЕВА І.В., ЛОЛОЙКО А.В., МЕРКУРЬЕВ А.П. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОМАКЛОНАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИСХОДНОГО СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА У ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ	252
ЗІНЧЕНКО М.О., БАВОЛ А.В., ДУБРОВНА О.В., ЛЯЛЬКО І.І. ЕФЕКТИВНІСТЬ РІЗНИХ СЕЛЕКТИВНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ДОБОРУ ТОЛЕРАНТНИХ ДО ПОСУХИ ФОРМ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ	258
ЗИМИНА О. В., СЫТНИК Е. С., ВДОВИЧЕНКО Ж. В., АЛХИМОВА Е. Г., СПИРИДОНОВ В. Г., ПАРИЙ М. Ф. СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЯВЛЕНИЯ СОМАТИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ	263

КАРПОВА І.С., БУРНАШЕВА М.В., САЩУК О.В., ГЕТЬМАН К.І., ПАЛЬЧЕВСЬКА О.Л., НЕГРУЦЬКА В.В., КОЦАРЕНКО К.В., ЛИЛО В.В., ЛУКАШ Л.Л. ДОСЛІДЖЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ У МУТАНТНОГО ШТАМУ <i>BACILLUS SUBTILIS</i> ЗА НАЯВНОСТІ В ЙОГО ГЕНОМІ ALU-ПОВТОРУ ЛЮДИНИ	268
КАТЫШЕВ А.И., ШМАКОВ В.Н., ЧЕРНИКОВА В.В., СИДОРЧУК Ю.В., ДЕЙНЕКО Е.В., КОНСТАНТИНОВ Ю.М. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МИТОХОНДРИЙ ТАБАКА КОНСТРУКЦИЕЙ С ИНТЕГРАТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ И ОТБОР КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С ТРАНСГЕННЫМИ МИТОХОНДРИЯМИ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИЦИНУ А	273
КВАСКО О. Ю., МАТВЄЄВА Н. А. ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ НА НАКОПИЧЕННЯ ПОЛІФРУКТАНІВ ТРАНСГЕННИМИ РОСЛИНАМИ ЦИКОРІЮ <i>CICHORIUM INTYBUS</i> L. З ГЕНОМ ІНТЕРФЕРОНУ-А2В ЛЮДИНИ	278
КИЩЕНКО Е.М., ГЕРАСИМЕНКО И.М., ВАСИЛЕНКО М.Ю., КУЧУК Н.В. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КАПУСТЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ ГЕНОВ <i>esxA</i> И <i>fbpB</i> <i>MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> И <i>huINFα-2B</i> ЧЕЛОВЕКА	281
КЛЯЧЕНКО О.Л., БОРОДАЙ В.В. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОТРИМАННЯ КАРТОПЛІ (<i>SOLANUM TUBEROSUM</i> L.), СТІЙКОЇ ДО ФІТОПАТОГЕНІВ	286
КОВАЛЕВА Л.В., МИНКИНА Ю.В., ЗАХАРОВА Е.В. ФЛАВОНОЛЫ В <i>IN VITRO</i> ПРОРАСТАЮЩЕМ МУЖСКОМ ГАМЕТОФИТЕ ПЕТУНИИ (<i>PETUNIA HYBRIDA</i> L.)	291
КОВБАСЕНКО Р.В., ДЯЧЕНКО А.І., ДМИТРИЄВ О.П. ІНДУКЦІЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТОМАТУ (<i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i>) ДО ХВОРОБ В КУЛЬТУРІ <i>IN VITRO</i>	296
КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., ДЕМЧУК Т.Л. РЕГЕНЕРАЦІЯ ВИДУ <i>LYCOPERSICON ESCULENTUM</i> MILL. ЧЕРЕЗ КУЛЬТУРУ КАЛЮСНОЇ ТКАНИНИ	301
КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., КРИНИЦЫНА А.А., КИНАШ Е.А., ЖУЧЕНКО А.А. СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ МЕЙОЗ-СПЕЦИФИЧНЫХ ЭНДОНУКЛЕАЗ <i>SPO11 SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ИЛИ <i>SPO11-1 ARABIDOPSIS THALIANA</i>	306

КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ЛЕВИНА Т.А., ФАДИНА О.А., ЖУЧЕНКО А.А. ИНДУКЦИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ У ТРАНСГЕННЫХ ГИБРИДОВ ТОМАТА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН БАКТЕРИАЛЬНОЙ РЕКОМБИНАЗЫ <i>recA ESCHERICHIA COLI</i>	311
КОМІСАРЕНКО А.Г., МИХАЛЬСЬКА С.І., МУЖАНОВСЬКА О.К., МОРГУН Б.В., АДАМЕНКО Н.І., ТИЩЕНКО О.М. ПІДВИЩЕННЯ ЧАСТОТИ РЕГЕНЕРАЦІЇ СОНЯШНИКА СОРТУ ПРОМЕТЕЙ ЗА <i>AGROBACTERIUM</i> -ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ	316
КОРНЯ Т.М., АКСЕЛЬРУД Д.В., МОЛОДЧЕНКОВА О.О. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ГЕНОТИПУ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ СТВОРЕННЯ ШЛЯХОМ АНДРОГЕНЕЗУ <i>IN VITRO</i> ГОМОЗИГОТНИХ ФОРМ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ІЗ СТІЙКІСТЮ ДО <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i>	320
КРУГЛОВА А.Е., КРУГЛОВА Н.Н. ПЕРИОДИЗАЦИЯ РАЗВИТИЯ ЗАРОДЫША ПШЕНИЦЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАЗРАБОТОК	325
ЛЁШИНА Л.Г. , БУЛКО О.В., ЕГОРОВ О.А. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БАРВИНКА МАЛОГО (<i>VINCA MINOR</i>): БИОСИНТЕЗ ВИНКАМИНА В РАСТЕНИЯХ-РЕГЕНЕРАНТАХ	330
ЛИХАЧЕВА Л.И., ГУЛЬКО Т.П., РУБАН Т.А., КОРДИУМ В.А. ВЛИЯНИЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЫШИНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ	336
МАТВЕЕВА А.Ю., КУРЧИЙ В.М., МОРГУН Б.В., БАННИКОВА М.А. ТИЩЕНКО Е.Н. ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЭНЗИМОВ МЕТАБОЛИЗМА САХАРОЗЫ В ПРОРОСТКАХ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ, ИНФИЦИРОВАННОЙ <i>IN PLANTA</i> ШТАММОМ GV2260, СОДЕРЖАЩИМ ПЛАЗМИДУ РСВ002	340
МАТВЕЕВА Н.А., КУРБАТОВА Л.Е., КВАСКО Е.Ю. <i>IN VITRO</i> КОЛЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ АНТАРКТИКИ КАК ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ	345
МАШКИНА О.С., ТАБАЦКАЯ Т.М. СТРАТЕГИЯ ДОЛГОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ <i>IN VITRO</i> КОЛЛЕКЦИИ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ	349
МЕЛИХОВА Г.И. ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ МАСЛИНЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ.	354
МИТРОФАНОВА І.В., ІВАНОВА Н.М. ВИКОРИСТАННЯ РЕТАРДАНТІВ ДЛЯ ЗБЕРЕЖЕННЯ В УМОВАХ <i>IN VITRO</i> ЦІННОГО РОСЛИННОГО ГЕНОФОНДУ	358

НОВАК Т.В., ТКАЧУК В.А., БАЛАН О.Д., СУЛІМА Н.М. ПРОГНОЗ ЕКОНОМІЧНИХ НАСЛІДКІВ ВИРОЩУВАННЯ ГЕНЕТИЧНО МОДИФІКОВАНИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ	363
ОВЕРЧЕНКО В.В., КЛЮВАДЕНКО А.А., МЕЛЬНИЧУК М.Д. БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПРИЙОМИ ОТРИМАННЯ ВИСОКОЯКІСНОГО ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ ХМЕЛЮ ЗВИЧАЙНОГО (<i>HUMULUS LUPULUS</i> L.)	367
ОПАЛКО О.А., ОПАЛКО А.І. ПРОБЛЕМИ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ТЕРМІНОЛОГІЇ В АГРАРНОМУ ВУЗІ . . .	373
ОСТРИКОВА О.В., ФЕДОТОВА И.Э., ХАРХАРДИНА Е.Л. ОПТИМІЗАЦІЯ МІКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕННЯ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ ВИШНИ НА ЭТАПЕ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ	378
САМСОНОВА А.Е., МАШКИНА О.С., ТАБАЦКАЯ Т.М. ФИТОГОРМОНЫ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЦЕННЫХ ГЕНОТИПОВ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ <i>IN VITRO</i>	383
САХНО Л.О., КОМАРНИЦЬКИЙ І.К., МАЙСТРОВ П.Д., КУЧУК М.В. СТВОРЕННЯ РОСЛИН РІПАКУ, СТІЙКИХ ДО ГЕРБІЦИДІВ НА ОСНОВІ ГЛІФОСАТУ, ЗА РАХУНОК ВВЕДЕННЯ СИНТЕТИЧНОГО ГЕНА <i>EPSPS</i> . . .	388
СЕКАН А.С., СОРОЧИНСЬКИЙ Б.В., ІСАЄНКОВ С.В. ДОСЛІДЖЕННЯ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО ТРАНСПОРТУ БЛІКВ У ПРОТОПЛАСТАХ РОСЛИН ТРАНСФОРМОВАНИХ СПЕЦИФІЧНИМИ ДНК GFP ВЕКТОРАМИ	393
СЕМЕНОВА В.А., КАРПЕЧЕНКО К.А., КАРПЕЧЕНКО Н.А., ЗЕМЛЯНУХИНА О.А. ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ <i>DAPHNE CNEORUM</i> L. (<i>DAPHNE JULIA</i> K.-POL.) В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> . . .	398
СЛЕПЯН Л.И., КАУХОВА И.Е., ГРОМОВА О.Н., КУЗЬМИНА Н.В К ИСТОРИИ БАНКА КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЙ ХИМИКО-ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКАДЕМИИ.	404
СЛОБОДЯН С.О., ГРИЦАЙ Р.В., ОЛІЙНИК Т.М., БЕЛОШИЦЬКА Н.Й., ТАРАЩЕНКО Н.І., СІДАКОВА О.В. ОТРИМАННЯ ТРАНСФОРМОВАНИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВЕКТОРНИХ КОНСТРУКЦІЙ МЕТОДОМ ПЛР	407
СОЛОДЯНКИН А.С., ГЕРИЛОВИЧ А.П. ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БОЛЕЗНИ МАРЕКА, СКОНСТРУИРОВАННОЙ НА ОСНОВЕ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА И ЦЕТИЛТРИМЕТИЛАМОНИЯ БРОМИДА, НА КУЛЬТУРУ КЛЕТОК КУРИНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ И ОРГАНИЗМ КУР . .	412

СТУПКО В.Ю., ЗОБОВА Н.В. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СЕЛЕКЦИИ <i>IN VITRO</i> ФОРМ МЯГКОЙ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ УСТОЙЧИВЫХ К ЭДАФИЧЕСКИМ СТРЕССАМ	417
СУПРУН С.М., ДОНЧЕНКО Г.В., ХАРКЕВИЧ Е.С., ПАВЛИЧЕНКО А.К., СТЕПАНЕНКО С.П., КУРЧЕНКО И.Н., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М., КОМПЛЕКСНЫЙ ГРИБНОЙ ПРЕПАРАТ: ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ	422
ТАШИРЕВ А.Б., БЕРЕГОВАЯ Т.В., РОМАНОВСКАЯ В.А., РОКИТКО П.В., МАТВЕЕВА Н.А. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЛАНИНОВ ИЗ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ АНТАРКТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ. . .	427
ФОМЕНКО Т.И., МАЛЮШ М.К. МОРФОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛЮПИНА	432
ШЕЛУДЬКО Ю.В., ГЕРАСИМЕНКО И.М., КАЗАНЦЕВ А.А., СИНДАРОВСКАЯ Я.Р., МАЗУР М.Г., ВЯЧЕСЛАВОВА А. О., ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В., КУЧУК Н.В. СОЗДАНИЕ ГИБРИДНЫХ ГЕНОВ НА ОСНОВЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИХЕНАЗЫ <i>CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM</i> ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ В РАСТЕНИЯХ.	437
ШИША Е.Н., БОЙЧУК Ю., ЕМЕЦ А.И., БЛОМ Я.Б. ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ <i>IN VITRO</i> И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ РЫЖИКА ПОСЕВНОГО <i>CAMELLINA SATIVA L</i>	442
ЯМСКОВА В. П., КРАСНОВ М. С., РЫБАКОВА Е.Ю., КОНСТАНТИНОВСКИЙ А.А., СТРЕЦКИЙ Г.М., ШАЙХАЛИЕВ А.И., ЯМСКОВ И. А. НОВЫЙ БИОРЕГУЛЯТОР СЫВОРОТКИ КРОВИ БЫКА, КАК ЭФФЕКТИВНОЕ РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЕ СРЕДСТВО	446
ЯЦИШИН В.Ю., ШОЛЯК К.В., ФЕДОРОВИЧ Д.В., СИБИРНИЙ А.А. ПІДБІР ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ДЛЯ МАКСИМАЛЬНОГО СИНТЕЗУ ФМН ШТАМОМ-НАДПРОДУЦЕНТОМ Т-ОРМ 19 <i>CANDIDA FAMATA</i>	451

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

АТРАМЕНТОВА Л.А., КАРАЧЕНЦЕВ Ю.И., ГОРШУНСКАЯ М.Ю., ТЫЖНЕНКО Т.В., ПОЧЕРНЯЕВ А.К., ОПАЛЕЙКО Ю.А. ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЕ ПОЛИМОРФИЗМЫ +45T/G И +276G/T ГЕНА <i>ADIPOQ</i> У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ.	456
---	-----

БАГАЦКАЯ Н.В., НЕФИДОВА В.Е. ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МУТАГЕНЕЗА В ЛИМ- ФОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРОБАНДОВ, БОЛЬНЫХ ОСТЕОАР- ТРОЗОМ	460
ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О., КЩЕРА Н.І. КАТАМНЕСТИЧНЕ СПОСТЕРЕЖЕННЯ ЗА ВИПАДКАМИ ПРИРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ СЕРЕД НОВОНАРОДЖЕНИХ У ПОЛОГОВИХ БУДИНКАХ ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ	465
ГОНТАРЬ Ю.В., ИЛЬИН И.Е ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА В ИССЛЕДОВАНИИ ПРИЧИН БЕСПЛОДИЯ У СУПРУЖЕСКИХ ПАР	471
ДЬОМІНА Е.А., МИХАЙЛЕНКО В.М. ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ОКСИДІВ АЗОТУ В РОЗВИТКУ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ЕФЕКТІВ ПРИ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ	475
ДМИТРУК І.М., ТИРКУС М. Я., МАКУХ Г.В., КЩЕРА Н.І., ГНАТЕЙКО О.З., ПОЛЩУК Р.С., ЦИМБАЛЮК І.П., ДОРОШ О.І., ТРОЯНОВСЬКА О.О., КУПЧАК О.І., КОЗЛОВА О.І., СТЕПАНЮК О.І. АНАЛІЗ ПОЛІМОРФНОГО ЛОКУСУ G308A ГЕНА TNF- α У ОНКОЛОГІЧНИХ ХВОРИХ.	480
ЗУЕВА М.И., АТРАМЕНТОВА Л.А. ПОЛИМОРФИЗМ 1258G/A ГЕНА SPINK5 У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ	484
КОЦАРЕНКО К.В., ЛЫЛО В.В., МАЦЕВИЧ Л.Л., РУБАН Т.А., ЛУКАШ Л.Л. ЦИТОКИН LIF КАК МОДУЛЯТОР ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>MGMT</i> В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	489
ЛУКАШ Л.Л., ЯЦИШИНА А.П., КУШНИРУК В.О., ПИДПАЛА О.В. РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОГО ЧЕЛОВЕКА <i>IN VITRO</i>	493
ЛУЧКО Е.Н. МИГРАЦИЯ И ЭМОЦИОНАЛЬНЫЙ СТРЕСС КАК ФАКТОРЫ РИСКА ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ.	499
МАКУХ Г.В., ЧОРНА Л.Б., ТРЕТЯК Б.І., ТИРКУС М.Я., ЛОТОЦЬКА - САВЧАК О. Ю., ЗАСТАВНА Д.В. СПЕКТР ТА ЧАСТОТА АЛЕЛЬНИХ ВАРІАНТІВ ГЕНІВ ФОЛАТНОГО ОБМІНУ (<i>MTHFR</i> , <i>MTR</i> , <i>MTRR</i>), ГЕМОСТАЗУ (<i>FV</i> , <i>FII</i>) ТА ІНСУЛІН – ПОДІБНОГО ФАКТОРУ РОСТУ – ІІ (<i>IGF-II</i>) У САМОВІЛЬНИХ АБОРТУСІВ	503
МОРДЕРЕР Д.С., НИКОЛАСНКО О.В., СКРИПКИНА І.Я., ЦИБА Л.О., РИНДИЧ А.В. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АДАПТОРНОГО БІЛКА ITSN1 З СИНАПТИЧНИМИ БІЛКАМИ MAP6 (STOP) ТА СИНАПСИНОМ	508

ПISKУН Р.П., ГОРБАТЮК С.М., НИКОЛАЕНКО О.О., ШЕВЧУК Т.И. ГЕННОМОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОРГАНИЗМЫ – ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ	513
ПОЧЕРНЯЕВ А.К., ХУ ЯН, АХМАТ К. КИВАН, ПОЧЕРНЯЕВА К.К. СТРУКТУРА ЦЕНТРАЛЬНОУКРАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ПО SNP Q223R ГЕНА РЕЦЕПТОРА ЛЕПТИНА <i>lepr</i>	518
РУДЕНКО С.С., ГЕРАЩЕНКО Г.В., ГОРДНОК В.В., КОНДРАТОВ А.Г., КАШУБА В.І. <i>PRM1M</i> ЯК ПОТЕНЦІЙНИЙ ГЕН СУПРЕСОР РОСТУ ПУХЛИН У СВІТЛОКЛІТИННИХ КАРЦИНОМАХ НИРОК ЛЮДИНИ	522
ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В., СОСНІНА К.О., ГЕЛЬНЕР Н.В. ОСОБЛИВОСТІ РОЗПОДІЛУ HLA-АНТИГЕНІВ ТА АЛЕЛЬНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ HLA-ГЕНІВ У ПОДРУЖНИХ ПАР З РЕПРОДУКТИВНИМИ ВТРАТАМИ ЗАХІДНОУКРАЇНСЬКОГО РЕГІОНУ	526
ТКАЧ І.Р., ГУЛЕЮК Н.Л., БЕЗКОРОВАЙНА Г.М., МІКУЛА М.І., КРУК Ю.А. ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КАРІОТИПУ В ЧОЛОВІКІВ З ПОРУШЕННЯМИ РЕПРОДУКТИВНОЇ ФУНКЦІЇ	531
ТЮТЮННИКОВА А.П., КРАВЧУК І.В., МАЛЮТА О.В., ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЄСВ Г.Д. РОЛЬ VCR ТА АСОЦІЙОВАНИХ ІЗ НИМ БІЛКІВ У РОЗВИТКУ МІСЛОПРОЛІФЕРАТИВНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ	536
УТЕВСКАЯ О.М., ПШЕНИЧНОВ А.С., БАЛАНОВСКИЙ О.П., ФРОЛОВА С.А., КУЗНЕЦОВА М.А., РОМАНОВ А.Г., ШАНЬКО А.В., ЧУХРЯЕВА М.И., БАРАНОВА Е.Е., ТЕУЧЕЖ И.Э., СХАЛЯХО Р.А., ТЫЖНЕНКО Т.В., ПОЧЕШХОВА Э.А., ВИЛЛЕМС Р., БАЛАНОВСКАЯ Е.В., АТРАМЕНТОВА Л.А. ГЕОГРАФИЧЕСКИЕ И ИСТОРИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ В ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНОФОНДА НАСЕЛЕНИЯ УКРАИНЫ И ЮГА РОССИИ (АНАЛИЗ ДНК-МАРКЁРОВ)	541
ФЕДОТА А.М., МОВЧАН Н.В., РЫЖКО П.П., ВОРОНЦОВ В.М. ПОПУЛЯЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИХТИОЗА В ХАРЬКОВСКОЙ ОБЛАСТИ.	545
ФЕДОТА А.М., СОЛОДЯНКИН А.С., СОЛОДЯНКИНА Е.А., РЫЖКО П.П., ВОРОНЦОВ В.М., РОЩЕНЮК Л.В. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ С677Т И А1298С ГЕНА MTHFR У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ	550
ШАПОШНИК Л.А., ЛЫЛО В.В., ЛУКАШ Л.І. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА	554

ШАПОШНИКОВА В.М., КЛИМЕНКО С.В., НЕУМЕРЖИЦКА Л.В., БАРИЛЯК І.Р.	
СТРУКТУРА ВРОДЖЕНОЇ ПАТОЛОГІЇ СЕРЕД НОВОНАРОДЖЕНИХ ЧЕРКАСЬКОЇ ОБЛАСТІ	557
ШВАЧКО Л. П.	
СПЕЦИФІЧНА ЕПІГЕНЕТИЧНА ДЕКОМПАКТИЗАЦІЯ ХРОМАТИНУ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗІ	561
ШПИЛЕВАЯ С.П., АНДРИЕНКО В.И., РЫМАРЬ С.Е., СУХОРАДА Е.М., КОРДЮМ В.А.	
ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОВИНЫ ЧЕЛОВЕКА ..	566

МОНОГРАФІЯ

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ФАКТОРЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ЭВОЛЮЦИИ ОРГАНИЗМОВ

Том 11

Технічний редактор *Чабан М. С.*
Коректори: *Руденко Г. М., Дітель О. А.*
Комп'ютерна верстка *Кожмана С. Я.*
Художнє оформлення обкладинки *Музиченка Є. Ю.*

Підписано до друку 24.06.2011. Формат 60×84 ¹/₁₆. Папір офс. № 1.
Гарнітура “Таймс”. Друк офс. Ум. друк. арк. 33,95. Обл.-вид. арк. 34,6.
Наклад 300 прим. Зам. 391.

Видавництво “ЛОГОС”
Свідоцтво ДК № 201 від 27.09.2000 р.
01030, Київ-30, вул. Богдана Хмельницького, 10, тел. 235-60-03