

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

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

ТОМ 7

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

ФАКТОРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕВОЛЮЦІЇ ОРГАНІЗМІВ

Збірник наукових праць

ТОМ 7

Присвячено:

*200-річчю від дня народження
Чарльза Роберта Дарвіна*

*125-річчю від дня народження
І.І.Шмальгаузена*

**Київ
ЛОГОС
2009**

РЕДАКЦІЙНА КОЛЕГІЯ

Кунах В.А. – д-р біол. наук, чл.- кор. НАНУ (головний редактор); Дубровна О.В. – д-р біол. наук (заст.головного редактора); Барияк І.Р. – д - р мед. наук; Блюм Я.Б. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Вагіна І.М. – канд. біол.наук; Ельська 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. УААН; Моргун В.В. – д-р біол. наук, академік НАНУ; Сиволап Ю.М. – д-р біол. наук, академік УААН; Созінов О.О. – д-р біол. наук, академік НАНУ

*Затверджено до друку рішенням
вченої ради Інституту молекулярної біології
і генетики НАН України (протокол №7 від 30 травня)*

УДК 578.08.631.52

Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр./Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова

/К.: Логос, 2009.-

Т.7

У збірнику представлено наукові праці вітчизняних та зарубіжних спеціалістів, написані спеціально для даного видання, присвяченого 200-річчю від дня народження Ч.Дарвіна та 125-річчя від дня народження І.І.Шмальгаузена. В оглядових і експериментальних статтях наведено дані з основних напрямів генетико - біотехнологічного розширення генетичної мінливості живих організмів, генетики господарсько - цінних ознак рослин і тварин, 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; результати аналізу та оцінки генетичних ресурсів.

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

МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

БОРХЕРТ Е.В.¹, КУДРЯВЦЕВ А.М.¹, ОКУНЕВА И.Б.², РЕБРИКОВ Д.В.¹

¹Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова Российской академии наук

²Главный ботанический сад им. Н.В.Цицина Российской академии наук

TY1-COPIA-LIKE РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*SYRINGA VULGARIS* L.)

К настоящему моменту существует огромное разнообразие сортов сирени, в мире насчитывается несколько тысяч различных сортов сирени, среди которых особенно многочисленны и распространены сорта сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.), что связано с их высокими декоративными качествами. Сорта сирени обыкновенной сильно варьируют по форме, окраске цветков и по размерам соцветий. Однако, за исключением относительно короткого периода цветения сорта сирени обыкновенной фенотипически практически неотличимы друг от друга (исключение составляют сорта с пестроокрашенными листьями), что делает трудным идентификацию сортов. Поэтому в настоящее время наиболее точным является определение сортовой принадлежности того или иного растения в период цветения. Так же представляется весьма затруднительной идентификация сортов сирени обыкновенной на ранних этапах онтогенеза и при микроклональном размножении.

Решить данную проблему можно используя молекулярно-генетические методы идентификации. Однако генетика сирени является малоизученной областью, поэтому для создания маркеров необходимо выборочное изучение и определение последовательности отдельных участков генома сирени, с тем, чтобы на основе полученных данных, разработать надежные молекулярно-генетические маркеры, позволяющие определять сортовую принадлежность того или иного растения сирени на любом этапе его развития.

Однако, сирень является генетически малоизученным объектом, что затрудняет создание молекулярно-генетических маркеров. Поэтому необходимым этапом в создании таких маркеров является изучение молекулярной структуры генома сирени в частности обнаружение ретроэлементов сирени обыкновенной. С тем чтобы в дальнейшем использовать полученные данные при разработке молекулярно-генетического подхода к маркированию сортов сирени обыкновенной. Целью данной работы является обнаружение у сирени обыкновенной ретроэлементов и секвенирование отдельных участков этих мобильных генетических элементов с возможной последующей перспективой использования полученных данных для создания генетических маркеров направленных именно на выявление межсортовых различий у сирени обыкновенной.

Известно, что у различных видов растений генетические мобильные элементы имеют сходную структуру и обладают высококонсервативными участками. При этом места встраивания мобильных генетических элементов у различных видов растений варьируют весьма сильно, что связано со случайностью встройки данных элементов в геном. При анализе имеющихся доступных данных сиквенсов мобильных элементов у отдельных представителей семейств, относительно близких роду сирень. Анализу были подвергнуты ретроэлементы табака (*Nicotiana tabacum*), батата (*Ipomoea batatas*), винограда (*Vitis vinifera*), томата (*Solanum lycopersicum*) и апельсина (*Citrus sinensis*). В результате анализа было установлено наличие нескольких идентичных участков внутри мобильных элементов, что позволило выдвинуть гипотезу о существовании и у сирени подобных участков, поскольку необходимых данных о строении ретроэлементов у сирени не было обнаружено.

На основе обнаруженных участков было создано 6 праймеров. Их предполагаемое взаимное расположение с указанием предполагаемых длин амплифицируемых фрагментов показано на рисунке 1.

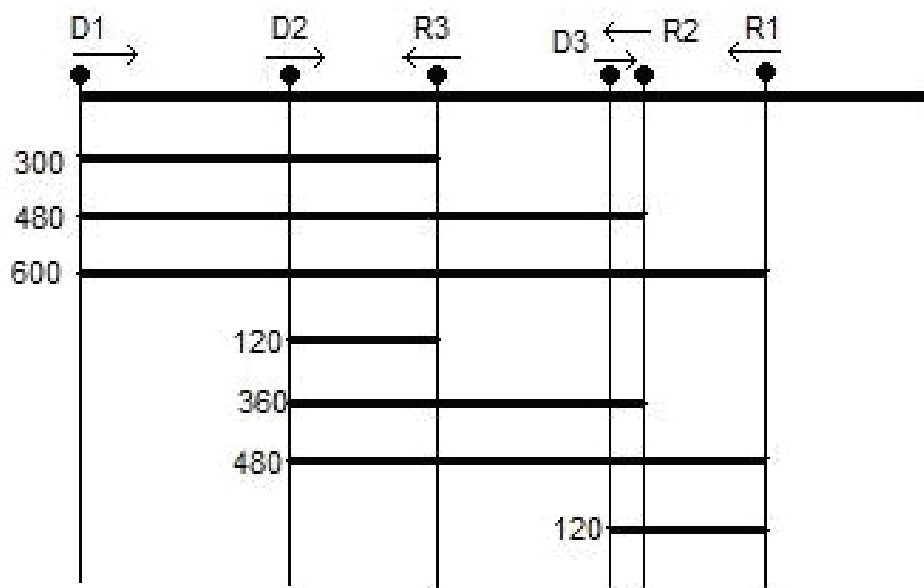


Рисунок 1. Взаимное расположение праймеров с указанием длин фрагментов.

В схеме стрелками указано направление амплификации, буквами обозначены праймеры с указанием их условного номера. Горизонтальными линиями показаны фрагменты, получаемые с той или парой праймеров, слева указана предполагаемая длина полученного фрагмента на основании имеющихся теоретических данных.

По результатам работы с 7 возможными комбинациями праймеров были получены фрагменты, которые соответствовали теоретически ожидаемым длинам. Эти фрагменты были в дальнейшем подвергнуты клонированию и секвенированию. Результатом стало получение 2-х достаточно длинных сиквенсов фрагментов 273 и 489 п.н. соответственно. Анализ данных показал, что имеющиеся фрагменты, являющиеся частью ретроэлемента, относятся к двум различным транспозонам. В результате последующих работ по genome walking длины полученных сиквенсов были увеличены и составили 613 п.н. и 1011 п.н. соответственно. К дальнейшим перспективам работы следует отнести genome walking, с тем, чтобы получить данные о месте интеграции ретроэлемента в геном сирени обыкновенной. И на основе сиквенсов полученных данных разработать молекулярные маркеры сирени обыкновенной.

Литература

1. Лунова З.С., Михайлов Е.А., Судакова Е.А. Сирень // Москва: Агропромиздат, 1989.- 256 с.
2. Мельникова Н.В., Борхерт Е.В., Мартынов С.П., Окунева И.Б., Молканова О.И., Упельник В.П., Кудрявцев А.М. Использование молекулярно-генетических маркеров для верификации коллекций in vitro сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.)// Москва: Генетика, 2009, том 45, №1, с. 97–103.
3. Shagin D.A., Lukyanov K.A., Vagner L.L., Matz M.V. Regulation of average length of complex PCR product // Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, № 18.
4. Matz M., Shagin D., Bogdanova E., Britanova O., Lukyanov S., Diatchenko L., Chenchik A. Amplification of DNA ends based on template-switching effect and step-out PCR// Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, №6, p. 1558-1560.

Резюме

Разработан подход в обнаружении ретротранспозонов на сирени обыкновенной. При использовании данного подхода обнаружены два различных ретротранспозона у сирени. Получены последовательности части каждого транспозона.

Розроблено підхід у виявленні ретротранспозонів у бузку звичайному. При використанні даного підходу виявлено два різних ретротранспозона у бузку. Отримані послідовності частини кожного транспозона.

An approach to the detection of retrotransposons of common lilac was proposed. Two different retrotransposons of the lilac were found with using of this approach. Partial sequences of each retrotransposon were obtained.

ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В.

Институт цитологии и генетики СО РАН,

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

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ЭПИМУТАГЕНОМ «ТРИТОН X-100» НА ОРГАНИЗАЦИЮ ЛОКУСА *Adh1* САХАРНОЙ СВЕКЛЫ,

Ранее нами была предложена модификация метода ISSR-амплификации (inter-simple sequence repeat, «между повторяющихся простых последовательностей») [1-3]. В отличие от базового метода, основанного на применении в индивидуальном эксперименте одиночного микросателлитного праймера для ПЦР [1], модифицированный метод предполагает использование микросателлитного праймера в паре с праймером, специфичным к целевому локусу. Это позволяет увеличить специфичность и упростить структуру получаемых ПЦР-профилей [2, 3].

Используя модифицированный метод ISSR-амплификации при изучении ДНК листьев агамоспермных потомков гетерозиготных растений сахарной свеклы, мы обнаружили полиморфизм ПЦР-профилей локуса *Adh1*, контролирующего фермент алкогольдегидрогеназа (ADH). Родительское растение, имеющее в геноме один *F* и один *S* аллель локуса *Adh1*, дало потомство, в котором обнаружилось четыре типа ПЦР-профилей *F*-аллеля и два типа ПЦР-профилей *S*-аллеля. Изоферментные спектры гетерозигот различались между собой по относительной активности аллельных изоформ и, следовательно, по уровню экспрессии аллелей *Adh1-F* и *Adh1-S* [2-4].

В ходе последующих исследований нами были выявлены тканевые различия ПЦР-профилей локуса *Adh1* у сахарной свеклы. Обнаружилось отсутствие разнообразия ПЦР-профилей, полученных на корневой ДНК родственных растений, тогда как соответствующие ПЦР-профили, полученные на ДНК листьев, отличались [5]. Выявленные различия ПЦР-профилей локуса *Adh1* разных тканей свидетельствует о тканевых различиях организации хромосом. Выявление этих различий говорит в пользу гипотезы о многомерности кодирования наследственной информации у растений [6, 7]. В основе этой гипотезы лежит предположение о дифференциальной эндоредупликации различных районов хромосомы. Известно, что дифференцировка тканей растения сопровождается эндоредупликацией хромосом [8]. Можно предположить, что полиморфизм ПЦР-профилей обусловлен разной степенью эндоредупликации района хромосомы, несущего локус *Adh1*, у исследуемых растений. Поскольку важную роль в структурно-функциональной организации генома играет взаимодействие хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом, не исключено, что степень эндоредупликации хромосом или их отдельных участков может, так или иначе, зависеть от контакта с ядерной мембраной. Поэтому нарушение такого взаимодействия может сказаться как на степени эндоредупликации, так и на характере получаемых ПЦР-профилей исследуемого района хромосомы. Проверке этого предположения посвящена данная работа. Для нарушения связи хромосом с ядерной мембраной взят детергент Тритон X-100. В связи с этим проведено сравнение ПЦР-профилей, получаемых на матрице ДНК контрольных и обработанных Тритоном X-100 растений.

Материалы и методы

Растительный материал. Для исследования были взяты листья растений сахарной свеклы, выращенных из гибридных семян, полученных от скрещивания двух растений, различающихся по локусу *Adh1*. Материнское растение было гетерозиготным и имело генотип *Adh1-F/Adh1-S*, а отцовское растение имело генотип *Adh1-F/Adh1-F*.

Обработка прорастающих семян Тритоном X-100. Сухие семена сахарной свеклы замачивали в 0.1% растворе Тритона X-100 в течение 22 часов в термостате при 29 градусах Цельсия, затем отмывали водой от Тритона X-100, проращивали в термостате и высаживали в гидропонную теплицу, где растения выращивали при искусственном освещении и минеральном питании по Кноппу.

Электрофоретическое разделение изоферментов. Определение фенотипов растений по ферменту алкогольдегидрогеназа проводили после его предварительной индукции, осуществляемой полным погружением срезанных листьев в воду при комнатной температуре на 24 часа. Экстракцию АДН после индукции осуществляли, растирая высечки листьев в ступке при 4⁰С в 0.2 V экстракционной смеси, представляющей собой 0.1М трис-НСl (рН 8.3), 0.3% динатриевой соли ЭДТА, 3.6% сахарозы и 0.3% дитиотрейтола. Электрофорез в крахмальном геле и окрашивание электрофореграмм проводили по методам, описанным ранее [9, 10].

Выделение ДНК, ПЦР-амплификация. Суммарную ДНК растений выделяли из 200 мг свежих листьев или корней стандартным СТАВ-методом [11]. Для проведения ПЦР-амплификации была использована следующая пара праймеров: *Adh1r* (5'-act(ct)a-cagca-ag(ct)cc-(ct)ac(ct)g-ctcc-3'), специфичный к локусу *Adh1*, и микросателлитный *Mic2* (5'-gacag-acaga-cagac-a-3'). 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

Методом электрофореза было установлено, что полученное потомство представлено двумя фенотипическими классами АДН1-FF и АДН1-FS.

Для проведения ПЦР нами был использован микросателлитный праймер *Mic2* в паре со специфичным к локусу *Adh1* праймером *Adh1r*, ориентация которого позволяет анализировать 5'-область гена алкогольдегидрогеназы. Как в контрольных, так и в опытных растениях выявлен полиморфизм ПЦР-профилей локуса *Adh1*. Однако какой-либо корреляции между АДН-фенотипами и ПЦР-профилями в настоящее время пока не установлено. В то же время сравнение ПЦР-профилей у контрольных и обработанных Тритоном X-100 растений выявило четкие различия.

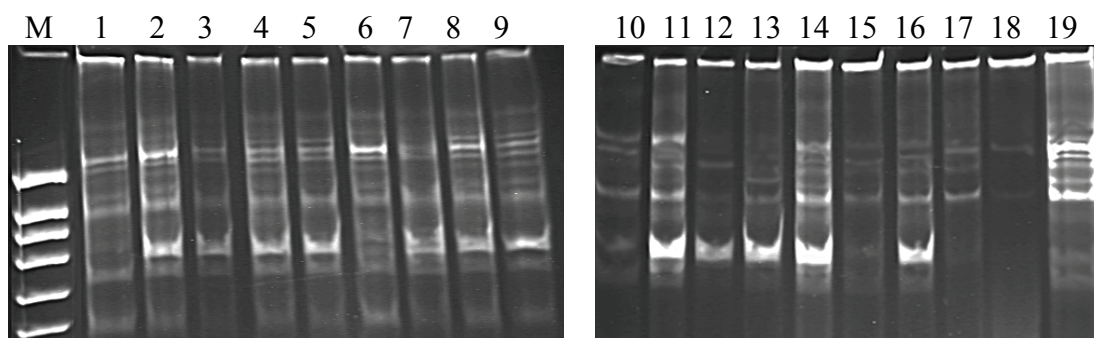


Рис 1. ПЦР-профили, полученные на матрице ДНК контрольных растений (1-9 дорожки) и растений, обработанных Тритоном X-100 (10-19 дорожки). М – маркер молекулярного веса ДНК pBlueScript/MspI.

На электрофореграммах видно, что на ПЦР-профилях обработанных детергентом растений количество полос меньше, чем на ПЦР-профилях контрольных растений, причем это уменьшение происходит, в основном, за счет более высокомолекулярных фрагментов ДНК. Воздействие Тритона X-100 проявилось не у всех растений, однако изменение ПЦР-профилей у других растений под влиянием детергента подтверждает известные данные о том, что контакт хромосом с ядерной мембраной играет существенную роль в организации генома у эукариот. В предыдущих исследованиях нами был выявлен полиморфизм ПЦР-профилей в листьях растений, имеющих одинаковый фенотип по ферменту АДН, а также был выявлен тканевой полиморфизм ПЦР-профилей в пределах одного и того же растения. Нами было выдвинуто предположение о том, что эти различия обусловлены разным уровнем эндоредупликации района, содержащего локус *Adh1*. Реакция ПЦР-профилей на воздействие Тритона X-100 позволяет предположить, что существует связь между уровнем эндоредупликации участков хромосом и контактом этих участков с ядерной мембраной и ядерным матриксом. В то же время необходимо отметить, что с момента воздействия Тритоном X-100 на семена до анализа ПЦР-профилей в листьях растений прошло длительное время и, соответственно, большое число клеточных делений. Отсюда можно заключить, что изменения, вызванные Тритоном X-100 в ядерной мембране и, по-видимому, в хромосомах сохраняются в ряду клеточных поколений. Это позволяет рассматривать Тритон X-100 как эпимутаген.

Выводы

Обработка прорастающих семян Тритоном X-100 приводит к изменению ПЦР-профилей у опытных растений по сравнению с контрольными растениями. Это свидетельствует о зависимости организации локуса *Adh1* сахарной свеклы от взаимодействия хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом.

Работа финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009-2011 гг. «Индукция эпигенетических изменений как новый эффективный метод создания исходных селекционных форм растений».

Литература

1. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // *Genomics*. -1994. -№ 20. - P. 176-183.
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. Vinichenko N.A., Kirikovich S.S., Levites E.V. The genetic instability of the *Adh1* locus alleles in sugar beet agamospermy progeny // *Sugar Tech*. - 2006. - vol. 8, № 4. - P. 288-291.
4. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Полиморфизм ПЦР-профилей и экспрессии аллелей локуса *Adh1* в агамоспермных потомствах сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // *Генетика*. - 2008. – т. 44, № 9. - С. 1252-1256.
5. Виниченко Н.А., Кирикович С.С., Левитес Е.В. Тканевые различия в организации локуса *Adh1* сахарной свеклы // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології (Збірник наукових праць)*. - Київ: «Логос». - 2007. -т. 2. - С. 247-251.
6. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // *Sugar Tech*. - 2005. - vol. 7, № 2-3. - P. 67–70.

7. 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>
8. Nagl W. Nuclear organization // Ann. Rev. Plant Physiol. - 1976. – vol. 27. - P. 39–69.
9. Schwartz D. The genetic control of alcohol dehydrogenase in maize: gene duplication and repression // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1966. - vol. 56. - P. 1431-143.
10. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. - Новосибирск: Наука, СО РАН. - 1986. - 145с.
11. 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

С помощью модифицированного метода ISSR-амплификации было показано влияние обработки Тритоном X-100 на организацию локуса *Adh1* сахарной свеклы. Обнаружились различия между ПЦР-профилями, полученными на ДНК листьев обработанных и контрольных растений.

Effect of Triton X-100 on *Adh1* locus organization of sugar-beet was demonstrated by means of modified ISSR-amplification method. PCR-profiles obtained from leaf DNA of treated and control plants were different.

¹ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., ²ЭЛЬКОНИН Л.А., ³ГОРБУНОВА В.Ю.

¹Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, проспект Октября, 71, e-mail: apomixis@anrb.ru

²ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,

Россия, 410010, Саратов, ул. Тулайкова, 7, elkonin@mail.saratov.ru

³ГОУ ВПО «Башкирский государственный педагогический университет»,

Россия, 450000, Уфа, проспект Октябрьской революции, 3а, e-mail: obg_bspu@mail.ru

МАРКИРОВАНИЕ ДИПЛОСПОРИЧЕСКОГО АПОМИКСИСА У СЕВЕРОАМЕРИКАНСКИХ ЭНДЕМИКОВ *BOECHERA* МЕТОДОМ ТРАНСПОЗОН ДИСПЛЕЯ

Исследования в области генетики бесполосеменного размножения, или апомиксиса, у цветковых растений обоснованно относят к числу прорывных исследований (Gerashchenkov and Rozhnova, 2004; Ozias-Akins and van Dijk, 2007). Тем не менее, возможное участие мобильных генетических элементов (МГЭ) в манифестации этого признака выпало из поля зрения исследователей. Как правило, роль МГЭ при апомиксисе у растений более трудно установить, нежели у животных, в связи со сложной организацией репродуктивных процессов (чередование поколений гаметофита и спорофита в жизненном цикле, двойное оплодотворение и т.д.), а также отсутствием подходящего материала. Все это делает проблемным анализ эпигенетической регуляции бесполосеменного размножения у растений. Возможно по этой причине, начиная с первых экспериментов Менделя на *Hieracium* и вплоть до настоящего времени, молекулярные механизмы, контролирующие апомиксис у растений, остаются слабо понятыми. Очевидно, особенности структурно-функциональной организации МГЭ позволяют рассматривать их в качестве потенциальных молекулярных маркеров в генетическом анализе систем размножения цветковых растений. Цель работы – скрининг молекулярных маркеров апомиксиса методом транспозон дисплея из основных групп 1 и 2 классов МГЭ у форм *Boechera* с половой и бесполосеменной репродукцией.

Материалы и методы

В исследовании были использованы растения *B. holboellii* с половым и бесполосеменным размножением из голландской и германской коллекций (Табл.1.). Тотальную ДНК экстрагировали из проростков и листьев растений фенольно-детергентным методом. Для скрининга молекулярных маркеров применяли адаптированный метод транспозон дисплея. Амплифицированные фрагменты фракционировали в 1.0–1.5% агарозных гелях, которые окрашивали бромистым этидием, либо в 5.1% полиакриламидных гелях, которые окрашивали серебром.

Результаты и обсуждение

Впервые обнаружены потенциальные маркеры, ассоциированные с апомиксисом у бочечер как из нидерландской, так и германской коллекций. Методом транспозон дисплея выявлены следующие маркеры, ассоциированные с апомиксиса. Это маркеры на основе non-LTR транспозона, принадлежащего классу 1 МГЭ, C_{in}4a+V_{tat} с размерами 220 п.о., 240 п.о. и 380 п.о., и маркер на основе ДНК-транспозона, принадлежащего классу 2 МГЭ, Isaak+V_{caa} размером 230 п.о. (рис.1). В настоящее время идет секвенирование полученных ДНК маркеров.

Вне всякого сомнения, видовой комплекс *Boechnera* – привлекательная система для изучения апомиксиса, поскольку это высоко полиморфный таксон, включающий как сексуальные, так и апомиктические формы, проявляющие апомиксис на разных уровнях пloidности, включая диплоидный (крайне редкое явление при апомиксисе), триплоидный и тетраплоидный (Naumova et al, 2001). Развитие зародышевых мешков характеризуется

-- при апомейозе диплоспорическим образованием диад (Taraxacum-тип) и

--при мейозе мейотическим образованием тетрад (Polygonum-тип).

В настоящее время ведется активный поиск биохимических и молекулярно-генетических маркеров апомиксиса у различных видов цветковых растений, и в том числе у *Boechnera* (Gerashchenkov and Rozhnova, 2007).

Таблица 1.

Описание форм *Boechnera* с бесполосеменным (apo) и половым (sex) способами репродукции

##	Растительные генотипы	Источник происхождения
1	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 3x #36-1 (apo)	Dr. Kim Boutilier, Plant Research International, Netherlands
2	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 3x #6-3 (apo)	
3	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 3x #5-10 (apo)	
4	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 2x #4-2 (apo)	
5	<i>Boechnera holboellii</i> Colorado 2x #8-7 (apo)	
6	<i>Boechnera stricta</i> 2x #10 (sex)	
7	<i>Boechnera holboellii</i> Rc#1 (apo)	Dr. Thomas Mitchell-Olds, Max Planck Institute of Chemical Ecology, Germany
8	<i>Boechnera holboellii</i> cg#25 (apo)	
9	<i>Boechnera stricta</i> 4 (sex)	
10	<i>Boechnera stricta</i> 11 (sex)	

Геномы фактически всех видов с половым размножением содержат МГЭ (Arkhipova and Meselson, 2005). Тем не менее, их участие в половом процессе в значительной степени остается предметом теоретических спекуляций (Попадьин, 2003; Arkhipova and Meselson, 2005). Очевидно, особенности структурно-функциональной организации МГЭ позволяют рассматривать их в качестве потенциальных маркеров в генетическом анализе систем размножения цветковых растений.

Физическое и функциональное картирование геномной области, сцепленной с апоспорией у *Pennisetum squamulatum* и *Cenchrus ciliaris* (семейство *Poaceae*), осуществленное группой Пэгги Озиас-Акинс (США), показало, что маркерный регион богат транспозонами и ретротранспозонами и беден генами (Ozias-Akins and van Dijk,

2007). В частности этот регион включал высокоповторенные последовательности из Oriе-2-подобного семейства РЭ, которые, впрочем, обычны в этой области генома.

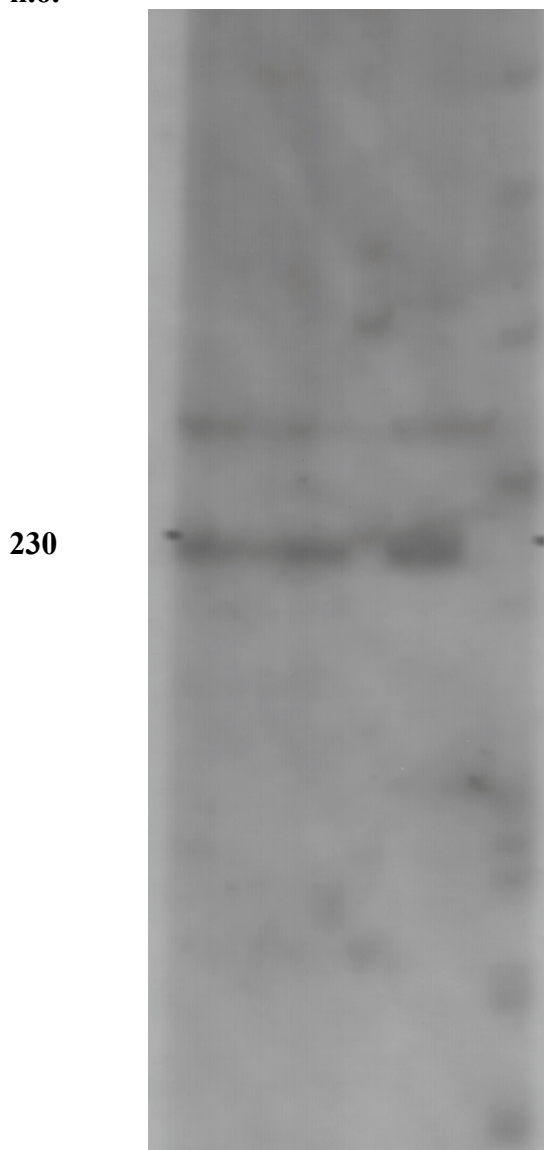
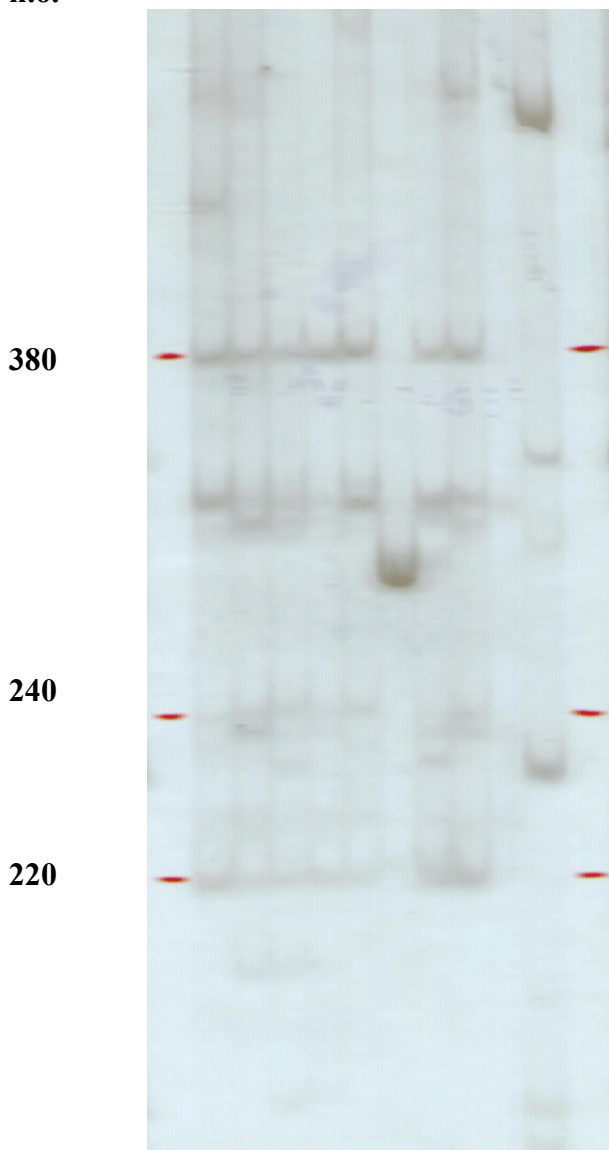
В работе канадских коллег, исследовавших генетический полиморфизм РЭ у 4-х растительных видов "с облигатным апомиксисом", сообщалось, что авторы не обнаружили достоверных различий нуклеотидных замен исследованных РЭ у асексуальных форм растений в сравнении с "половыми" РЭ (Docking et al, 2006).

Полученные нами маркеры будут использованы далее в экспериментах по верификации на ближайших родственниках бочечер из семейства *Brassicaceae*, а также для клонирования и секвенирования генетических последовательностей, потенциально вовлеченных в апомиксис у растений.

Анализ литературы показывает, что скрининг молекулярных маркеров бесполосемянности у растений среди МГЭ прежде не проводился. Таким образом, полученные нами экспериментальные данные всецело носят оригинальный характер и могут свидетельствовать в пользу гипотезы о возможном участии МГЭ в генетическом контроле апомиксиса у *Boecheera*.

Размер, 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
п.о.

Размер, 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
п.о.



а

б

Рис.1. Молекулярные маркеры бесполосемянного размножения у североамериканских эндемиков *Boecheera* на основе

а) ретроэлемента Cin4a и б) ДНК-транспозона Isaak

1 – 10 – генотипы форм *Boechea* приведены в таблице 1.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ №№ 08-04-97011-р_поволжье_a, 08-04-97050-р_поволжье_a и 09-04-01153-а).

Выводы:

1. Исследовали генетический полиморфизм спектров МГЭ основных групп 1 и 2 классов у форм *Boechea* с половым и бесполосеменным способами размножения методом транспозон дисплея. Общее число праймерных комбинаций составило более 400 вариантов.

2. Впервые разработан и применен новый вариант транспозон дисплея на основе рестриктазы *CspBI*, показавший свою эффективность при решении поставленной цели.

3. Впервые экспериментально показаны ассоциации молекулярных маркеров на основе МГЭ обоих классов с бесполосеменным способом размножения у бочечер как из голландской, так и германской генетических коллекций.

4. Впервые обнаружены потенциальные маркеры, ассоциированный с диплоспорическим апомиксисом у бочечер одновременно из германской и нидерландской коллекций, а именно:

Cin4a+Vtat размером 220 п.о

Cin4a+Vtat размером 240 п.о

Cin4a+Vtat размером 380 п.о и

Isaak+Vcaa размером 230 п.о.

Литература

1. *Попадьин К.Ю.* Эволюция полового размножения: роль вредных мутаций и мобильных элементов // Журнал Общей Биологии.- 2003.- Т. 64, № 6.- С.463-478.

2. *Arkhipova I. and Meselson M.* Deleterious transposable elements and the extinction of asexuals // BioEssays.- 2005.- vol. 27, № 1.- P.76-85.

3. *Docking T.R., Saader F.E., Elliott M.C., Schoen D.J.* Retrotransposon sequence variation in four asexual plant species // J. Mol. Evol.- 2006.- vol. 62.- P.375–387.

4. *Gerashchenkov G., Rozhnova N.* Genetic control of gametophytic apomixis: current status of knowledge // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B.- 2004.- vol. 58, №. 5-6.- P.167-174.

5. *Gerashchenkov G., Rozhnova N., Gorbunova V. and Timirkaeva A.* The analysis of hormonal levels in top leaves and flower buds of the *Boechea* accessions with asexual (apomictic) and sexual (amphimictic) reproduction // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences.- 2007.- Section B, vol. 61, № 6.- P.1-7.

6. *Naumova T.N., van der Laak J., Osadtchiy J., Matzk F., Kravtchenko A., Bergervoet J., Ramulu K.S., Boutilier K.* Reproductive development in apomictic populations of *Arabis holboellii* (Brassicaceae) // Sex. Plant Reprod.- 2001.- vol. 14, №. 4.- P.195-200.

7. *Ozias-Akins P. and van Dijk P.J.* Mendelian genetics of apomixis in plants // Annu. Rev. Genet. 2007. vol. 41.- P.509–37.

Резюме

Исследовали генетический полиморфизм спектров основных групп 1 и 2 классов мобильных генетических элементов у североамериканских эндемичных форм *Boechea* методом транспозон дисплея. Впервые обнаружены четыре потенциальные маркера, ассоциированных с апомиксисом одновременно у бочечер из германской и голландской коллекций на основе транспозонов Cin4a и Isaak.

Spectra of genetic polymorphisms of the general groups of 1 and 2 classes of mobile genetic elements at North American endemic *Boecheera* accessions were investigated by transposon display technique. For the first time the potential markers on the basis Cin4a and Isaak associated with apomixis at *Boecheera* accessions from the German and Netherlands collections simultaneously were found out.

**КАРПОВ П.А.¹, ЕМЕЦ А.И.¹, МАТУСОВ В.Г.¹, НЫПОРКО А.Ю.¹,
НАДЕЖДИНА Е.С.^{2,3}, БЛЮМ Я.Б.¹**

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

² Институт белка РАН, Москва

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОМОЛОГОВ STE20-ПОДОБНЫХ СЕРИН/ТРЕОНИН ПРОТЕИНКИНАЗ

Серин-треониновые протеинкиназы дрожжей STE20 и их животные гомологи SLK (STE20-подобные серин/треонин-протеинкиназы) отвечают за регуляцию полярности клеток на различных стадиях клеточного цикла [1-3]. Показано, что в клетках дрожжей протеинкиназа STE20 активирует MAPKKK каскады [4], регулирует рост и обратную связь в условиях дефицита глюкозы [5], участвует в осмосенсорных Sho1-сигнальных путях [6], феромон-зависимой передаче сигналов [7], прямой регуляции апоптоза [8], фосфорилировании белков [9], регуляции роста псевдогифов [10], регуляции выхода из митоза [11], передаче сигналов во время роста мицелия [12], детерминации сайтов почкования клетки [13]. В клетках млекопитающих протеинкиназа SLK (LOSK) ассоциирована с микротрубочками и центросомами, а ее ингибирование приводит к дезориентации и беспорядочному расположению микротрубочек. Таким образом, LOSK обеспечивает радиальное расположение микротрубочек и необходима для правильной локализации аппарата Гольджи в различных типах клеток [14]. На основании аналогии с *Xenopus laevis* [15] предполагается, что SLK (гомолог xPlk1 *X. laevis*) может регулировать активность Plk1 (гомолога Plx1 *X. laevis*) [14, 16]. Считается, что SLK фосфорилируется протеинкиназами ATM или ATR, которые принимают участие в опосредовании клеточного ответа на повреждения ДНК [17]. Предполагаемая связь протеинкиназы SLK с процессом репарации ДНК подтверждается ее способностью индуцировать апоптоз путем непосредственного фосфорилирования и активации протеинкиназы-1, регулирующей апоптотические сигналы (ASK-1), с последующей активацией p38 митоген-активированной протеинкиназы, участвующей в MKK4/MKK7-JNK и MKK3/MKK6-p38 каскадах, контролирующей цитокинез и ответ на стресс [18]. Вероятно, этим свойством объясняется роль протеинкиназы SLK в регуляции клеточного деления, в частности, в контроле микротрубочек в интерфазе [14].

Для протеинкиназ SLK животных характерно наличие каталитического домена (порядка 250-260 аминокислотных остатков) в N-концевой области молекулы [19]. В свою очередь, каталитический домен (порядка 248-252 аминокислотных остатков) STE20 дрожжей расположен в C-концевой области молекулы [20]. Несмотря на различную локализацию, киназные домены STE20-подобных протеинкиназ животных и дрожжей имеет высокую степень сходства аминокислотных последовательностей. В свое время это явилось основой для биоинформационного предсказания SLK киназ у животных на основании их гомологии STE20 дрожжей [21].

В настоящее время информация о растительных гомологах STE20-подобных протеинкиназ практически отсутствует. Единственным потенциальным растительным гомологом является протеинкиназа SIK1 из *Arabidopsis thaliana* [21, GenBank:

GI:2352083]. Таким образом, целью нашего исследования являлся поиск растительных гомологов STE20-подобных протеинкиназ на основании данных биоинформационного сканирования баз данных с применением в качестве поисковых векторов аннотированных последовательностей каталитических доменов протеинкиназа SLK животных и STE20 дрожжей.

Материалы и методы Эталонные последовательности STE20-подобных протеинкиназ животных и дрожжей были взяты из базы данных Swiss-Prot (www.expasy.org) [23]. Поиск растительных гомологов производили путем BLASTp-сканирования базы данных UniProt (Swiss-Prot и TrEMBL) [23] против последовательностей каталитических доменов протеинкиназ SLK_HUMAN человека и STE20_YEAST из *Saccharomyces cerevisiae*. BLASTp-сканирование (SIB BLAST Network Service) выполняли при следующих параметрах: весовая матрица – BLOSUM62, порог E (число ожидаемых совпадений в случайной выборке) = 10 с подключением фильтров: «Filter the sequence for low-complexity regions» и «Gapped alignment») (www.expasy.org) [24]. Отбор растительных гомологов осуществляли на основании таких показателей, как процент идентичности последовательностей, процент их сходства и случайная ожидаемость этих результатов (E-value) [25].

Доменную архитектуру белков анализировали с применением сетевого инструмента SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) [26], а также на основании информации, представленной в базе данных UniProt. Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей выполняли с помощью программы Clustal X (2.0.5) (<http://www.clustal.org>) с применением серии матриц BLOSSUM [27].

Филогенетический анализ выполняли на основании результатов множественных выравниваний последовательностей протеинкиназных доменов [28, 29] с применением метода UPGMA [30]. Границы протеинкиназного домена определяли на основании моделей SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Визуализация и анализ дендрограмм осуществляли с помощью программ TreeView X Ver.5 [31] и MEGA4 [32].

Результаты и обсуждение. В результате BLASTp-сканирования UniProt против последовательности каталитического домена SLK_HUMAN были обнаружены растительные гомологи STE20-подобной протеинкиназы человека. Согласно данным BLASTp-сканирования UniProt, идентичность консенсусных областей достигала 45-46% при 65-66%-ном сходстве (Табл.), и, как показали результаты анализа в SMART, обнаруженные последовательности во всех случаях соответствовали каталитическим доменам серин-треониновых протеинкиназ. Все обнаруженные растительные гомологи STE20-подобных протеинкиназ депонированы в базе данных TrEMBL и обозначены как белки с неизвестной функцией. Исключение составляет только продукт O24527 из *A. thaliana*, представленный как предполагаемый STE20-гомолог - SLK1. Также было выполнено аналогичное сканирование базы данных UniProt с использованием в качестве поискового вектора последовательности каталитического домена STE20-протеинкиназы из *S. cerevisiae* (STE20_YEAST), являвшейся в свое время исходной последовательностью при поиске животных гомологов [33]. В результате была подтверждена гомология найденных растительных последовательностей STE20-подобным протеинкиназам. При этом идентичность консенсусных областей последовательности протеинкиназы STE20_YEAST составляла 38-40% при 58%-ном сходстве (Табл.).

После исключения дублирующихся статей базы данных на основании сопоставления координат соответствующих генов было выделено 9 растительных гомологов STE20-подобных протеинкиназ (Табл.), принадлежащих *Arabidopsis thaliana* (Q9LQA1, O24527), *Hordeum vulgare* var. *distichum* (Q9ARL7), *Oryza sativa* subsp. *japonica* (Q10CN6), *Oryza sativa* subsp. *indica* (B8AK85), *Physcomitrella patens* subsp. *patens* (A9RVK0), *Solanum chacoense* (B3GK00), *Sorghum bicolor* (Q8LKU7) и *Vitis vinifera* (A7P2E2).

Таблица – Растительные гомологи STE20-подобных серин-треониновых протеинкиназ, выделенные на основании результатов SIB-BLAST сканирования базы данных UniProt против каталитических доменов SLK из *Homo sapiens* и STE20 из *Saccharomyces cerevisiae*

Номер UniProt	Вид	Протяженность консенсуса			Математическое ожидание			Идентичность (%)			Сходство (%)			Гены (%)		
		SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST	SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST	SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST	SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST	SLK_HUMAN	STE20_YEAST	SLK_YEAST
A9RVK0	<i>Physcomitrella patens</i> subsp. patens	243	187	1e-62	46	66-47	65	58	2	2	1					
A7P2E2	<i>Vitis vinifera</i>	243	189	1e-62	46	2e-47	65	58	2	2	1					
Q9LQA1 (F4N2.1.17)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	242	190	2e-62	46	7e-48	66	58	2	2	1					
O24527 (SIK1)	-/-	242	190	2e-62	46	7e-48	66	58	2	2	1					
Q10CN6	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	241	188	4e-62	45	4e-47	65	58	2	2	1					
B8AK85	<i>Oryza sativa</i> subsp. indica	241	188	4e-62	45	4e-47	65	58	2	2	1					
Q8LKU7 (170F8.3)	<i>Sorghum bicolor</i>	241	187	5e-62	45	8e-47	65	58	2	2	1					
Q9ARL7	<i>Hordeum vulgare</i> var. distichum	239	184	1e-61	45	7e-46	65	58	2	2	1					
B3GK00	<i>Solanum chacoense</i>	238	187	3e-61	45	8e-47	66	58	2	2	1					

Примечание: SLK_HUMAN - STE20-подобная протеинкиназа из *Homo sapiens*; STE20_YEAST - протеинкиназа STE20 из *Saccharomyces cerevisiae*



Рис. 1 – Выравнивание последовательностей каталитических доменов STE20 протеинкиназ дрожжей, SLK протеинкиназ животных и их потенциальных растительных гомологов.

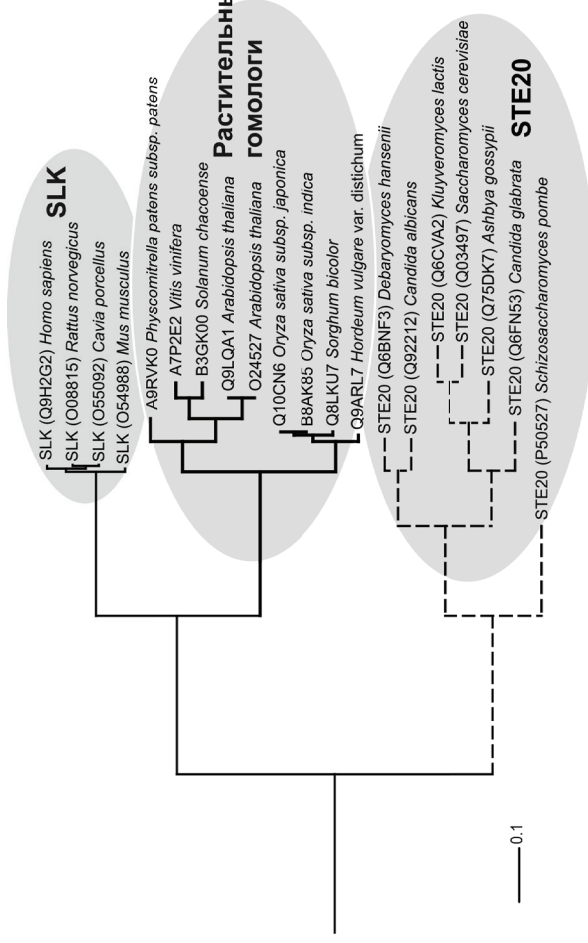


Рис.2 – Результаты филогенетического анализа близости животных, дрожжевых и растительных STE20-подобных киназ на основании сходства аминокислотных последовательностей их каталитических доменов.

Примечание: клады каталитический анализ выполнен с применением алгоритма UPGMA

Для определения положения группы найденных растительных протеинкиназ относительно групп STE20-подобных протеинкиназ животных и STE20-протеинкиназ дрожжей, было выполнено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей их каталитических доменов и последовательностей каталитических доменов экспериментально проверенных животных (SLK) и дрожжевых (STE20) протеинкиназ (Рис.1) и построено филогенетическое UPGMA древо (Рис.2). Полученные результаты подтверждают высокую степень консервативности найденных растительных доменов на уровне аминокислотных последовательностей каталитических доменов (идентичность = 87-100%; сходство = 95-100%). При этом выявленная группа растительных STE20-подобных протеинкиназ оказалась довольно близкой как животным SLK протеинкиназам (идентичность = 44-46%; сходство = 64-65%), так и STE20-протеинкиназам дрожжей (идентичность = 38-43%; сходство = 54-62%). Однако при этом наблюдается образование общей клады с животными SLK, что свидетельствует в пользу большего сходства животных SLK и потенциальных растительных гомологов, а также и об их большей эволюционной близости. При этом согласно данным кладиственного анализа и данным дистанции парных выравниваний, ближайшими гомологами STE20-подобных протеинкиназ представителей царства животных и царства растений являются протеинкиназа животного происхождения SLK_MOUSE из *Mus musculus* и растительные протеинкиназы A9RVK0 из мха *P. patens* subsp. *patens* (идентичность = 45%; сходство = 65%) и A7P2E2 из *V. vinifera* (идентичность=46%; сходство=65%).

Выводы. На основании гомологии последовательностей каталитических доменов обнаружено 9 растительных гомологов STE20-подобных серин-треониновых киназ. Показано, что ближайшими растительными гомологами STE20-подобных серин-треониновых протеинкиназ являются A9RVK0 из мха *Physcomitrella patens* subsp. *patens* и A7P2E2 из винограда *Vitis vinifera*.

Данная работа была выполнена в рамках проекта 08-04-90454: «Сравнительный анализ киномов микротрубочек животных и высших растений» (Совместный конкурс НАН Украины — РФФИ 2008-2009 г.).

Литература

1. Nichols C.B., Fraser J.A., Heitman J. PAK kinases Ste20 and Pak1 govern cell polarity at different stages of mating in *Cryptococcus neoformans* // Mol. Biol. Cell. – 2004. – Vol.15. – P. 4476–4489.
2. Yamada E., Tsujikawa K., Itoh S., Kameda Y., Kohama Y., Yamamoto H. Molecular cloning and characterization of a novel human STE20-like kinase, hSLK // Biochem. Biophys. Acta. – 2000. – Vol.1495, №3. – P.250-262.
3. Pytowski B., Hicklin D.J., Kornhaber G., Dellaratta D.V., Witte L. Identification and initial characterization of mSLK, a murine member of the STE20 family of kinases // Arch. Biochem. Biophys. – 1998. – Vol.359, №2. –P.310-319.
4. Wu C., Whiteway M., Thomas D.Y., Leberer E. Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae* // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol.270, №27. – P.15984-15992.
5. Froquet R., Cherix N., Birke R., Benghezal M., Cameroni E., Letourneur F., Mösch H.U., De Virgilio C., Cosson P. Control of cellular physiology by TM9 proteins in yeast and *Dictyostelium* // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol.283. №11. – P.6764-6772.
6. Tatebayashi K., Tanaka K., Yang H.Y., Yamamoto K., Matsushita Y., Tomida T., Imai M., Saito H. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway // EMBO J. – 2007. –V.26. №15. – P.3521-3533.

7. Moskow J.J., Gladfelter A.S., Lamson R.E., Pryciak P.M., Lew D.J. Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Cell Biol. – 2000. – Vol.20, №20. – P.7559-7571.
8. Ahn S.H., Cheung W.L., Hsu J.Y., Diaz R.L., Smith M.M., Allis C.D. Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae* // Cell. – 2005. – Vol.120, №1. – P.25-36.
9. Nespoli A., Vercillo R., di Nola L., Diani L., Giannattasio M., Plevani P., Muzi-Falconi M. Alk1 and Alk2 are two new cell cycle-regulated haspin-like proteins in budding yeast // Cell Cycle. – 2006. – Vol. 5, №13. – P.1464-1471.
10. Pan X., Heitman J. Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion // Mol. Cell Biol. – 2000. – Vol.20, №22. – P.8364-8372.
11. Sullivan M., Uhlmann F. A non-proteolytic function of separase links the onset of anaphase to mitotic exit // Nat. Cell Biol. – 2003. – Vol. 5, №3. – P.249-254.
12. Cullen P.J., Sabbagh W.Jr., Graham E., Irick M.M., van Olden E.K., Neal C., Delrow J., Bardwell L., Sprague G.F.Jr. A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast // Genes Dev. – 2004. – Vol.18, №14. – P.1695-1708.
13. Ni L., Snyder M. A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae* // Mol. Biol. Cell. – 2001. – Vol.12, №7. – P.2147-2170.
14. Burakov A.V., Zhapparova O.N., Kovalenko O.V., Zinovkina L.A., Potekhina E.S., Shanina N.A., Weiss D.G., Kuznetsov S.A., Nadezhdina E.S. Ste20-related Protein Kinase LOSK (SLK) controls microtubule radial array in interphase // MBC Online. - 2008. - Vol. 19, №5. – P.1952-1961.
15. Qian Y.W., Erikson E., Maller J.L. Purification and cloning of a protein kinase that phosphorylates and activates the polo-like kinase Plx1 // Science. – 1998. – 282. - P.1701-1704.
16. Ellinger-Ziegelbauer H., Karasuyama H., Yamada E., Tsujikawa K., Todokoro K., Nishida E. Ste20-like kinase (SLK), a regulatory kinase for polo-like kinase (Plk) during the G2/M transition in somatic cells // Genes Cells. – 2000. – Vol.5, №6. – P.491-498.
17. Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A., McDonald E.R. 3rd, Hurov K.E., Luo J., Bakalarski C.E., Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gygi S.P., Elledge S.J. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage // Science. – 2007. – Vol.316, №5828. – P.1160-1166.
18. Hao W., Takano T., Guillemette J., Papillon J., Ren G., Cybulsky A.V. Induction of apoptosis by the Ste20-like kinase SLK, a germinal center kinase that activates apoptosis signal-regulating kinase and p38 // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol.281, №6. – P.3075-3084.
19. Sabourin L.A., Rudnicki M.A. Induction of apoptosis by SLK, a Ste20-related kinase // Oncogene. – 1999. - Vol.18, №52. – P.7566-7575.
20. Cvrčková F., C. De Virgilio, E. Manser, Pringle J.R., Nasmyth K. Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast // Genes Dev. – 1995. – Vol.9. – P.1817-1830.
21. Lee K.-K., Yonehara S. Phosphorylation and dimerization regulate nucleocytoplasmic shuttling of mammalian STE20-like kinase (MST) // J. Biol. Chem. – 2002. - Vol.277, №14. - P.12351–12358.
22. Winge P., Brembu T., Bones A.M. Cloning of a *Arabidopsis thaliana* serine/threonine kinase with homology to yeast STE20 and mammalian stress activated kinases // Submitted (APR-1997) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases: GI:2352083. - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2352083>.

23. *The UniProt Consortium*. The Universal Protein Resource (UniProt) // Nucl. Acids Res. - 2008. – Vol.36. – D190-D195. [doi:10.1093/nar/gkm895].
24. *Korf I., Yandell M., Bedell J.* BLAST. O'Reilly & Associates, Sebastopol, 2003. – 368p.
25. *Claverie J.-M., Notredame C.* Bioinformatics for dummies. 2nd Ed. Wiley Publ., New York, 2007. – 436 p.
26. *Letunic I., Copley R.R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., Bork P.* SMART 5: domains in the context of genomes and networks // Nuc. Acids Res. – 2006. – Vol.34. - D257-D260. [doi:10.1093/nar/gkj104].
27. *Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G.* Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics. – 2007. – Vol.23. – P. 2947-2948.
28. *Chunhua Z., Brankle S., Mallery E., Szymanski D.B.* Composition and function of the *Arabidopsis* WAVE complex during epidermal morphogenesis. In: 17th Int. Conference on *Arabidopsis* Research. June 28 – July 2, 2006. Abstracts. – 2006. - #131.
29. *Hanks S.K., Quinn A.M.* Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members // Methods Enzymol. – 1991. – Vol.200. – P. 38-62.
30. *Nei M., Kumar S.* Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. - 2000. – 333 p.
31. *Page R.D.M.* TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers // Comp. Appl. in the Biosciences. - 1996. – Vol.12. – P. 357-358.
32. *Kumar S., Dudley J., Nei M., Tamura K.* MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences // Brief. in Bioinform. – 2008. – Vol. 9. – P. 299-306.
33. *Dan I., Watanabe N.M., Kusumi A.* The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades // Trends Cell Biol. – 2001. – Vol.11, №5. - P.220-230.

Резюме

Обнаружено 9 растительных гомологов STE20-подобных протеинкиназ животных и дрожжей. На основании сходства последовательностей каталитических доменов показано, что ближайшими растительными гомологами STE20-подобных протеинкиназ являются A9RVK0 из *Physcomitrella patens* subsp. *patens* и A7P2E2 из *Vitis vinifera*.

Знайдено 9 рослинних гомологів STE20-подібних протеїнкіназ тварин і дріжджів. На підставі подібності послідовностей каталітичних доменів встановлено, що найближчими рослинними гомологами STE20-подібних протеїнкіназ є A9RVK0 із *Physcomitrella patens* subsp. *patens* і A7P2E2 із *Vitis vinifera*.

It was identified 9 plant homologs of the animal and yeast Ste20-like protein kinases. It is shown, on the basis of similarity of sequences of catalytic domains, that nearest plant homologs of Ste20-like protein kinases are the A9RVK0 from *Physcomitrella patens* subsp. *patens* and A7P2E2 from *Vitis vinifera*.

КОЖУХОВА Н.Э.

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН

Украина, 65036, Одесса, ул. Овидиопольская дорога, 3, e-mail: natavolk@rambler.ru

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУКУРУЗЫ

Генетические ресурсы растений рассматриваются во всем мире как основной источник улучшения сельскохозяйственных культур на ближайшие десятилетия. Однако, по данным Организации по пищевым ресурсам и сельскому хозяйству (Food and Agriculture Organization) при ООН деградация плодородных почв, водных ресурсов, сокращение биоразнообразия культурных видов растений приобрели угрожающие размеры, фактически несовместимые с устойчивым развитием сельского хозяйства в глобальном масштабе [1]. Одним из основных компонентов сокращения биоразнообразия, по результатам анализа этой организации, является вытеснение стародавних сортов улучшенными или коммерческими вариантами. Причем несмотря на глобальный характер, этот процесс не контролируется [2].

Кукуруза — одна из наиболее продуктивных и распространенных зерновых культур в мировом земледелии. Среди сельскохозяйственных и выращиваемых растений она занимает третье место по валовым сборам зерна и посевным площадям и уступает только основным продовольственным культурам — пшенице и рису. Центр происхождения кукурузы — Центральная Америка, где произрастает ее наибольшее разнообразие, в т.ч. дикие сородичи. Однако, процесс сокращения биоразнообразия коснулся и кукурузы: утеряно 91 % кукурузы, сокращаются и популяции диких предковых видов кукурузы в Мексике [3].

Таким образом, изучение, сохранение и обогащение генетических ресурсов кукурузы является актуальной генетико-селекционной проблемой в связи с прогрессирующей эрозией генофонда культурных растений. Одной из центральных задач в сохранении биоразнообразия является решение вопроса: что сохранять и как отбирать то, что нуждается в сохранении в первую очередь. На ранних этапах разработки этого направления проводили с помощью фенотипических признаков, далее — с помощью белковых маркеров, а в настоящее время — используя молекулярно-генетические маркеры полиморфизма различных участков ДНК.

С 90-х годов XX века в практику исследования генетического разнообразия включен новый класс молекулярных маркеров, получаемых в результате амплификации ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4].

Оценка генетического разнообразия генофонда кукурузы в мире. Одна из первых работ по определению пригодности ПЦР-маркеров для идентификации генотипов и детекции родства осуществлена на примере оценки шести инбредных линий и пяти простых гибридов кукурузы [5]. Продемонстрирована возможность идентифицировать инбредных родителей простых гибридов методом произвольно праймированной ПЦР (Arbitrary primed polymerase chain reaction, AP-PCR). Чтобы достигнуть высокого уровня достоверности в определении родительства, авторы предложили использовать три-четыре праймера, продуцирующих большое количество полиморфизмов.

Сходная ПЦР-техника с использованием коротких произвольных праймеров (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) [6] опробована для оценки потомств 24 инбредных линий кукурузы [7]. По данным кластерного анализа линии разделены на шесть групп; наибольшие генетические дистанции выявлены между зубовидными и кремнистыми линиями. RAPD-ПЦР с 54 праймерами использовали для изучения генетического сходства 57 инбредных линий с различным эндоспермом [8]. Полиморфизм между линиями детектирован при использовании 31 праймера. При помощи анализа главных компонент все линии разделены по строению эндосперма на две группы. Корреляции между коэффициентом сходства f , вычисленного на основе метода педигри, и генетическим сходством на основе RAPD-данных были средними и не превышали 0,49.

Генетическое разнообразие в пределах близких зародышевых плазм (19 линий лопающейся и восемь линий зубовидной кукурузы) исследовали [9] с помощью ISSR-ПЦР-метода (Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR) [10]. Кластерный анализ сгруппировал линии соответственно их гетерозисным пулам.

Для исследования зародышевой плазмы кукурузы использовали ПЦР-анализ 18 микросателлитных локусов, содержащих ди- и тринуклеотидные повторы [11]. ПЦР-данные сравнивали с параметрами изменчивости и генетической дивергенции, полученными при использовании ПДРФ-маркеров. Подтверждена информативность микросателлитных маркеров для анализа генетического разнообразия кукурузы.

Для характеристики и идентификации 58 инбредных линий кукурузы использовали ПЦР-анализ 131 локуса, содержащего повторы простых последовательностей (Simple Sequence Repeat, SSR) [12]. Кластеризация линий близка к ожидаемой по данным о педигри.

Несколько типов молекулярных маркеров (RAPD, SSR, AFLP) использовано для сравнительного анализа генетического разнообразия инбредных линий кукурузы [13]. Исследовано генетическое разнообразие 93 инбредных элитных линий США и Европы по данным SSR-анализа [14]. В результате разработан уникальный набор из 100 SSR-маркеров, имеющий не менее двух маркеров на хромосомное плечо и средний индекс полиморфности 0,72.

Определение генетических дистанций среди современных и исторических инбредных линий кукурузы по данным ПЦР-анализа 83 микросателлитных локусов осуществляли для оценки того, насколько утрачено генетическое разнообразие среди современных генотипов [15]. Авторы отобрали восемь элитных инбредных линий, представляющих основу современного семеноводства США, и 32 другие инбредные линии, являющиеся исторически важными генотипами в селекции кукурузы. Результаты кластерного анализа хорошо согласовывались с информацией о родословных. Линии из гетерозисных групп BSSS, Reid Yellow Dent и Lancaster сгруппировались в отдельные кластеры. Среднее число аллелей на локус составило 4,9 среди всех генотипов и 3,2 – среди современных линий. Уменьшение числа аллелей на локус не связано с разными размерами выборок. Значение средней генетической дистанции составило 0,65 среди современных линий, 0,67 среди исторических линий и 0,67 среди всех 40 генотипов. Авторы предположили, что генетическое разнообразие современных линий уменьшилось на генном уровне, но не на популяционном. Гибридная селекция кукурузы скорее, сохраняет, чем уменьшает, генетическое разнообразие, по меньшей мере, во время первоначального разделения инбредных линий в BSSS и не-BSSS гетерозисные группы.

Проверку генетического сходства в пределах пяти групп кукурузы (Айодент, кремнистой, зубовидной, сахарной, лопающейся) осуществляли с использованием 218 SSR-маркеров [16]. Кластерный анализ продемонстрировал сходство между европейскими зубовидными линиями (F2, F7, EP1), CO109 и *su1*-линиями сахарной кукурузы США. Линия F64 из Аргентины отдалена от всех других. Закрытая проверка двух источников В37 показала, что версия Университета Purdue содержит набор аллелей, характерных для В73. Пять групп показали устойчивые внутригрупповые гаплотипы.

Проанализировано 60 микросателлитных локусов в выборке из 65 инбредных линий кукурузы, адаптированных к холодным регионам Японии, для оценки генетических различий [17]. Кластерный анализ показал, что северные кремнистые инбредные линии, селекционируемые в Японии, сходны с североканадской кремнистой инбредной линией CO12 и европейской кремнистой линией F283, зубовидные инбредные линии, селекционируемые в Японии, сходны с BSSS инбредными линиями типа В73. Эти ассоциации соответствуют известным данным родословных линий. Полученные результаты продемонстрировали эффективность SSR-анализа для оценки генетического разнообразия и соотнесения к гетерозисным группам.

Для оценки разнообразия 20 пулов и популяций субтропической кукурузы, широко используемых в селекционных программах CIMMYT, проанализировано 83 SSR-локуса [18]. Отмечено, что родство между популяциями по данным SSR-анализа

прекрасно согласуется с информацией о педигри. С помощью SSR-маркеров также изучили генетическое разнообразие в пределах и между CIMMYT-популяций кукурузы тропической, субтропической и умеренной зон [19-20].

Во временном аспекте исследовали генетическое разнообразие среди 133 современных и ранних сортов кукурузы, произрастающих во Франции в течение последних 50 лет, с помощью ПЦР-анализа 51 SSR-локуса. Сорта сгруппировали соответственно четырем периодам. Генетические различия сократились до 10 % в сортах селекции до 1976 г. сравнительно с таковыми селекции после 1985 г. Незначительные различия отмечены среди сортов двух последних десятилетий, что должно побудить французских селекционеров кукурузы к расширению генетической основы в их селекционных программах [21].

Генетическое разнообразие разновидностей кукурузы Центральной Европы и тенденции его изменения в течение последних 50 лет проанализировали в пулах кремнистой и зубовидной зародышевых плазм с помощью 55 SSR-маркеров [22-23]. Исследовали генетические изменения в наборе 85 коммерческих гибридов относительно их родительских форм, проанализировали изменения частот аллелей SSR-локусов во временном аспекте. Отмечено наличие многочисленных уникальных аллелей, которые отсутствовали в пуле элитной кремнистой зародышевой плазмы и являются источником расширения генетической основы селекционной гермаплазмы.

Определили варибельность в наборе 31 инбредной линии кукурузы из разных гетерозисных пулов с помощью ПЦР-анализа 100 микросателлитных локусов [24]. Идентифицировано 392 фрагмента, среднее значение индекса полиморфности составило 0,54. SSR-маркеры использованы для группирования мексиканских рас кукурузы [25].

С целью оценки потенциала нового поколения генетических маркеров, выявляющих однонуклеотидный полиморфизм, – SNP-маркеров (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), обладающих высокой разрешающей способностью, для генотипирования зародышевой плазмы кукурузы создан проект «Maize Single Nucleotide Polymorphism» («DuPont» и «Pioneer», США) [26]. В рамках этого проекта изучено распределение частот встречаемости SNPs, структуру гаплотипов и сцепление в наборе элитных линий кукурузы [27].

SNP-маркеры использовали для оценки генетического разнообразия среди 30 инбредных линий, представляющих коллекцию североамериканской гермаплазмы кукурузы. Для ПЦР использовали праймеры, последовательности которых разработаны на основе кДНК-клонов из EST-коллекции «DuPont» и непосредственном секвенировании продуктов амплификации. Анализ продуктов амплификации 20 локусов, случайно распределенных в геноме, показал высокий уровень однонуклеотидного полиморфизма: одна единичная замена нуклеотида на каждые 70 п. н.; 60 % этих SNPs являлись транзициями и 40 % - трансверсиями. Детектировали одну вставку/делецию на каждые 160 п. н. В результате отобрали восемь линий кукурузы, которые представляли максимальное аллельное разнообразие в пределах оцененных генотипов, для каталогизации SNP-аллелей 502 локусов, отобранных из ESTs, и генов агрономического значения [28]. 433 локуса оказались полиморфными, из них в 215 локусах идентифицировали инсерции/делеции (индели). Из 655 идентифицированных инделей, однонуклеотидные характерны для более половины (54,8 %), также отмечены высокие частоты двух- и трехнуклеотидных инделей, а также инделей длиной шесть (3,4 %) и восемь оснований (2,3 %).

Изучение генетического разнообразия кукурузы в Украине. Первые в Украине исследования генетического разнообразия кукурузы с помощью ПЦР-маркеров начаты в 1995 г. в Южном биотехнологическом центре в растениеводстве Украинской академии аграрных наук (г. Одесса) [29].

Осуществлен анализ наследования ПЦР-фрагментов в F₁-гибридах кукурузы и

возможности его прогнозирования, что имеет большое значение при выборе и оценке молекулярного маркера [30]. Проведено исследование генетического разнообразия 65 инбредных линий кукурузы зарубежной селекции и селекции Селекционно-генетического института – Национального центра сортоизучения и семеноведения из разных гетерозисных групп с помощью RAPD- и SSR-ПЦР-методов [31-38]. В результате кластерного анализа по данным ДНК-профилирования группировка линий совпала с ожидаемой кластеризацией по принадлежности к гетерозисным группам и по данным родословных. Генетические дистанции между линиями из разных гетерозисных групп были выше, чем таковые между линиями из одной группы.

С помощью ПЦР-анализа определили степень генетического родства двух инбредных линий кукурузы – А344 и ВИР44, имеющих практически один и тот же генотип, но репродуцируемых в течение многих лет в разных эколого-географических зонах [39]. Линия ВИР44 выделена из мировой коллекции на Кубанской опытной станции Всероссийского института растениеводства (Россия) и является аналогом линии А344, выведенной в США (Миннесота) и относящейся к гетерозисной группе Рейд. Кластеризация линий на дендрограмме, сконструированной по данным ISSR-анализа, соответствовала году репродукции и демонстрировала увеличение гетерогенности линии ВИР44 с течением времени и достаточно высокую отличимость от линии-аналога А344. Значения генетических дистанций между линиями ВИР44 и А344 варьировали от 0,257 до 0,314. Сравнение данных SSR- и ISSR-анализов (гомогенность по трем локусам, содержащим микросателлитные повторы, и гетерогенность по самим микросателлитным повторам) позволило предположить, что вариабельность ВИР44 и А344 связана с изменчивостью регионов повторяющейся ДНК, а не структурных генов. В процессе селекции и семеноводства линий ВИР44 и А344 затронуты буферные районы ДНК, возможно играющие адаптивную функцию.

Таким образом, чтобы служить эффективной базой для улучшения культур, генетическое разнообразие должно быть тщательно и всесторонне изучено. Развиваемые в мире молекулярно-генетические исследования ориентированы на решение теоретических и прикладных проблем интродукции, изучения, хранения, воспроизведения, идентификации и регистрации и паспортизации генетических ресурсов растений. В эффективности познания генофонда решающая роль принадлежит методам исследования.

Литература

1. www.fao.org
2. Чекалин Н.М., Тищенко В.Н., Баташова М.Е. // Сельскохозяйственный отраслевой сервер. www.Agromage.com.
3. Глазко В.И. // Вестник ВОГиС. – 2008. – Т. 12, № 4. - С. 590-594.
4. Mullis K., Faloona F., Scharf S. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. - 1986. - V. 51, N 2. - P. 263-273.
5. Welsh J., Honeycutt R., McClelland M. // TAG. - 1991. - V. 82, N 4. - P. 473-476.
6. Williams J., Kubelic A., Livak K. // NAR. - 1990. – V. 18, N 22. - P. 6531-6535.
7. Kawata M., Yazaki S. // Grassland Science. - 1995. - V. 41, N 3. - P. 251-255.
8. Hahn V., Blankenhorn K., Schwall M. // Maydica. - 1995. - V. 40, N 4. - P. 299-310.
9. Kantety R., Zeng X., Bennetzen J. // Mol. Breed. - 1995. - V. 1, N 4. - P. 365-373.
10. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. // Genomics. - 1994. - V. 20, N 2. - P. 176-183.
11. Taramino G., Tingey S. // Genome. - 1996. - V. 39, N 2. - P. 277-287.
12. Smith J., Chin E., Shu H. // UPOV Document BMT/4/2. - 1997 - 29 p.
13. Pejic I., Ajmorne-Marsan P. // TAG. - 1998. - V. 97, N 8. - P. 1248-1255.
14. Ziegler J., Joe L., Hauser J. // Biochemical and Molecular Techniques and DNA-Profilng in Particular (BMT) of UPOV: Sixth Session of the working Group. Angers, France, 01-03.03.2000. - Document BMT/6/13. Annex III. - P. 1-6.
15. Lu H., Bernardo R. // TAG. – 2001. – V. 103, N 4. – P. 613-617.

16. *Romero-Severson J., Smith J., Ziegler J.* // TAG. – 2001. – V. 103, N 4. – P. 567-574.
17. *Enoki H., Sato H., Koinuma K.* // TAG. – 2002. – V. 104, N 8. – P. 1270-1277.
18. *Reif J., Melchinger A., Xia X.* // TAG. - 2003. – V. 107, N 5. – P. 947-957.
19. *Reif J., Xia X., Melchinger A.* // Crop Sci. – 2004. – V. 44, N 3. – P. 906-913.
20. *Xia X., Reif J., Melchinger A.* // Crop Sci. - 2005. – V. 45, N 6. – P. 2573-2582.
21. *Le Clerc V., Bazante F., Baril C.* // TAG. - 2005. - V. 110, N 2. - P. 294 – 302.
22. *Reif J., Hamrit S., Heckenberger M.* // TAG. - 2005. –V. 111, N 5. – P. 906-913.
23. *Reif J., Hamrit S., Heckenberger M.* // TAG. - 2005. – V. 111, N 5. – P. 838-845.
24. *Heckenberger M., Bohn M., Klein D.* // Crop Sci. - 2005. – V. 45, N 3. – P. 1120-1140.
25. *Reif J., Warburton M., Xia X.* // TAG. – 2006. – V. 113, N 2. - P. 177-185.
26. *Rafalski A.* // Curr. Opin. Plant Biol. – 2002. – Vol. 5, N 1. – P. 94–100.
27. *Ching A., Caldwell K., Jung M.* // Genet. BMC. – 2002. –V. 3, N 19. – P. 19-24.
28. *Bhatramakki D., Dolan M.* // Plant Mol. Biol. – 2002. – V. 48, N 5-6. - P. 539–547.
29. *Sivolap Yu., Brick A., Kozhukhova N.* // 4th International Iran and Russia Conference in Agriculture and Natural Resources. - ShahreKord, Iran, 2004. - P. 70-71.
30. *Кожухова Н.Э., Вербицкая Т.Г.* // Научно-методическое руководство «Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях». - Под ред. Ю.М.Сиволапа. - Киев: Аграрна наука. - 1998. - С. 96-102.
31. *Кожухова Н.Э., Вербицкая Т.Г., Сиволап Ю. М.* // Материалы Международной конференции «Актуальные проблемы биотехнологии в растениеводстве, животноводстве, ветеринарии». - Москва, 1996. - С. 40.
32. *Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М.* // Материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов "Наслідки наукових пошуків молодих вчених-аграрників в умовах реформування АПК". - Чабани, 1996. - С. 222.
33. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Асыка Ю.А.* // Цитология и генетика. - 1997. - Т. 31, N 1. - С. 16-20.
34. *Вербицкая Т.Г., Кожухова Н.Э., Гужва Д.А., Сиволап Ю.М., Соколов В.М.* // Кукуруза и сорго. - 1997. - N 6. - С. 7-11.
35. *Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М., Вареник Б.Ф.* // Тезисы докладов международной конференции "Агробиотехнология растений и животных". – Киев, 1997. - С. 21-22.
36. *Кожухова Н.Э., Сиволап Ю.М.* // Тезисы докладов I Конференции молодых ученых и студентов-химиков Южного региона Украины. – Одесса, 1998. - С. 19.
37. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Вареник Б.Ф.* // Сборник материалов II Международной конференции «Використання сучасних молекулярно-генетичних розробок у генетико-селекційних дослідженнях». – Киев, 1998. - С. 55.
38. *Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э., Вареник Б.Ф.* // Доклады РАСН. - 1999. - № 6. - С. 3-6.
39. *Кожухова Н.Э., Гудыменко Е.В., Сиволап Ю.М., Вареник Б.Ф.* // Сборник тезисов IV Международной конференции «Геном растений». - Одесса, 2003. - С. 18.

Резюме

Представлены литературные данные и данные собственных исследований, отражающие последние достижения в изучении генетических ресурсов кукурузы (*Zea mays* L.). Показана необходимость использования для оценки и сохранения биоразнообразия новейших ДНК-технологий, в частности, основанных на методе полимеразной цепной реакции.

Наведено літературні дані і дані власних досліджень, що відображають новітні досягнення в вивченні генетичних ресурсів кукурудзи (*Zea mays* L.). Показано необхідність використання для оцінки і збереження біорізноманіття сучасних ДНК-технологій, зокрема, на основі методу полімеразної ланцюгової реакції.

Literature and personal researches data present that demonstrate modern achievements of maize genetic resources studying. It shows necessity of DNA-technologies using for biovariety definition and safe, in particular, methods on basis of polymerase chain reaction.

**КОЦЬ С.Я.¹, МАЛЧЕНКО С.М.¹, ДАЦЕНКО В.К.¹, МАМЕНКО П.М.¹,
ЯКИМЧУК Р.А.²**

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

вул. Васильківська, 31/17, м.Київ, Україна

²Уманський державний педагогічний університет ім. П.Г. Тичини

вул. Садова, 2, м.Умань, Україна

Tn5-МУТАНТИ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*: ОТРИМАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХНІХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Для одержання оптимальних врожаїв зернобобових культур і багаторічних та однорічних бобових трав необхідно поряд із впровадженням високопродуктивних сортів цих рослин застосовувати також для їх передпосівної інокуляції вірулентні, конкурентоспроможні і активні штами відповідних бульбочкових бактерій, здатні утворювати з ними ефективний азотфіксувальний симбіоз.

Із метою отримання перспективних для застосування в сільськогосподарській практиці ризобіальних штамів поряд із класичним методом аналітичної селекції, тобто виділенням і відбором ризобій безпосередньо із корневих бульбочок або з ґрунту, фізичним та хімічним мутагенезом, до останнього часу активно застосовувались методи генетичної інженерії. Спочатку це були методи трансформації і трансдукції, проте через незначну частоту появи мутантів із зміненими симбіотичними властивостями ними перестали користуватись у селекційній практиці [1].

Одним із найефективніших методів отримання нових високоактивних штамів бульбочкових бактерій нині є метод транспозонового мутагенезу, який полягає у здатності рухомих генетичних елементів – транспозонів вбудовуватися в ген-мішень, інактивувати його і мітити маркером стійкості до певних антибіотиків, викликаючи при цьому поодинокі генетичні зміни [4].

При вивченні генетики бульбочкових бактерій досить часто застосовують транспозон Tn5, який має здатність різною мірою проникати в геном окремих ризобіальних видів і штамів, кодуючи при цьому їх стійкість до канаміцину та неоміцину.

Цей транспозон може вбудовуватися в будь-яку точку геному ризобій і викликати в них різні мутації. Для транспозонового мутагенезу використовують плазмідні вектори, до складу яких входить транспозон Tn5. Дані вектори можуть реплікуватися в клітинах *Escherichia coli*, але не в ризобіальних клітинах. Після кон'югаційного перенесення з *E.coli* в ризобію плазміда елімінується, а транспозон включається в геном бульбочкових бактерій з частотою 10^{-5} – 10^{-7} на клітину, надаючи їм стійкість до певних антибіотиків.

Таким чином, при застосуванні транспозонів у дослідженнях із бульбочковими бактеріями можна мітити гени, що не мають самостійного фенотипового прояву і тим самим уможливити проведення їх генетичного аналізу і первинного скринінгу мутантів зі зміненими симбіотичними властивостями.

На сьогодні переважна більшість робіт із Tn5-мутагенезу бульбочкових бактерій виконана з використанням швидкорослих ризобій. Одним із завдань нашої роботи було встановлення можливості використання вектора pSUP2021::Tn5 для проведення

транспозонового мутагенезу повільнорослих бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum*.

Матеріали і методи

Культуру штаму *E.coli* S17-1 – донора транспозона Tn5 і культури штамів-реципієнтів *B. japonicum* вирощували до пізньої логарифмічної фази росту, після чого готували їх кон'югативну суміш із розрахунку 1:5, яку потім висівали на агаризоване поживне середовище ТУ [3]. Через 20 або 30 год росту при 28°C кон'югаційну суміш бактерій змивали стерильною водопровідною водою, готували послідовно 10-, 100-, 1000- і т.д. розбавлення, які висівали на селективне манітно-дріжджове агаризоване середовище (МДА) з 200 мкг/мл канаміцину і 600 мкг/мл стрептоміцину [2]. Вирослі на такому середовищі колонії бактеріальних культур були транспозоновими мутантами бульбочкових бактерій. Частота транспозиції при цьому складала 10^{-6} на клітину. Колонії відсівали на пробірки з агаризованим середовищем і зберігали для подальших досліджень їх симбіотичних властивостей.

Результати і обговорення

Зважаючи на існуючу в літературі думку, що найменш стабільною ознакою бактерій є їх стійкість до антибіотиків, ми вирішили перевірити здатність Tn5-мутантів штаму *B. japonicum* 646 зберігати набуту при мутагенезі властивість рости на середовищі з 200 мкг/мл Km. Спершу цю стабільність перевіряли через 7 місяців після отримання даних культур. У результаті виявилося, що всі 76 перевірених Tn5-мутантів добре росли на МДА + 200 мкг/мл Km. Інтенсивність їх росту на цьому селективному середовищі була такою ж, як і на контролі (МДА без антибіотика). Однак після зберігання впродовж 4-х років в умовах музею цілий ряд Tn5-мутантів втратили резистентність до Km, а деякі інші якщо і були здатні рости в присутності цього антибіотика, то при його концентрації 200 мкг/мл їм був притаманний ледь помітний ріст. При цьому мутантів, які за інтенсивністю росту на МДА + 200 мкг/мл Km не відрізнялись від росту на контролі, було лише 20 із 86-ти перевірених (22,7%), 11 культур росли на середовищі з Km дещо слабше, а 9 Tn5-мутантів за цих умов росли дуже слабко. Решта 45 мутантів повністю втратили здатність рости на середовищі з 200 мкг/мл Km. Викладене свідчить, що Tn5-мутанти соєвих ризобій при тривалому зберіганні в умовах музею можуть втрачати набуту при мутагенезі резистентність до Km.

Одержаним у результаті транспозонового мутагенезу мутантам притаманні різноманітні фізіологічні і симбіотичні властивості, у зв'язку з чим необхідно проводити відбір цих мутантів за певними господарсько-цінними ознаками. Первинний скринінг за ознаками «інтенсивність азотфіксації», «вірулентність» та «ефективність симбіозу» ми здійснювали в умовах мікровегетаційного і вегетаційного дослідів, у яких проаналізовано понад 150 Tn5-мутантів штаму 646 *B. japonicum*.

Виявлено, що в мікровегетаційних дослідах перші кореневі бульбочки утворювались через 3 тижні після появи сходів як у контролі (інокуляція вихідним штамом *B. japonicum* 646 або штамом-стандартом 634б), так і у варіанті з інокуляцією сої Tn5-мутантами. Аналізуючи результати мікровегетаційних дослідів встановлено, що за симбіотичними властивостями більшість перевірених канаміцинрезистентних рекомбінантів незначною мірою відрізнялася від вихідного штаму 646 і штаму-стандарту 634б. Проте, окремі з них за вірулентністю, швидкістю формування бульбочок, їх розміщенням на корінні сої, ацетиленвідновлювальною активністю та накопиченням вегетативної маси рослини-хазяїна перевищували контрольні штам.

Подальші дослідження продовжили у вегетаційних та польових умовах. У результаті із контрастних за азотфіксувальною активністю і вірулентністю відібрано сім ризобіальних Tn5-мутантів, а саме мутанти 21-2, 9-1, 17-2, 35-2, 107, 113 і 118-8, які у вегетаційних умовах були використані для створення модельних симбіотичних систем із різним рівнем ефективності. Виявилося, що Tn5-мутанти 21-2, 9-1 і 17-2 за

вірулентністю, швидкістю формування бульбочок, їх розташуванням на кореневій системі рослини-хазяїна і, щонайважливіше, азотфіксувальною активністю у різні фази вегетації сої перевищували контрольні штами. Проте виявлено також три культури – 107, 113 і 118-8, яким була характерна висока вірулентність і водночас низька азотфіксувальна активність.

Ефективність симбіотичних систем, створених за участю рослин сої і відібраних у вегетаційних дослідках Tn5-мутантів, яким за попередніми даними притаманна висока азотфіксувальна активність, була перевірена в умовах польового дослідження на сірому лісовому і темно-сірому опідзоленому ґрунтах. При цьому встановлено (таблиця), що інокуляція трьома відібраними Tn5-мутантами – 21-2, 17-2 і 9-1 достовірно збільшувала врожай сої на 15–23% у порівнянні з інокуляцією виробничим штамом 634б. Вони виявилися вірулентними й активними мікросимбіонтами сої. Отримані дані свідчать, що за комплексом симбіотичних ознак кращими серед перспективних Tn5-мутантів є 21-2 і 17-2.

Таблиця. Урожай сої, інокульованої Tn5-мутантами *B. japonicum* (польові дослідження),

Варіант	Урожай, ц/га				Приріст до виробничого штаму 634б	
	I	II	III	середнє	ц/га	%
Без інокуляції	15,9	17,6	15,8	16,4	– 4,2	– 20,4
Штам						
634б	21,5	22,2	18,2	20,6	–	–
646	20,8	22,7	19,3	20,9	+ 0,3	+ 1,5
Tn5-мутант						
9-2	24,8	26,4	19,8	23,7	+ 3,1	+ 15,0
17-2	26,4	28,2	20,0	24,9	+ 4,3	+ 20,9
21-2	26,3	28,1	21,9	25,4	+ 4,8	+ 23,3
HP _{0,05}	2,1	2,2	2,0			

Примітка: I – 2006 р., Київська обл., II – 2006 р., Черкаська обл., III – 2007 р., Черкаська обл.

Висновки

Одержані нами результати свідчать, що у повільнорослих бульбочкових бактерій сої при використанні вектора pSUP2021::Tn5 можна отримати канаміцинрезистентні мутанти зі зміненими симбіотичними властивостями, а саме, бульбочкоутворенням, азотфіксувальною активністю і ефективністю симбіозу.

Встановлено, що транспозоновий мутагенез є ефективним методом одержання нових штамів повільнорослих бульбочкових бактерій. Інокуляція сої активними Tn5-мутантами *B. japonicum* підвищує ефективність функціонування соєво-ризобіальних симбіотичних систем, збільшуючи при цьому продуктивність рослини-хазяїна. Після додаткової перевірки конкурентоспроможності і технологічності отримані транспозонові мутанти ризобій можуть бути рекомендовані як біологічна основа бактеріальних добрив під сою.

Література

1. Новикова Н.И., Ситаров Б.В. Трансдукция у *Rhizobium meliloti* // Генетика. – 1984. – 20, № 4. – С. 542–548.
2. Новикова Н.И., Шарыпова Л.А., Ситаров Б.В. Транспозоновый мутагенез у штамма СХМ1-105 *Rhizobium meliloti* // Молекулярная генетика. Микробиол. и вирусол. – 1986. – № 8. – С. 32–36.
3. Beringer J.E., Hoggan S.A., Johnston, A.W.B. Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R-plasmid-mediated recombination // J. Gen. Microbiol. – 1978. – 104 №1 – P. 201–207.

4. *Pobigaylo N., Wetter D., Szymczak S. et al.* Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – **72**, № 6. – P. 4329–4337.

Резюме

Доведена можливість отримання Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* зі зміненими симбіотичними властивостями при використанні вектора pSUP2021::Tn5. В умовах мікровегетаційного і вегетаційного дослідів здійснено їх первинний відбір за ознаками «азотфіксувальна активність», «вірулентність» і «ефективність симбіозу». Відібрані мутанти, контрастні за цими ознаками, перевірені в польових дослідах. Кращі з них після додаткових випробувань можуть бути рекомендовані для використання як біологічна основа бактеріальних добрив під сою.

Доказана возможность получения Tn5-мутантов *Bradyrhizobium japonicum* с измененными симбиотическими свойствами при использовании вектора pSUP2021::Tn5. В условиях микровегетационных и вегетационных опытов осуществлен их первичный отбор по признакам «азотфиксирующая активность», «вирулентность» и «эффективность азотфиксации». Отобранные мутанты, контрастные по этим признакам, проверены в полевых опытах. Лучшие из них после дополнительных испытаний могут быть рекомендованы для использования в качестве биологической основы бактериальных удобрений под сою.

The obtaining possibility of Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with modified symbiotic characteristics under the use of pSUP2021::Tn5 vector was proved. The primary selection by “nitrogen fixing activity”, “virulence”, “nitrogen fixation efficiency” signs was performed in microvegetative and vegetative experiments. The selected mutants, contrasting by these signs were tested in field experiments. The ones which were showed to be the best after the additional investigation might be recommended as the biological grounds of bacterial fertilizers for soybean.

**КУЗЬМЕНКО О.Л., НЕГРУЦЬКА В.В., ПАЛЬЧИКОВСЬКА Л.Г.,
КАРПОВА І.С., ЛУКАШ Л.Л.**

*Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
03143, Україна, Київ, вул. Заболотного, 150*

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ГЕНОМНОГО ФІНГЕРПРИНТИНГУ (REP-ПІР) ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ІНСЕРЦІЙНИХ МУТАНТІВ *BACILLUS SUBTILIS*

Геноми всіх організмів містять повторювані послідовності. Еукаріотичні геноми складаються з численних повторів, з яких найкраще охарактеризованими є повтори *Alu* родини. В геномі людини їхня частка складає від 3 до 6 % [1]. Члени цієї родини не є цілком ідентичними і здатні до переміщення за механізмом оберненої транскрипції, що дає змогу зарахувати їх до класу ретротранспозонів. *Alu*-повтори є короткими нуклеотидними послідовностями (біля 300 пн.), які містять в своєму складі промотор РНК-полімерази III, енхансероподібні структури тощо. За даними літератури їхня активація призводить до різноманітних хромосомних перебудов, генетичної нестабільності, що є однією з причин канцерогенезу [2, 3].

Прокаріотичні геноми також містять повторювані елементи. Серед них виділяють групу міжгенних некодуєчих повторюваних послідовностей розміром до 200 пн, що мають інтрацистронне розміщення.

Метод геномного фінгерпринтингу (Rep-PCR) базується на використанні праймерів, комплементарних до консервативних повторюваних послідовностей ДНК,

найбільш поширених у геномах як грампозитивних, так і грамнегативних бактерій. Було виявлено три родини таких повторів: позагенні паліндроми REP (repetitive extragenic palindromic), розміром 35-40 пн., ентеробактеріальні внутрішньогенні консенсусні послідовності ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), розміром 124-127 пн., та елементи BOX, розміром 154 пн [4]. Отриманий продукт ампліфікації після розділення методом електрофорезу має вигляд набору смужок, що відповідають фрагментам ДНК різного розміру. Комбінація цих фрагментів (геномний фінгерпринт) відповідає певному генотипу. Такий спосіб характеристики бактерій застосовують в систематиці, в епідеміологічних дослідженнях, в медицині, сільському господарстві, промисловості, контролі якості води та продуктів харчування, а також наукових дослідженнях [1, 4].

В нашій попередній роботі за допомогою рекомбінантних плазмід були одержані генетично нестабільні мутанти *Bacillus subtilis*, які містили послідовність *Alu*-повтору геному людини, які умовно були названі *Alu*-інтегрантами [3, 6]. Вони виявляли високу мутабільність та адаптивність до несприятливих умов вирощування. Було висловлено припущення, що причиною цих явищ є інсерція та переміщення в бактеріальному геномі *Alu*-послідовності еукаріотного походження.

Метою роботи було визначення можливості застосування методу Rep-ПЛР для подальшого дослідження поведінки *Alu*-повтору в геномі мутантів *B. subtilis* як можливої причини генетичної нестабільності.

Матеріали і методи

Бактеріальні штами. Об'єктами дослідження були стандартні штами *B. subtilis* Lys-42 з колекції ЛЛЯФ ім. Константинова РАН, який слугував контролем, та похідні від нього генетично нестабільні мутанти з колекції відділу генетики людини ІМБГ НАНУ, з робочою назвою *Alu* 11 та *Alu* 18-7. [6].

Мутанти розсівали до окремих колоній та вирощували на повноцінному агаризованому середовищі при 37 °С протягом 20-24 год.

Виділення бактеріальної ДНК. Геномну ДНК отримували з бактеріальної нічної культури клітин (5 мл). Лізис клітин проводили у буфері (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8.0), який містив лізоцим (5 мг/мл) 15 хв., 37 °С, з наступним додаванням протеїнази К (5.8 мкг/мл) (Fermentas) і додецилсульфату натрію (SDS) у кінцевій концентрації 10% і подальшим інкубуванням за тих самих умов до отримання світлого лізату. Потім додавали суміш фенол/хлороформ (1:1), хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1) і хлороформ, з подальшою преципітацією 2,5 об'ємами 100 % етанолу в присутності 0,3 M Na - ацетату при – 20 °С 12 год. Осад нуклеїнових кислот отримували центрифугуванням при 10 000 об/хв., 10 хв., промивали 70% етиловим спиртом, висушували на повітрі і розчиняли у 100 мкл буфера TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Отриману ДНК очищали від РНК інкубацією протягом 30 хв. при 37 °С в розчині панкреатичної РНКазу А (50 мкг/мл, Sigma, США). Концентрацію ДНК визначали на спектрофотометрі Biomate 5 (Thermo electron corporation, США)

Rep-ПЛР проводили з використанням праймерів BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3'), ERIC 1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3') і ERIC 2 (5' –AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') та REP 1R (5'-ШСГІСГІСІАТСІГГС-3') і REP 2I (5'-ІСГІСІТІАТСІГГСІСІАС-3') (Versalovic *et al.* 1994). Реакційна суміш, кінцевий об'єм якої становив 50 мкл, містила 50 ng бактеріальної ДНК, 200 nM кожного праймера, 200 μM кожного з нуклеозидтрифосфатів, стандартний буфер для ПЛР (Fermentas, Литва), 2 μM MgCl₂, 0,05% DMSO та 1 од.акт. Таq ДНК-полімерази (Fermentas, Литва). ПЛР було проведено в ампліфікаторі «Терцик» (Росія) за наступних умов: початкова денатурація при 95 °С 6 хв., після чого в реакційну суміш вносили Таq ДНК-полімеразу; наступні 30 циклів: 94 °С/1 хв. – 55 °С/1 хв. - 65 °С/8 хв., з кінцевим синтезом – 64 °С/16 хв. для BOX A1R,

94 °C/1 хв. – 53 °C/1 хв. - 65 °C/8 хв., з кінцевим синтезом – 64 °C/16 хв. для ERIC 1R і ERIC 2 та 93 °C/1 хв. – 40 °C/1 хв. - 64 °C/8 хв., з кінцевим синтезом – 64 °C/15 хв. для REP 1R і REP 2I [4]. Наявність ампліконів визначали за допомогою електрофорезу у 1,2% агарозному гелі. Як маркер молекулярної ваги використовували O'Gene Ruler Express DNA Ladder (Fermentas, Литва) згідно рекомендаціям фірми-виробника. Для аналізу агарозних гелів застосовували програму TotalLab v 2.01.

Результати досліджень

Методом Rep-ПЛР були отримані фінгерпринти ДНК батьківського штаму *B. subtilis* Lys-42 та похідних від нього мутантів Alu 11 і Alu 18-7 та проведено їхній порівняльний аналіз [3, 6]. При застосуванні праймерів BOX і ERIC видимих відмінностей не виявлено. При застосуванні праймера REP у отриманих паттернах мутантів ми помітили появу додаткових слабо виражених смужок від 600 пн (дані не наведені).

Для подальшого дослідження обрано дві мозаїчні колонії, які склались з типового та морфологічно зміненого сегментів (рис. 1).

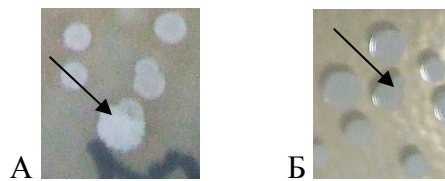


Рис. 1. Колонії мутантів, що були відібрані для дослідження: А – похідні мутанта Alu 11, Б – похідні мутанта Alu 18-7. (Стрілками вказано колонії, що піддавали подальшому аналізу).

Для пошуку відповіді на питання, чи існують видимі відмінності геномних фінгерпринтів матеріалу, одержаного з різних сегментів досліджуваних колоній, використовували лізат клітин. Спочатку у ПЛР з праймерами REP ми отримали низький вихід продукту, що є наслідком низького вмісту матриці в реакції. У зв'язку з цим було проведено реампліфікацію. Для порівняння було використано ДНК, виділену з нічної культури мутантів Alu 11 та Alu 18-7 (рис. 2).

1 2 3 4 M 6 7 8 9

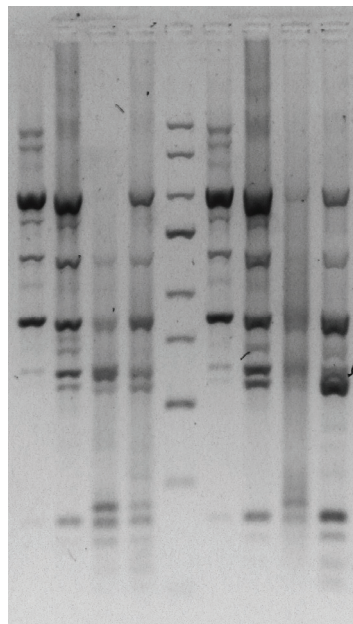


Рис. 2. Геномний фінгерпринт з використанням REP-праймерів: 1. - ДНК мутанту Alu 11; 2. – реампліфікація ДНК штаму Alu 11; 3. – колонія Alu 11 (менший сегмент); 4. – колонія Alu 11 (більший сегмент); М. – маркер; 6. - ДНК мутанта Alu 18-7; 7. –

реампліфікація ДНК штама Alu 18-7; 8. – колонія Alu 18-7 (менший сегмент); 9. - колонія Alu 18-7 (більший сегмент).

Проведена реампліфікація дозволила виявити додаткові смужки, які не були помітні при аналізі очищеного препарату ДНК (рис. 2, доріжки 1, 2, 6, 7), і є характерними для паттернів ДНК малого та великого сегментів. Відмінності паттернів сегментів стосувалися загальної кількості низькомолекулярних фрагментів, їхніх розмірів, а також вмісту певного продукту. Ці зміни можуть бути наслідком перебудови геному *B. subtilis*, спричиненої активністю *Alu*-последовності.

Відомо, що REP последовності беруть участь у хромосомних перебудовах, їх часто виявляють в місцях тандемних дуплікацій. Вони за консервативністю, сталою паліндромною структурою, локалізацією в некодуючих областях, поширенням геномом нагадують представників *Alu*-родини геному ссавців [1, 5]. На нашу думку, саме завдяки такій подібності, праймерами до REP-последовностей дозволила виявити перебудови у геномі *Alu*-інтегрантів *B. subtilis*.

Застосований методичний підхід надає унікальну можливість для моніторингу активності одиночного *Alu*-повтору під впливом різних фізичних, хімічних та біологічних чинників. Враховуючи причетність *Alu*-повтору до злоякісної трансформації клітин людини, перспективним видається використання даної моделі для попереднього дослідження препаратів з цитостатичною дією.

Висновки. Показано, що застосована модифікація методу REP-ПЛР придатна для здійснення детекції та моніторингу генетичних перебудов геному високоваріабельних *Alu*-інтегрантів *B. subtilis*.

Література

1. *Lupski J.R., Wienstock G.M* Short, interspersed repetitive DNA sequences in procariotic genomes // *Journ. of Bacter.* – 1992, Vol. 174, N 14. – P. 4525-4529.
2. *Lupski J.R.* Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits // *Trends. Genet.* – 1998? 14 (10). – P. 417-422.
3. *Карпова И.С., Корецька Н.В., Лялюцька Т.С.* Развитие идей С.М. Гершензона у дослідженні адаптивності мутацій // *Физиология и биохимия культурных растений.* – Т. 38., №2 – С. 124-133.
4. *Rademaker J.L.W., Bruijn F.J.* Characterization and classification of microbes by Rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted patten analysis // *Appl. Envir. Microbiol.* - 1998, Vol. 64. – P. 2096-2104.
5. *Batzer M.A., Deininger P.L.* Alu repeats and human genomic diversity // *Nature reviews.* – 2002. – Vol/ 3. – P. 370-380.
6. *Карпова И.С., Городенко 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.

Резюме

Показана можливість використання методу Rep-ПЛР для ідентифікації інсерційної последовності *Alu*-повтору людини в геномі нестабільних мутантів *Bacillus subtilis*.

Показана возможность использования метода Rep-ПЦР для идентификации инсерционной последовательности *Alu*-повтора человека в геноме нестабильных мутантов *B. subtilis*.

It was shown that the Rep-PCR method is useful for identification of *Alu*- repeat insertions in genome of genetically unstable mutants of *B. subtilis*.

МУРАТОВА Е.Н., КАРПЮК Т.В., ВЛАДИМИРОВА О.С., СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., КВИТКО О.В.

Учреждение Российской академии наук Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: elena-muratova@ksc.krasn.ru

В-ХРОМОСОМЫ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PICEA*: РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ВОЗМОЖНОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Каждый вид характеризуется определенным набором хромосом, которые называются постоянными хромосомами, хромосомами основного набора или А-хромосомами. В них находится вся генетическая информация. В кариотипе некоторых организмов наряду с А-хромосомами содержатся добавочные или В-хромосомы. Происхождение и функция добавочных хромосом изучены недостаточно; в настоящее время они являются объектом активного изучения. Добавочные хромосомы найдены у позвоночных и беспозвоночных животных, мхов, голосеменных и покрытосеменных растений.

1. Присутствие добавочных хромосом в кариотипе изменяет фенотип ядра, метаболизм всей клетки, оказывает влияние на функционирование генома и на многие фундаментальные биологические процессы (длительность клеточного цикла, генетическую активность хромосом, поведение хромосом в митозе и мейозе, содержание РНК и гистонов, размеры клеток, частоту клеточных делений). Имеются данные, что они могут влиять на фенотипические признаки, фертильность и жизнеспособность, темпы роста и развития. Сложившаяся система В-хромосом имеет значение для популяции и вида в целом. Появление и закрепление добавочных хромосом в эволюции дало возможность расширить лабильную систему генома для повышения адаптационных возможностей организма.

Долгое время считалось, что у древесных растений В-хромосомы отсутствуют. К настоящему времени среди древесных растений (голосеменных и покрытосеменных) известно более 150 видов, содержащих в кариотипе В-хромосомы. Среди голосеменных добавочные хромосомы наиболее широко распространены в роде *Picea*, где они обнаружены у 18 видов. Представители этого рода являются хорошими объектами, на примере которых можно изучить многие вопросы о роли и происхождении В-хромосом.

Материалы и методы

2. Объектами исследования являлось 16 видов ели – *P. abies*, *P. ajanensis*, *P. asperata*, *P. breweriana*, *P. crassifolia*, *P. engelmannii*, *P. glehnii*, *P. jezoensis*, *P. koraiensis*, *P. koyamae*, *P. mariana*, *P. meyeri*, *P. obovata*, *P. omorica*, *P. pungens*, *P. schrenkiana* и межвидовой гибрид *P. x fennica*. У некоторых видов изучено несколько происхождений; у ели сибирской изучались естественные популяции в разных частях ареала, в различных экологических условиях, а также декоративные формы в г. Красноярске.

В качестве материала для исследования использовали меристематические ткани корешков проростков семян или оснований молодой хвои. Кариологический анализ проводился на давленных препаратах по общепринятым методикам для хвойных видов. Семена проращивали в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге. Проростки длиной 1.0-1.5 см обрабатывали 1 % раствором колхицина в течение 5-6 ч, фиксировали уксуснокислым спиртом (1:3), окрашивали ацетогематоксилином. Затем готовили давленные препараты обычным способом. Препараты просматривали под микроскопом МБИ-6. Клетки с хорошим разбросом хромосом фотографировали.

Результаты и обсуждение

Изученные виды являются диплоидами с основным числом хромосом $x = 12$ и содержат в кариотипе 24 А-хромосомы ($2n=24$). У некоторых видов в кариотипе могут

присутствовать В-хромосомы, встречающиеся нерегулярно. Согласно полученным нами материалам и имеющимся литературным данным, у *P. schrenkiana*, *P. jezoensis*, *P. pungens*, *P. x fennica* и *P. breweriana* встречается 1 В-хромосома ($2n=24+1B$), у *P. koyamae* и *P. engelmannii* – 1-2 ($2n=24+1-2B$), у *P. ajanensis* и *P. meyeri* – 1-3 ($2n=24+1-3B$), у *P. obovata* – 1-4 ($2n=24+1-4B$), у *P. glehnii* 1-5 В-хромосом ($2n=24+1-5B$). У *P. breweriana*, *P. pungens* и *P. schrenkiana* В-хромосомы обнаружены нами впервые.

Размер А-хромосом рассматриваемых видов составляет 9,5-16,0 мкм; 8 пар относится к длинным метацентрикам и 4 пары к более коротким мета- или субметацентрикам. Размеры В-хромосом – 3,0-6,0 мкм, что составляет около 20-30% от средней длины А-хромосом. Обычно у ели встречается два морфологических типа добавочных хромосом: B_1 – метацентрические и B_2 – субметацентрические. У *P. schrenkiana*, *P. koyamae* и *P. breweriana* наблюдались только метацентрические, у *P. pungens* – субметацентрические, у *P. obovata* и *P. ajanensis* – оба типа В-хромосом. Наиболее часто встречаются добавочные хромосомы метацентрического типа. Предполагается, что субметацентрические В-хромосомы являются производными от метацентрических. У *P. glehnii*, впервые для голосеменных, найдены добавочные хромосомы разных размеров (от 1,5 до 8 мкм) и морфологически различных типов.

Согласно современным представлениям, добавочные хромосомы содержат гетерохроматин, являющийся постоянным компонентом хромосомного набора (Прокофьева-Бельговская, 1986). Следовательно, В-хромосомы не активны или малоактивны в отношении транскрипции РНК. Добавочные хромосомы ели сибирской также вероятно полностью или частично гетерохроматические; на это указывает присутствие хромоцентров в интерфазных ядрах. При окрашивании азотнокислым серебром на В-хромосомах были выявлены яркие блоки, что дает возможность предположить, что они могут обладать ядрышкообразующей активностью. Вполне вероятно, что В-хромосомы, подобно нуклеолярным А-хромосомам, играют определенную роль в биосинтетических процессах клетки.

На основании собственных исследований и литературных данных установлены некоторые закономерности распространения В-хромосом по ареалам ели сибирской и ели аянской. Ель сибирская в отношении добавочных хромосом является одним из наиболее изученных видов. К настоящему времени кариологически исследовано более 50 популяций, включая и гибридную зону. В-хромосомы обнаружены в 24 популяциях. Во многих частях ареала изучен близкородственный вид ель обыкновенная. Между елью сибирской и елью обыкновенной проходит широкая зона интрогрессивной гибридизации, в которой произрастает гибридная ель *P. x fennica*. В западной части ареала ели сибирской, а также у ели обыкновенной, В-хромосомы до сих пор не найдены. Сравнительно недавно В-хромосомы были обнаружены у *P. x fennica* на Урале. Эти популяции являются самыми западными, в которых найдены добавочные хромосомы. Невысокая частота встречаемости В-хромосом (17,0% растений) отмечена в Казахском Алтае, однако в близких территориально областях – Горном Алтае и Кемеровской обл., они не обнаружены совсем. В Западной Сибири В-хромосомы пока найдены только на болотах Томской области.

3. Максимальная встречаемость растений с В-хромосомами наблюдается в популяциях Восточной Сибири. К ним относятся популяции из Центральной части Красноярского края - Большая Мурта – 34,3% растений, Козулька – 25,6-32,0%, окр. Красноярска – 28,6-39,1%, Ачинск – 38,0%, Кежма – 29,7%; Тюхтет – 28,0%. Самый высокий процент добавочных хромосом (73,3%) отмечен в Хакасии, у интродуцентов, находящихся за пределами ареала. В популяциях Восточной Сибири найдено наибольшее число В-хромосом (до 4 на диплоидный набор). На севере Красноярского края и в Магаданской обл. добавочные хромосомы не найдены. Две популяции из Западной Якутии – самые восточные и северные, где найдены В-хромосомы, но частота их мала. Таким образом, имеющиеся материалы свидетельствуют, что встречаемость В-

хромосом приурочена к экстремальным районам восточной и юго-восточной частей ареала.

4. При проведении настоящих исследований изучались также декоративные формы в дендрарии Института леса: семиринская, длиннохвойная, светящаяся, желтая, плакучая. У этих форм обнаружены В-хромосомы двух морфологических типов – мета- и субметацентрического. Встречаемость В-хромосом у декоративных форм в целом составляет 56.2%. При изучении наследования добавочных хромосом на примере этих форм установлено, что у потомства преобладает кариотип материнского растения. Например, у *f. lutescens* в материнском кариотипе имеется две добавочные хромосомы и в потомстве более 90 % проростков содержит по 2 В-хромосомы. У двух растений *f. seminskiensis*, имеющих в материнском кариотипе одну В-хромосому, в потомстве наблюдалось преобладание этого цитотипа. Результаты проведенного исследования показали, что добавочные хромосомы передаются преимущественно от материнского растения, хотя имеет место и передача по мужской линии. Возможно, что различие в наследовании В-хромосом обеспечивает сохранение определенного уровня и частоты добавочных хромосом в популяции.

5. В городских насаждениях г. Красноярск добавочные хромосомы были отмечены во всех пяти изученных районах – около Большого концертного зала (БКЗ), автовокзала «Взлетка», в Центральном парке им. М. Горького, около здания ТЮЗа, на о. Отдыха. У растений в районах БКЗ, «Взлетки», Центрального парка и ТЮЗа наряду с типичным набором хромосом обнаружена В-хромосома метацентрического типа – $2n = 24 + 1V_1$. В кариотипе насаждений на о. Отдыха отмечены одна и две добавочные хромосомы V_1 - типа. В общей сложности В-хромосомы отмечены в кариотипе почти половины изученных деревьев из городских насаждений (42.3%),

6. Полученные результаты и анализ литературных данных показывает, что у ели сибирской в западной части ареала добавочных хромосом либо нет, либо частота их невысокая. Например, в трех популяциях ели сибирской из разных экологических условий (кедрово-еловая согра, евтрофное болото, суходол) установлено, что частота встречаемости В-хромосом составляет 3.4, 1.6 и 4.4% соответственно. Невысокая частота встречаемости В-хромосом отмечена в Казахском Алтае. Эти популяции ели сибирской являются самыми западными, в которых найдены добавочные хромосомы. У ели обыкновенной В-хромосомы до сих пор не описаны.

7. В целом, полученные данные свидетельствуют о более широком распространении добавочных хромосом в городских насаждениях ели сибирской по сравнению с естественными популяциями. Это подтверждает точку зрения авторов, считающих, что добавочные хромосомы являются адаптивным элементом вида и обеспечивают устойчивость организмов при неблагоприятных воздействиях (Прокофьева-Бельговская, 1986). Полученные результаты подтверждают, что добавочные хромосомы связаны с адаптивностью растений к условиям антропогенного загрязнения и могут считаться одним из критериев цитогенетического мониторинга. Ранее уже высказывалось предположение о связи В-хромосом со стрессовыми условиями произрастания и с адаптацией растений к ним (Мошкович, 1979; Дмитриева, Парфенов, 1991; Муратова, 2000; Жученко, 2001 и др.).

8. У ели аянской кариологически изучено 12 происхождений. В-хромосомы найдены в южно-сахалинской и дальнегорской популяциях, в верховье р. Большая Уссурка, в верхнем течении р. Правая Соколовка, в трех популяциях Хабаровского края (окр. с. Троицкое на р. Амур и в двух популяциях юга края – сукпайской и оборской). Не обнаружено В-хромосом у ели аянской на Камчатке, на хребте Тукурингра (Приамурье), на о. Шикотан (Курилы, бухта Крабовая), в Южной Якутии - в зоне предполагаемой гибридизации между елью аянской и елью сибирской. Не найдено добавочных хромосом также в корсаковской популяции близкородственного вида *P. microsperma* с Охотского побережья Южного Сахалина, в то же время у *P. microsperma*

из Северо-Восточного Китая имеется 1 В-хромосома. У *P. jezoensis*, в таксономическом отношении очень близкой к *P. ajanensis*, добавочные хромосомы найдены в одной из популяций на острове Хоккайдо в Японии, в остальных десяти популяциях их не оказалось. У *P. jezoensis* в Южной Корее В-хромосомы пока не обнаружены. Полиморфны по В-хромосомам также популяции *P. hondoensis* с острова Хонсю и *P. glehnii* с острова Хоккайдо.

9. Кроме вышеперечисленных видов ели, В-хромосомы описаны у следующих восточноазиатских видов: *P. schrenkiana*, *P. brachytyla* и *P. likiangensis* – $2n=24+1B$, *P. koyamae* и *P. wilsonii* – $2n=24+1-2B$, *P. meyeri* – $2n=24+1-3B$; В-хромосомы встречаются также у североамериканских видов ели – *P. breweriana* и *P. pungens* ($2n=24+1B$), *P. engelmannii* – ($2n=24+1-2B$), *P. sitchensis* ($2n=24+1-5B$), *P. glauca* ($2n=24+1-6B$). Сходство В-хромосом разных видов ели по морфологии, их наличие исключительно у сибирских, дальневосточных и североамериканских видов позволяет высказать предположение об их общем происхождении. Возможно, они возникли у прародительских видов в Восточной Азии и затем распространились в Северную Америку по древнему Берингийскому мосту, который в третичном периоде соединял оба континента. С этой точкой зрения согласуются ископаемые данные, согласно которым ель проникла в Северную Америку в середине третичного периода.

10. Имеющийся фактический материал позволяет предположить, что у разных видов ели В-хромосомы могут быть как древнего, так и недавнего происхождения. В популяциях ели сибирской В-хромосомы получили широкое распространение, в то время как у ели европейской они до сих пор не найдены. Однако добавочные хромосомы уже единично появились в популяциях гибридной зоны между этими видами и возможно в будущем распространятся по ареалу ели европейской. Недавнее происхождение можно предположить для добавочных хромосом *P. glehnii*, которые, вероятно, возникли в результате хромосомных перестроек разных типов.

Работа частично выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-БелРФФИ (проект № 08-04-90001) и интеграционного проекта СО и УрО РАН № 49.

Литература

1. Дмитриева С. А., Парфенов В. И. Кариология флоры как основа цитогенетического мониторинга (на примере Березинского биосферного заповедника). - Минск: Наука и техника, 1991. - 230 с.
2. Жученко А. А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы). – М.: Агрорус, 2001. – Т. 1,2. – 1491 с.
3. Мошкович А. М. Добавочные хромосомы покрытосеменных растений. Кишинев: Штиинца, 1979. – 163 с.
4. Муратова Е. Н. В-хромосомы голосеменных // Успехи соврем. биол. – 2000. – Т. 120, № 5. – С. 452-465.
5. Прокофьева-Бельговская А. А. Гетерохроматические районы хромосом. - М.: Наука, 1986. – 431 с.

Резюме

Проведен кариологический анализ 16 видов ели и одного межвидового гибрида. В диплоидном наборе изученных видов имеется 24 хромосомы - $2n = 24$. В кариотипе 11 видов отмечены добавочные хромосомы: у *P. schrenkiana*, *P. jezoensis*, *P. pungens*, *P. x fennica* и *P. breweriana* – одна В-хромосома ($2n=24+1B$), у *P. koyamae* и *P. engelmannii* – 1-2 ($2n=24+1-2B$), у *P. ajanensis* и *P. meyeri* – 1-3 ($2n=24+1-3B$), у *P. obovata* – 1-4 ($2n=24+1-4B$), у *P. glehnii* 1-5 В-хромосом ($2n=24+1-5B$). В большинстве случаев В-хромосомы относились к метацентрическому и субметацентрическому типам. У *P. glehnii* все 5В-хромосом отличались друг от друга по морфологии. Рассмотрены географическое распространение и возможное значение В-хромосом у представителей рода *Picea*.

Karyological analysis of 16 spruce species and interspecific hybrid have been carried out. Diploid complements of these species include 24 chromosomes ($2n=24$). In karyotypes of 11 species supernumerous (B-) chromosomes occur: *P. schrenkiana*, *P. jezoensis*, *P. pungens*, *P. x fennica* и *P. breweriana* – $2n=24+1B$, *P. koyamae* and *P. engelmannii* – $2n=24+1-2B$, *P. ajanensis* and *P. meyeri* – $2n=24+1-3B$, *P. obovata* – $2n=24+1-4B$, *P. glehnii* – $2n=24+1-5B$. Morphology of B-chromosomes mainly is metacentric or submetacentric. Geographical distribution and possible significance of B-chromosome in *Picea* representatives are presented.

ПІРКО Я.В.¹, ТАРАНЕЦЬ Л. П.², ШАКУЛА О.О.³, КОРШИКОВ І.І.³, БЛЮМ Я.Б.¹

¹Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України», Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: yavp@mail.ru

²Національний університет Києво-Могилянська академія, Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: itillia@rambler.ru

³Донецький ботанічний сад НАН України, Україна, 83059, м. Донецьк, пр. Ілліча, 110, e-mail: herb@herb.dn.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ *ACHILLEA GLABERRIMA* КЛОК. ТА *ACHILLEA LEPTOPHILLA* ВІЕВ. ЗА ДОПОМОГОЮ RAPD МАРКЕРІВ

Збереження та прогнозування існування природних популяцій окремих видів рослин, які знаходяться під загрозою зникнення, вимагає проведення комплексних біологічних досліджень щодо визначення динаміки чисельності, просторової, вікової та генетичної структури популяцій. Оцінку генетичної різноманітності популяцій все частіше проводять із застосуванням молекулярно-генетичних методів аналізу, які базуються на використанні різного роду генетичних маркерів.

Achillea glaberrima (деревій голий) та *Achillea leptophilla* (деревій тонколистий (м'яколистий)) належать до жовтокріткових таксонів секції *Filipendulinae* (DC.) Afan. Ці два види поширені в Україні на порівняно невеликій території. Зокрема, *A. leptophilla* є причорноморським ендеміком кам'янистих оголень, а *A. glaberrima* відноситься до стенотопних ендеміків Приазов'я, який зустрічається тільки на гранітних оголеннях заповіднику «Кам'яні могили» (занесений до Червоної книги України). Слід зауважити, що деякі дослідники вважають *A. glaberrima* похідною від *A. leptophilla* расою, яка повністю втратила опушення. Обидва ці види заслуговують на всебічне вивчення та охорону [1].

Матеріали та методи

Для вивчення генетичної мінливості *A. leptophilla* та *A. glaberrima* був використаний RAPD-метод (Random Amplified Polymorphic DNA), перевагою якого є технічна простота та швидкість проведення аналізу. Метод не потребує будь-якої інформації про послідовність ДНК, яка, до речі, для аналізу може бути взята в невеликій кількості.

Для аналізу використовували рослини *A. glaberrima* та *A. leptophilla*, що були отримані в результаті пророщування насіння, яке було зібране в популяціях обох видів на території заповідника «Кам'яні могили». ДНК з листя кожної рослини виділяли за допомогою кіта (Gene Elute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit) фірми Sigma.

Ампліфікацію проводили з використанням чотирьох ОРП праймерів фірми Operon, USA (OPP 1, OPP 2, OPP 3, OPP 5). Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції об'ємом 25 мкл містила: 50 нг геномної ДНК, 0,2 мкМ праймера, 200 мкМ кожного: dATP, dCTP, dGTP та dTTP, 2,5 мМ MgCl₂, 2,5 одиниці

Тақ полімерази («Реплікон», Росія). Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі АВ 2700 за наступною програмою: початкова денатурація при 95 °С, 5 хв; ампліфікація - 45 циклів (95 °С - 1 хв, 35 °С - 1 хв, 72 °С - 2 хв); кінцеве подовження - 72 °С на протязі 7 хв. Продукти ампліфікації розділяли за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі в 1X TBE-буфері в присутності етидій броміду. Візуалізацію фрагментів проводили в ультрафіолетовому світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркер (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use) фірми Fermentas (Литва).

Для кількісної оцінки генетичного поліморфізму досліджуваних видів отримані дані були представлені у вигляді матриці бінарних ознак, у якій наявність чи відсутність RAPD-однакових фрагментів розглядалася відповідно як стан 1 чи 0, при цьому враховувалися тільки відтворені в повторних експериментах фрагменти. Кожний RAPD-фрагмент розглядався як окремий генетичний локус [2].

Результати та обговорення

У результаті проведеного аналізу двох досліджуваних видів деревію виявлено 41 фрагмент, 32 з яких були поліморфними. Кількість ампліфікованих фрагментів ДНК у сумарній вибірці залежала від праймера і складала в цілому від 7 (OPP-3) до 13 (OPP-5). У середньому кожен з праймерів ініціював синтез 10 фрагментів ДНК. При аналізі RAPD фрагментів двох видів деревію встановлено, що кількість поліморфних фрагментів варіювала від 4 до 9 у *A. leptophilla* та від 4 до 12 у *A. glaberrima*. Загальна кількість RAPD фрагментів у *A. leptophilla* становила 36, у *A. glaberrima* – 37. Рівень поліморфізму ампліфікованих фрагментів ДНК, отриманих у результаті ПЛР зі всіма використаними RAPD праймерами, становив відповідно у *A. leptophilla* - 75% і 46% - у *A. glaberrima*. Кількість поліморфних фрагментів у сумарній вибірці варіювала від 5 до 12. Відповідно, залежно від RAPD праймера, рівень поліморфізму варіював від 66,7% до 100%, склавши в цілому для двох видів 78%. Слід зазначити, що при дослідженні одного з видів деревію – *A. fragrantissima* (Forssk.) Sch. Bip. – рівень поліморфізму за 6 RAPD праймерами, що утворюють 34 фрагменти, склав 65% [3]. В цілому отримані дані свідчать про значно більший рівень поліморфізму у *A. leptophilla*, який має більш широкий, хоча і диз'юнктивний ареал, у порівнянні з вузьколокальним ендеміком *A. glaberrima*. Це може свідчити про звуження генетичного різноманіття у вузькоареального виду *A. glaberrima*, високий ступінь адаптованості цього виду до специфічних умов зростання (мова йдеться про сформований в процесі еволюції генетичний оптимум виду), а також слабкий обмін генами між *A. glaberrima* та *A. leptophilla*, хоча на межі своїх ареалів ці два види здатні утворювати міжвидові гібриди. Слід також враховувати і деякі особливості виду *A. glaberrima*, а саме, значний внесок вегетативного розмноження. Не виключено, що низький рівень поліморфізму в майбутньому може стати однією з причин зникнення виду під все зростаючим антропогенним тиском. В той же час не слід поки-що робити якісь однозначні висновки, оскільки інформацію про генетичну мінливість виду не можна вважати повною без відомостей про рівень гетерозиготності видів. Така інформація може бути отримана завдяки залученню до популяційно-генетичного аналізу кодомінантних маркерів, зокрема, ізоферментів, мікросателітів. Використання як можна більшої кількості різноманітних генетичних маркерів дасть можливість отримати більш ґрунтовну інформацію стосовно генетичних процесів, що відбуваються в популяціях досліджуваних видів, а також вивчити питання, пов'язані з філогенією представників роду *Achillea*.

Література

1. Сытник К.М., Андрощук А.Ф., Клоков М.В. и др. Тысячелистники. – К.: Наук. думка, 1984. – 272с.
2. Бронникова С.В., Кокаева З.Г., Гостимский С.А., Дрибноходова О.П., Тихомирова Н.Н. Анализ ДНК-полиморфизма реликтового вида Урала

наперстянки крупноцветковой (*Digitalis grandiflora* Mill.) с помощью RAPD- и ISSR-маркером // Генетика. – 2007. – Т.43, №5. – С. 653-659.

3. Morsy A.A. Molecular Variations of *Achillea fragrantissima* (Forssk.) SCH. Bip. Growing in Five Areas of South Sinai // Int. J. Agri. Biol. □ 2007. □ Vol. 9, No. 1 □ P. 11-17.

Резюме

За допомогою RAPD маркерів досліджено генетичний поліморфізм двох ендемічних видів деревію *Achillea glaberrima* Klok. та *Achillea leptophilla* Bieb. Рівень поліморфізму у *A. leptophilla* склав 75% і 46% - у *A. glaberrima*. В цілому отримані дані свідчать про значно більший рівень поліморфізму у *A. leptophilla*, який має більш широкий, хоча і диз'юнктивний ареал, у порівнянні з вузьколокальним ендеміком *A. glaberrima*.

При помощи RAPD маркером исследован генетический полиморфизм двух эндемичных видов тысячелистника *Achillea glaberrima* Klok. и *Achillea leptophilla* Bieb. Уровень полиморфизма у *A. leptophilla* составил 75% и 46% - у *A. glaberrima*. В целом, полученные данные свидетельствуют о значительно большем уровне полиморфизма *A. leptophilla*, который имеет более широкий, хотя и дизъюнктивный ареал, по сравнению с узколокальным эндемиком *A. glaberrima*.

Genetic polymorphism of the two endemic species *Achillea glaberrima* Klok. and *Achillea leptophilla* Bieb. have been studied using RAPD markers. The level of genetic polymorphism of *A. leptophilla* is 75% and *A. glaberrima* - 46%. Obtained data indicate that the endemic *A. leptophilla* with wide disjunctive area have much more level of genetic polymorphism than the narrow-local *A. glaberrima*.

ПОЛІЩУК Л.В.¹, ЛУКЯНЧУК В.В.¹, МАРІЄВСЬКИЙ В.Ф.², РУБАН Н.М.².

¹ Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

Україна, Д03680, Київ, вул. акад. Заболотного, 154, e-mail: Polischuk@serv.imv.kiev.ua

² Інститут епідеміології та інфекційних хвороб АМН України,

Україна, 03038, Київ, вул. акад. Амосова, 5

ПЛАЗМІДИ ТРЬОХ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ ESCHERICHIA COLI

Як відомо, внутрішньо лікарняні інфекції (ВЛІ) стали однією з найбільш гострих проблем сучасної системи охорони здоров'я як в Україні, так і у всьому світі [1, 2, 7, 10]. Однією з характерних рис ВЛІ сьогодення є те, що її спалахи часто спричиняють умовно-патогенні мікроорганізми [1, 2, 7]. До 50% випадків ВЛІ її збудниками є бактерії родини *Enterobacteriaceae*, однак найбільш часто їх спричиняють штами *Escherichia coli*, деякі види родів *Kebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia* та ряд інших [7, 8].

Встановлено, що плазмідні широко поширені серед представників цієї родини мікроорганізмів [8, 12]. Позахромосомна ДНК виявлена у 25-75% всіх досліджених штамів, в залежності від місця відбору зразка та родових особливостей бактерій [12]. Наявність плазмідних ДНК у патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів має особливо велике значення через детермінацію ними стійкості до антибіотиків чи синтезу токсинів та можливість передачі цих властивостей патогенним мікроорганізмам [11].

У трьох клінічних штамів *Escherichia coli* було виявлено плазмідні ДНК. Метою роботи було визначення їх молекулярного розміру та рестрикційний аналіз.

Матеріали і методи

Об'єктами досліджень були штами *Escherichia coli* 345, 951 та 1257 з музею культур Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Громашевського.

В роботі використовували середовища МПБ та МПА.

Плазмідну ДНК з клітин *Escherichia coli* отримували методом, який запропонував Кізер [10].

Рестрикційний аналіз плазмідних ДНК проводили як запропоновано Маніатісом [5]. В роботі використовували рестриктази і ДНК фагу λ фірми "Ферментас"[4].

Електрофорез проводили в 0,8 % агарозі в ТБЕ буфері [5]. Як стандарт молекулярних розмірів фрагментів плазмідної ДНК використовували HindIII- та HindIII+EcoRI- фрагменти ДНК фагу λ [4, 5].

Результати та їх обговорення

Як повідомлялося вище, три штами *Escherichia coli*, які використовувалися в дослідженнях, було виділено при спалахах ВЛІ в різних лікарнях міста Києва. Наші дослідження виявили наявність плазмідних ДНК у всіх трьох штамів. Два штами *E. coli* (345 та 1257) містили по одній плазміді, а третій (*E. coli* 591) був багатоплазмідним.

В клітинах штаму *E. coli* 591 виявлено 3 плазмідних ДНК рЕС591-1 (50 тпн), рЕС591-2 (9,2 тпн) та рЕС591-3 (1,7 тпн). За даними літератури одночасне існування в клітині кількох плазмід є досить розповсюдженим явищем. Випадки мультиплазмідних штамів виявлені для представників різних родів (*Cyanobacteria*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Streptomyces* та багатьох інших) [9, 11-15]. Так, наприклад встановлено, що штам *E. coli* E24377A містить 6 плазмід з молекулярними розмірами 5,0 тпн, 6,2 тпн, 34,4 тпн, 70,1 тпн, 74,2 тпн та 79,2 тпн [3].

Раніше нами повідомлялося про виявлення плазмід рЕС1257 у штаму *Escherichia coli* 1257 [6]. За допомогою рестрикційного аналізу було встановлено, що на плазміді рЕС1257 є унікальні сайти рестрикції для 5 рестриктаз (Bsp120I, SalGI, Eco47I, BamHI та BglI), 2 сайти рестрикції для ферменту Bsp119I та жодного для 4 рестриктаз (PstI, EcoRI, XbaI та HindIII) та визначено її молекулярний розмір в 5,0 тпн. При гідролізі плазмід рЕС1257 ендонуклеазою рестрикції Bsp119I утворюються 2 фрагменти (2,0 тпн та 3,0 тпн) [6].

За допомогою лужно-фенольного методу Кізера у штаму *E. coli* 345 було виявлено плазмідну ДНК, яка отримала назву рЕС345. Дослідження фізичної будови виявленої коїційної плазмід рЕС345 проводилися з використанням 6 ендонуклеаз рестрикції II типу: PstI, Bsp119I, EcoRI, HindIII, BamHI та BglI. За даними рестрикційного аналізу цієї плазмідної ДНК встановлено, що плазмід має унікальні сайти рестрикції для 5 рестриктаз (Bsp119I, EcoRI, HindIII, BamHI та BglI) та 2 сайти рестрикції для ферменту PstI. При гідролізі плазмід рЕС345 ендонуклеазою рестрикції PstI утворюються 2 фрагменти (2,5 тпн та 2,65 тпн).

З даних літератури відомо, що однакова електрофоретична рухливість плазмід не означає тотожність їх первинної будови: так плазмід рAlvA (*Hafnia alvei*) та рBS512_5 (*Shigella boydii* CDC 3083-94) мають молекулярний розмір 5113 пн, але рестрикційний аналіз плазмідних ДНК виявив відмінності в їх нуклеотидних послідовностях [3, 13]. Аналогічні висновки по нетотожності 2 коїційних плазмід рKL1 та рO26-S1 з молекулярним розміром 1549 пн зроблено при дослідженні їх нуклеотидних послідовностей, які представлені в Інтернет-базі даних.[3, 11].

Порівняння даних рестрикційного аналізу плазмідних ДНК 2 штамів кишкової палички, представлених в таблиці дозволяють зробити висновок, що штами *Escherichia coli* 1257 та 345 містять неспоріднені плазмід рЕС1257 та рЕС345, що відрізняються нуклеотидною послідовністю їх молекул.

Рестрикційний аналіз плазмід рЕС345 та рЕС1257.

Ендонуклеази II типу	Кількість сайтів рестрикції на плазміді рЕС345	Кількість сайтів рестрикції на плазміді рЕС1257 [5].
Bsp119I	1	2 (2,0; 3,0 тпн)
EcoRI	1	0
BamHI	1	1
BglII	1	1
PstI	2 (2,5; 2,65 тпн)	0
HindIII	1	0
Середній молекулярний розмір плазмід	5,1 тпн	5,0 тпн

На початок 2009 року в Інтернет-базі даних представлено нуклеотидні послідовності 7 плазмід видів з родини *Enterobacteriaceae* з молекулярним розміром 5.0 – 5,1 тпн: рЕС01 (*Enterobacter cloacae* IFO 3320), рIGJC156, рIGRWZ12, рETEC_5 (*E.coli*), рAlvA (*Hafnia alvei*), рBS512_5 (*Shigella boydii* CDC 3083-94), рSS046_spB (*Shigella sonnei* 046_spB) [3, 13, 15].

Порівняльний аналіз інформації з Інтернет-баз даних про кількість сайтів рестрикції та розташування на цих 7 плазмідах та результатів, отриманих нами для плазмід рЕС1257 і рЕС345 дозволив зробити висновок про нетотожність фізичних карт виявлених нами двох плазмід *E. coli* рЕС345 та рЕС1257, з такими що представлені в базах даних [3].

Висновки

Таким чином, у всіх трьох штамів *Escherichia coli* довільно вибраних з великої колекції клінічних культур виявлено наявність позахромосомних ДНК. Один з них (штам 951) містив не менше трьох плазмід різного молекулярного розміру, в той час як два інших містять по одній плазміді.

Проведено рестрикційний аналіз плазмід рЕС345 та рЕС1257 та порівняльне дослідження отриманих результатів з інформацією Інтернет баз даних. Встановлено, що плазміди рЕС345 та рЕС1257 мають фізичні карти відмінні одна від одної та від ряду плазмід, представлених Інтернет-базах даних.

Література

1. Венцель Р.П. Внутрибольничные инфекции.- М.: Медицина, 1990.- 655 с.
2. Зуева Л.П., Раисовская Е.Н. Стратегия организации борьбы с внутрибольничными инфекциями в современных условиях // РЭТ-инфо.-2003, №2.-С.18-19.
3. Інтернет-база даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)
4. Каталог фірми МВІ. Fermentas.- 2006-2007.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии.-М.: Мир.- 1984.- 450 с.
6. Марієвський В.Ф., Рубан Н.М., Кролевецька Н.М., Лук'янчук В.В., Поліщук Л.В. Плазмідна штам *Escherichia coli* 1257 // Лабораторна діагностика.-2006.-Т.38, №4.-С.35-37.
7. Морозова Н.С. Дезинфектологические аспекты профилактики внутрибольничных инфекций // Матеріалі доповідей н-п. Конф. "Вчення Л.В. Громашевського в сучасних умовах боротьби з інфекційними хворобами".- К.-2006.-С.124-132.
8. Определитель бактерий Берджи, 9 издание. (под редакцией Дж.Чоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса).- М.:Мир, 1997.-т.1.-432 с.
9. Burian J., Guller L., Macor M., Kay W. W. Small cryptic plasmids of multiplasmid clinical *Escherichia coli*// Plasmid.-1997.-Vol.37,№1.-P.2-14

10. *Kieser T.* Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* // *Plasmid*.-1984, №12.- P.19-36.
11. *Russell A.D.* Plasmids and bacterial resistance to biocides// *J. Appl. Microbiol.*-1997.- Vol. 83, № 2.- P. 155-165.
12. *Su L.H., Chu C., Cloeckart A., Chiu C.H.* An epidemic of plasmid? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae* // *FEMS Immunol Med Microbiol.*-2008.-Vol.52, № 2.-P.155-166.
13. *Wertz J.E., Riley M.A.* Chimeric nature of two plasmid of *Hafnia alvei* encoding the bacteriocins alveicins A and B // *J. Bacteriol.*-2004.-Vol.186, №6.- P.1598-1605.
14. *Yang F., Yang J., Zhang X. et al.* Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery // *Nucleic Acids Res.*-2005.-Vol.33, № 19.-P. 6445-6458.
15. *Zaleski P., Wolinowska R., Strzerek K., Lakomy A., Plucianniczak A.* The complete sequence and segregation stability analysis of a new cryptic plasmid pIGWZ12 from a clinical strain of *Escherichia coli* // *Plasmid*.-2006.-Vol.56, № 3.-P.228-232.

Резюме

Исследовано на наличие плазмидной ДНК 3 клинических штамма *Escherichia coli*. Штаммы 345 и 1257 содержат по 1 плазмиде - pEC345 (5,1 тпн) и pEC1257 (5,0 тпн) соответственно. Штамм 951 содержит 3 плазмиды: pEC951-1 (50 тпн), pEC591-2 (7,2 тпн) и pEC591-3 (1,7 тпн). С помощью рестрикционного анализа выявлено различное первичное строение плазмид pEC345 и pEC1257.

Three clinical strains of *Escherichia coli* were investigated on presence of plasmid DNA. Strains 345 and 1257 contained on only one plasmid - pEC345 (5,1 kb) and pEC1257 (5,0 kb) accordingly. Three plasmids were found in strain 951: pEC951-1 (50 kb), pEC591-2 (7,2 kb) and pEC591-3 (1,7 kb). Restrictional analysis has revealed different primary structure plasmids pEC345 and pEC1257.

Наявність плазмідних ДНК досліджувалася у трьох клінічних штамів *Escherichia coli*. Штами 345 та 1257 містили по одній плазміді - pEC345 (5,1 тпн) та pEC1257 (5,0 тпн). Штам 951 містив 3 плазмиди pEC951-1 (50 тпн), pEC591-2 (7,2 тпн) и pEC591-3 (1,7 тпн). За допомогою рестрикційного аналізу виявлено різну первинну будову плазмід pEC345 и pEC1257.

ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А.І., ЮРКЕВИЧ Л.Н., КАЦАН В.А.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Інститут оздоровлення й відродження народів України,

Україна, 03143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, e-mail: potopalsky@imbg.org.ua

ГОМЕОБОКСНІ ГЕНИ, ЯК МОЖЛИВІ МІШЕНІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ ОТРИМАННІ НОВИХ ФОРМ ЖИТА.

2.ЗАКОНОМІРНОСТІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ СЕЛЕКЦІЇ КОРОТКОСТЕБЛОВИХ ФОРМ ДИПЛОЇДНОГО ЖИТА

В попередній нашій роботі повідомлялося про індукування за допомогою препаратів екзогенних ДНК (е-ДНК) та їх алкілованих тіофосфамідом аналогів (е-ДНК(т)) спадкових форм рослин з ярим типом розвитку в озимого диплоїдного жита сорту Житомирське, водночас зі змінами морфологічних ознак. Сприятливими для підвищення врожайності жита є збільшення кількості продуктивних стебел, довжини колосу, галузження колосу [1]. Дуже важливими є також форми жита з потовщеним та вкороченим

стеблом [1-3]. В умовах інтенсивної культури землеробства пошук нових методів селекції жита з укороченим, стійким проти вилягання стеблом набуває першочергового значення. Їх отримують в основному методами гібридизації, проте короткостебловість у сортів жита, які є носіями цієї ознаки, кодується багатьма рецесивними генами і має широку плейотропну дію [4]. Іншим недоліком сортів-донорів цієї ознаки є їх знижена морозостійкість, слабка коренева система та враження фітопатогенами, тому необхідні складні схрещування [4,5]. Відомі також виділені із гібридних сортів мутанти жита з моногенним кодуванням короткостебловості: EM-1, K-10028, в яких ознака обумовлена домінантним геном-супресором *H1* (*Humilus*) [6]. Для отримання константних короткостеблових форм жита використовують схрещування з насиченням (5-6) та багаторазовий добір гомозиготних нащадків [7]. Мутанти жита з укороченим стеблом можна отримувати також при дії хімічними та фізичними мутагенами [8,9] і, як уже повідомлялося, за допомогою е-ДНК [1-3]. Метою даного дослідження є аналіз закономірностей дії екзогенних ДНК при селекції короткостеблових форм диплоїдного жита.

Матеріали і методи

Препаратами ДНК діяли на пророщене протягом 24 годин насіння рослин чистої лінії жита сорту Житомирське ($2n=2x=14$), методом інфільтрації його водними розчинами ДНК упродовж 24 годин, після чого ретельно промивали водою. Використані препарати нативних та алкілованих трифункціональним алкілувальним агентом – тіофосфамідом ДНК із тимусу телят (Олайнський завод, $M \approx 10 \div 12 \cdot 10^6$ Д), ДНК людини, а також отримані в нашій лабораторії [10-12] препарати рослинних ДНК – кукурудзи, щиріці, люпину. Згідно з даними електрофорезу в гелі агарози, М використаних в наших дослідженнях рослинних ДНК коливалася в межах $10 \div 15 \cdot 10^6$ Д. Вміст основної речовини в препаратах був не меншим 95%, концентрація ДНК у розчинах для інфільтрації насіння перебувала в межах 100÷400 мкг/мл. Відбір форм жита з укороченим стеблом здійснювали, починаючи з покоління рослин, вирощених із обробленого насіння (T_0). В наступних поколіннях аналізували ознаки, пов'язані із врожайністю (кількість продуктивних стебел, маса зерна з основного колосу, маса зерна з рослини). Рослини вирощували на ізольованих ділянках, на суцвіття до зацвітання вдягали пергаментні ізолятори. Оцінку достовірності різниці між дослідом та контролем оцінювали за Стьюдентом [13].

Результати та обговорення

Рослини зі статистично вірогідним зменшенням довжини стебла виявлені в T_1 у варіантах досліді, де були застосовані препарати е-ДНК із тимусу телят, е-ДНК кукурудзи та щиріці (Табл.). Залежність величини зменшення висоти стебла від концентрації проявлялася по-різному – досягнення плато за концентрації 200 мкг/мл у варіанті з тимусною ДНК та зростання ефекту з підвищенням концентрації до 400 мкг/мл – для ДНК кукурудзи. Алкіловані тіофосфамідом ДНК того ж походження також індукували появу короткостеблових форм жита; в алкілованому стані виявила ефект також е-ДНК людини. У варіанті з е-ДНК(т) кукурудзи також спостерігали зростання міри зниження висоти стебла жита при збільшенні концентрації препарату (Табл.). Статистично вірогідних змін параметрів врожайності в поколінні T_1 . не спостерігали.

Таблиця

Вплив препаратів екзогенних ДНК на довжину головного стебла (% від контролю) жита сорту Житомирське в $T_1(1)$ та в $T_2(2)$

Препарат ДНК		е-ДНК				е-ДНК(т)		
		100 мкг/мл	200 мкг/мл	300 мкг/мл	400 мкг/мл	100 мкг/мл	200 мкг/мл	400 мкг/мл
тимусу	1	90,1±2,5***	81,2±2,8***	83,6±3,0***	82,0±1,7***	78,5±4,6***	90,7±3,8***	-
	2	93,1±3,2	80,4±3,5**	86,2±5,1*	82,2±5,9	83,0±3,7**	81,8±3,9**	-
людини	1	100,1±2,2	100,8±4,0	100,0±2,9	91,4±2,4*	100,8±2,9	91,3±2,4**	-
	2	92,6±4,6	105,4±3,2	89,5±4,7	85,9±2,3*	88,7±6,4	90,5±6,0	-
куку-	1	90,8±2,7**	91,1±2,4***	-	84,8±3,9***	100,2±2,0	91,4±1,9***	56,8±4,9***

рудзи	2	98,3±5,3	99,1±2,4	-	80,4±3,5***	86,5±4,8	82,3±1,7***	61,1±2,9***
щириці	1	91,8±4,5**	92,0±3,3**	-	-	92,4±3,3***	92,3±2,8***	-
	2	84,3±4,9***	74,8±4,3***	-	-	83,8±4,1*	90,1±2,4*	-
люпину	1	100,5±2,2	-	-	-	101,4±1,3	-	-
	2	100,8±2,1	-	-	-	92,2±3,1	-	-
контроль	1	108,98±1,78 см – 100%						
	2	131,5±3,80 см – 100%						

Примітка: Відмінність від контролю вірогідна при: * – $P \geq 0,1$; ** – $P \geq 0,01$; *** – $P \geq 0,001$.

В поколінні T_2 для варіанту з е-ДНК із тимусу ознака короткостебловості збереглася тільки для концентрації, рівної 200 мкг/мл; для е-ДНК кукурудзи – 400 мкг/мл, в той час як для е-ДНК шириці виявлено збереження ознаки для обох концентрацій (Табл.). Збереження ознаки короткостебловості в T_2 було притаманне також для варіантів, де були використані е-ДНК(т) із тимусу та кукурудзи, і найбільш суттєве зниження висоти стебла (майже удвічі) теж виявлено за максимальної концентрації е-ДНК(т) кукурудзи. Алкіловані ДНК виявили статистично вірогідний вплив на параметри врожайності. Збільшення кількості продуктивних стебел спостерігали у варіантах з е-ДНК(т) із тимусу телят ($P \geq 0,001$), кукурудзи (100, 200 та 400 мкг/мл, $P \geq 0,001$) та шириці (100 мкг/мл, $P \geq 0,001$); збільшення маси зерна з рослини – е-ДНК(т) із тимусу (100 та 200 мкг/мл, $P \geq 0,001$) та е-ДНК(т) кукурудзи (200 мкг/мл, $P \geq 0,001$).

Найбільш суттєве зниження висоти стебла жита при стабільному виявленні ознаки в поколінні T_2 виявила е-ДНК(т) кукурудзи, 400 мкг/мл (Табл.), тому надалі ми проаналізували успадковування цієї ознаки в сім'ях із цього варіанту досліду до T_5 . У поколінні T_2 короткостебловість зберігалася в сім'ї від 1 рослини із 11 досліджених, тобто з частотою 9,09%. У 16 рослин із 180 досліджених (8,8%) висота була значно нижчою контролю (на 55,0±3,81 см). У поколінні T_3 для 4 сімей із 16 досліджених виявлено 100% успадковування ознаки короткостебловості; із 800 досліджених рослин 87, 5% виявилися короткостебловими; при цьому довжина стебла вірогідно зменшувалась на 51,1–68,6 см порівняно з контролем. У поколінні T_4 виявлялося тільки 3% високорослих рослин (із 3000 досліджених рослин). Зменшення довжини стебла відбувалося за рахунок зменшення довжини всіх меживузоль.

Короткостебловість успадковувалася як домінантний фактор згідно Менделю [3]. В поколіннях короткостеблових рослин виявлено також ознаки, пов'язані із продуктивністю жита – в поколінні T_2 рослин із варіантів застосування е-ДНК із тимусу та е-ДНК людини спостерігали галушення стебла (з частотою 1,42 та 2,10%) та колосу (1,70 та 1,80%) відповідно. Е-ДНК із тимусу спричинила в T_2 з частотою 1,40% принципово нову для жита мутацію – розсічену листову пластинку; е-ДНК(т) людини та кукурудзи – в поколіннях T_2 - T_3 появу зерен “пшеничного типу”. Домінантна мутація триквітковості жита виявлена в поколіннях T_3 - T_4 для більшості варіантів короткостеблових рослин, отриманих при застосуванні алкілованих ДНК, дає збільшення зерна з колосу на 65%. Домінантну мутацію фіолетового забарвлення зерен індукували е-ДНК кукурудзи (T_3) та е-ДНК(т) кукурудзи (T_4).

Отже, внаслідок дії екзогенними ДНК в жита індуковано комплекс взаємопов'язаних успадковуваних змін. Відомо, що головними факторами, які регулюють довжину стебла та меживузоль у рослин, є рівень біологічно активних гіберелінів у провідних тканинах та чутливості до них, обумовленої компонентами трансдукції сигналу від гіберелінів [15-19]. Підвищений рівень активних гіберелінів обумовлює явища гетерозису в гібридів [20]. Висота рослин та ознаки, від яких залежить врожайність, у зернових детермінуються комплексом гіберелінів, брасіностероїдів та цитокинінів [21]. Рівень фітогормонів у тканинах рослин контролюється сигналами від програми розвитку та від довкілля, підлягає регуляції гомеобоксними генами [22-25]. Розвиток повноцінної третьої квітки в колосках жита, як і в ячменю [14], може обумовлюватись мута-

цією гомеобоксного гена. Ініціювання та розвиток додаткових органів (стебел, пагонів, галуження квітконосного стебла, осі суцвіття, розділення листкової пластинки на сегменти, тощо), поява антоціанових пігментів, що мають адаптивне значення, також регулюється гомеобоксними генами [23-25]. Вага зерен, зокрема в пшениці, контролюється геном-модулятором, який може мати плейотропну дію на довжину стебла [26]. Отримані в даному дослідженні закономірності дії екзогенних ДНК, поряд із наведеними вище літературними даними про молекулярні механізми явищ, однотипових з індукованими за допомогою е-ДНК, можуть слугувати додатковим підкріпленням нашої гіпотези про те, що одним із найважливіших механізмів дії екзогенних ДНК на спадковість рослин може бути їх вплив на гомеобоксні гени, які належать до різних рівнів системи регуляції геному і є ключовими регуляторами сітки сигналів від доквілля та реалізації відповідей на них; така гіпотеза висловлювалась нами раніше [1,23].

Висновки.

1. Індукована за допомогою препаратів ДНК ознака короткостебловості в диплоїдного озимого жита сорту Житомирське успадковується як домінуючий моногенний фактор. Міра зниження висоти стебла та стабільність успадкування ознаки залежать як від природи ДНК, так і від концентрації їх у розчинах для інфільтрації насіння, а також від алкілювання їх тіофосфамідом.
2. В лінійях короткостеблових рослин спостерігали спадкові зміни ознак, сприятливих для підвищення продуктивності жита – домінуючу мутацію триквітковості, збільшення кількості продуктивних стебел, врожайності зерна з рослини та з основного колосу, галуження стебла та галуження колосу.
3. За допомогою препаратів ДНК кукурудзи одночасно із короткостебловістю в жита індуковано домінуючу мутацію фіолетового забарвлення зерна.

Література

1. *Потопальський А.І., Юркевич Л.Н., Кацан В.А.* Гомеобоксні гени, як можливі мішені дії екзогенних ДНК при отриманні нових форм жита // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2008. – Т. 4. – С. 302-308.
2. *Потопальський А.І., Юркевич Л.Н., Маиталер С.Г.* Использование препаратов экзогенных ДНК в селекции озимой ржи на короткостебельность // Селекция и семеноводство. – 1992. – № 4-5. – С. 5-8.
3. *Маиталер С.Г., Юркевич Л.Н., Потопальський А.І.* Эффекты действия экзогенных ДНК у ржи // Частная генетика растений. Тезисы Всесоюзной конференции. Киев, май 1989. – С. 154-155.
4. *Кобылянский В.Д.* Генетический анализ как метод отбора константных форм короткостебельной ржи // Селекция и семеноводство. – 1974. - № 6. – С. 12-15.
5. *Кобылянский В.Д.* Рожь. – М.: Колос, 1982, 262 с.
6. *Кобылянский В.Д.* Новый источник короткостебельности для селекции неполегаемой ржи // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1971. - № 9. – С. 58-65.
7. *Кондратенко Ф.Т., Гончаренко А.О.* Пути повышения эффективности озимой ржи // Селекция и семеноводство. – 1973. - № 1. – С. 28-33.
8. *Богданова М.А.* Использование химических мутагенов в селекции короткостебельной озимой ржи // Селекция и семеноводство зерновых и бобовых культур. – 1987. – С. 47-50.
9. *Мушиньски С.* Мутанты у озимой ржи (*Secale cereale L.*) под воздействием быстрых нейтронов и N-нитрозо N-этилмочевины // Симпозиум по селекции ржи, 4-9 июля 1988 г. Тезисы докладов. – Ленинград, 1988. – С. 36.
10. *Сквирская Э.Б., Чепинога О.П.* Практикум по нуклеопротеидам и нуклеиновым кислотам. – М.: Высшая школа, 1964. – 214 с.
11. *Пацковский Ю.В., Соловьян В.Т., Потопальський А.І., Ткачук З.Ю.* Степень алкилирования и физико-химические свойства модифицированных тифосфамидом ДНК // Респуб. межвед. сборник “Молекулярная биология”. – Киев, 1984. – Вып.37. – С. 44-50.
12. *Способ* получения дезоксирибонуклеиновой кислоты из растительного сырья: А.с. СССР № 1170871 Т, МКИ С 12 N 15/00, С 07 Н 21/00 / З.Ю. Ткачук., А.И. Потопальский (СССР). - № 2995141; Заявлено 03.10.80 г., А.с. выдано 01.04.85.
13. *Кокунин В.А.* Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – т. 47, № 6. – С. 776-790.
14. *Komatsuda T., Pourkheirandish M., He S., et al.* Six-rowed barley originated from a mutation in a homeodomain-leucine zipper 1-class homeobox gene // PNAS. – 2007. – vol. 104, № 4. – P. 1424-1429.
15. *Zhang Y., Zhu Y., Peng Y., et al.* Gibberellin homeostasis and plant height control by EUI and a role for gibberellin in root gravity responses in rice // Cell Res. – 2008. – vol. 18, № 3. – P. 412-421.

16. Iuchi S., Suzuki H., Kim Y.C., et al. Multiple loss-of-function of Arabidopsis gibberellin receptor AtGID1s completely shuts down a gibberellin signal // *Plant J.* – 2007. – vol. 50, № 6. – P.958-966.
17. Komorisono M., Ueuchi-Tanaka M., Aichi T., et al. Analysis of the rice mutant gladius leaf 1. Aberrant katanin-mediated microtubule organization causes up-regulation of gibberellin biosynthetic genes independently of gibberellin signalling // *Plant Physiol.* – 2005 – vol. 138, № 4. – P. 1982-1993.
18. Milczarsky P., Masojć P. The mapping of QTLs for chlorophyll content and responsiveness to gibberellic (GA3) and abscisic (ABA) acids in rye // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – vol. 7, № 2A. – P. 449-455.
19. Ikeda A., Ueuchi-Tanaka M., Sonoda Y., et al. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLT1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8 // *Plant Cell.* – 2001. – vol. 13, № 5. – P. 999-1010.
20. Zhang Y., Ni Z., Yao Y., Nie X., Sun Q. Gibberellins and heterosis of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *BMC Genet.* – 2007. – vol. 29, № 8. P. 40.
21. Sakamoto T. Phytohormones and rice crop yield: strategies and opportunities for genetic improvement // *Transgenic Res.* – 2006. – vol. 15, № 4. – P. 399-404.
22. Stavang J.A., Lindgard B., Erntsen A., et al. Thermoperiodic stem elongation involves transcriptional regulation of gibberellin deactivation in pea // *Plant Physiol.* – 2005. – vol. 138, № 4. – P. 2344-2353.
23. Кацан В.А., Потопальський А.І. Особливості дії екзогенних ДНК при отриманні нових форм тютюну. – Київ: Колоб'іг, 2007. – 176 с.
24. Shimizu R., Ji J., Kelsey E., et al. Tissue specificity and evolution of meristematic WOX3 function // *Plant Physiol.* – 2009 – vol. 149, № 2. – P. 841-850.
25. Rosin F.M., Hart J.K., Horner H.T., et al. Overexpression of a *knotted*-like homeobox gene of potato alters vegetative development by decreasing gibberellin accumulation // *Plant Physiol.* – 2003. – vol. 132, № 1. – P.106-117.
26. Röder M.S., Huang X.Q., Börner A. Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight // *Funct. Integr. Genomic.* – 2008. – vol. 8, №1. – P. 79-86.

Резюме

При дії препаратів екзогенних ДНК рослинного та тваринного походження на проростаюче насіння озимого диплоїдного жита сорту Житомирське індуковано домінуючу моногенну мутацію короткостебловості. Водночас із короткостебловістю, в отриманих лініях рослин спостерігали комплекс змін, які сприяють підвищенню врожайності жита.

При действии препаратов экзогенных ДНК растительного и животного происхождения на прорастающие семена озимой диплоидной ржи сорта Житомирская индуцирована доминантная моногенная мутация короткостебельности. Одновременно из короткостебельностью, у полученных линиях растений наблюдали комплекс изменений, связанных с повышением урожайности ржи.

While acting of the preparations of the plant's and animal's exogenous DNAs on the germinating seeds of the cultivar of the winter diploide rye Zhytomyrska, the dominant monogenic mutation of decreasing of plant height was induced. Simultaneously with decreasing of plant height, the complex of alterations, underlying the crop yield improvement in the rye, was observed in the lines of plants to be obtained.

ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

Україна, 03680, Київ, вул.Заболотного, 150, e-mail:specrada@imb.org.ua

ПОТЕНЦІЙНІ ЦИС-ЕЛЕМЕНТИ *AluSp*-ПОВТОРУ В ПРОМОТОРІ ГЕНА *MGMT*

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) становлять значну частину ДНК еукаріотів, зокрема, майже 45 % геному людини [1]. Численні дані свідчать про різноманітну роль цих елементів у геномі – від чинників пластичності до мутабельності чи нестабільності. Обговорюється їхня роль в еволюції геномів [2,3] та еволюції генної регуляції [4-6]. Інтегруючи в екзони, МГЕ можуть спричиняти мутації [7,8], в інтрони – бути джерелом сайтів альтернативного сплайсингу [9], у промоторні ділянки генів – джерелом цис-регуляторних модулів, які є кластерами сайтів зв'язування транскрипційних факторів [10-13]. Наприклад, у консенсусній послідовності *Alu*-повторів виявлено наявність сайтів зв'язування для 20-ти транскрипційних факторів, функціональну активність

більшості із яких доведено експериментально [13]. Безпосередню участь *Alu*-повторів у регуляції експресії показано для шести генів, які пов'язані із диференціюванням і розвитком (*PTH*, *FcεRI-γ*, *CD8α*, *CHRNA3*, *BRCA-1* і *PLOD-1*) [14]. Відомо, що близько 24 % генів геному людини містять МГЕ у промоторних ділянках [10]. Особливо збагачені МГЕ (зокрема, *Alu*-повторами) гени, які пов'язані із метаболічними процесами [13]. На прикладі генів *DNAseII* і *CAML* людини показано, що наявність *Alu*-повторів у складі промотору може впливати на експресію досліджуваних генів [15].

Ген *MGMT* є онкосупресором, який кодує репаративний фермент O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферазу (*MGMT* - у людини, *Mgmt* – у гризунів), що захищає клітину від мутагенної дії алкілувальних канцерогенів [16]. Цей ген експресується як у нормальних, так і у злоякісних клітинах, проте рівень його експресії варіює залежно від типу клітин та їхніх ростових характеристик [17]. Чи є МГЕ у промоторі гена *MGMT* і чи можуть вони впливати на рівень його експресії? Метою даного дослідження було проаналізувати промоторну ділянку гена *MGMT Homo sapiens* (а також для порівняння *Mus musculus* і *Rattus norvegicus*) на наявність МГЕ та з'ясувати чи містять вони потенційні цис-регуляторні елементи.

Матеріали і методи

Нуклеотидні послідовності промоторних ділянок гена репаративного ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази *Homo sapiens*, *Mus musculus* і *Rattus norvegicus* взято із бази даних Transcriptional Regulatory Element Database, TRED (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED>). Основну інформацію про досліджувані промоторні ділянки наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Дані про промоторні ділянки гена репаративного ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази

Організм	Ген, назва	Хромосомна локалізація	Ланцюг	Координати старту транскрипції	Номер у базі даних TRED
<i>Homo sapiens</i>	<i>MGMT</i>	10 q26	+	131264108	5071
<i>Mus musculus</i>	<i>Mgmt</i>	7 66.0 cM	+	125854096	77428
	<i>Mgmt</i>	7 66.0 cM	+	125906036	77429
	<i>Mgmt</i>	7 66.0 cM	+	125910396	77430
<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Mgmt</i>	1q41	+	189574476	85957

Гомологію із МГЕ шукали за допомогою програми CENSOR (<http://www.girinst.org/censor/index.php>) [18]. Функціональні сайти визначали користуючись програмою TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Наявність CpG-острівців виявляли за допомогою програми MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/index1/html>) та CpG Island Searcher (http://www.uscnorris.com/cpgislands_2/cpg.aspx). Для їхнього пошуку використовували стандартні критерії: довжина острівця повинна становити як мінімум 200 н.п., склад GC повинен бути не меншим 50 %, співвідношення спостережуваної кількості CpG-динуклеотидів до очікуваної – більше 0,6.

Результати та обговорення

Досліджуючи промотор гена *MGMT*, який у базі даних TRED значиться як реферована послідовність, виявили частково делетований *AluSp*-повтор у дистальному сегменті промотору (табл. 2, рис. 1). *AluSp*-повтор, як видно із рис.2, виявляє гомологію із сайтами зв'язування для восьми транскрипційних факторів: Elk-1 (ключовий регулятор індукційної транскрипції протоонкогена *c-fos*); SREBP (ключовий регулятор експресії генів ліпідного метаболізму); Sp1 (один із основних факторів

транскрипції, бере участь у регуляції клітинного циклу, зміні структури хроматину і регуляції метилування ДНК); GATA-2 (гематопоетичний транскрипційний фактор); Tst-1 (транскрипційний регулятор у кератиноцитів, гліальних клітин і нейронів); E47 (гематопоетичний транскрипційний фактор); E2F (ключова роль у регуляції клітинного циклу) та Oct-1 (відіграє важливу роль у розвитку і функціонуванні нервової системи).

Таблиця 2

Мобільні генетичні елементи у промоторних ділянках гена репаративного ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази

Організм	Умовне позначення промотору	Дані про мобільні генетичні елементи				
		Елемент	Клас	Довжина	Напрямок	Координати у межах промотору
<i>Homo sapiens</i>	hO ⁶ P1	<i>AluSp</i>	Non-LTR/SINE	180	с	-768/-589
<i>Mus musculus</i>	mO ⁶ P1	<i>MLT1B</i>	ERV/ERV3	79	с	-842/-769
		<i>MLT1B</i>	ERV/ERV3	163	с	-734/-572
	mO ⁶ P2	<i>CLAUDIA1 TM</i>	LTR/Copia	29	с	-272/-244
	mO ⁶ P3	<i>Copia12-VV_I</i>	LTR/Copia	31	d	+31/+61
<i>Rattus norvegicus</i>	rO ⁶ P1	<i>MLT1B</i>	ERV/ERV3	104	с	-743/-640
		<i>ERV2X1A-I ML</i>	ERV/ERV3	100	d	+156/+255

Примітки: с – комплементарний; d – прямий.

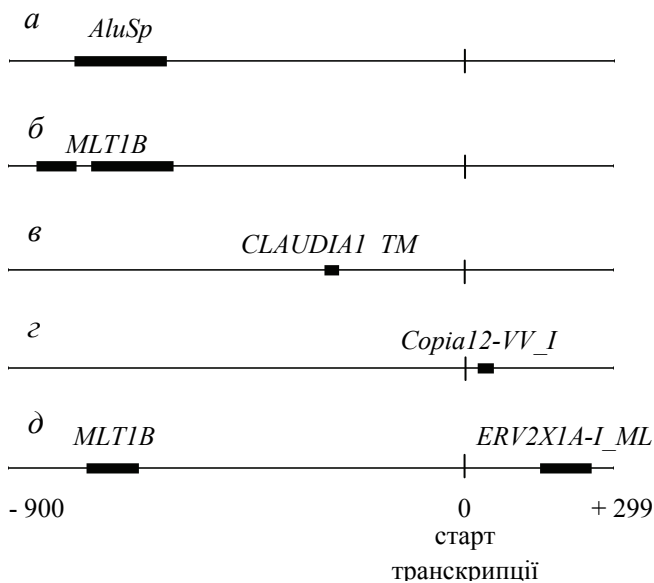


Рис. 1. Ідентифіковані мобільні генетичні елементи у промоторних ділянках гена репаративного ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази: а – hO⁶P1; б – mO⁶P1; в – mO⁶P2; з – mO⁶P3; д – rO⁶P1

```

a
1  CTGGGTGCAG TGGCTCATGC CTGTAATCCC AGCACTTTGG AAGGCTGAGA
----- Elk-1

51  CAGGAAGATC ACTTGAATC AGGAGTTGAA ACCAGACTGG GCAACGTAGC
----->
-----> SREBP-1
-----> Elk-1

101 AAGACCCTGC CCCAAAAGAA TTAATAATTAG CTGGGTATGA TAGCACACAC
<-----
-----> Sp1
-----> GATA-2
-----> Tst-1
-----> E47
-----> E2F
-----> Oct-1

151 CTGTAGTTCC AGCTGCTCAG GAGGCTGAAG
-----
----- E47

```

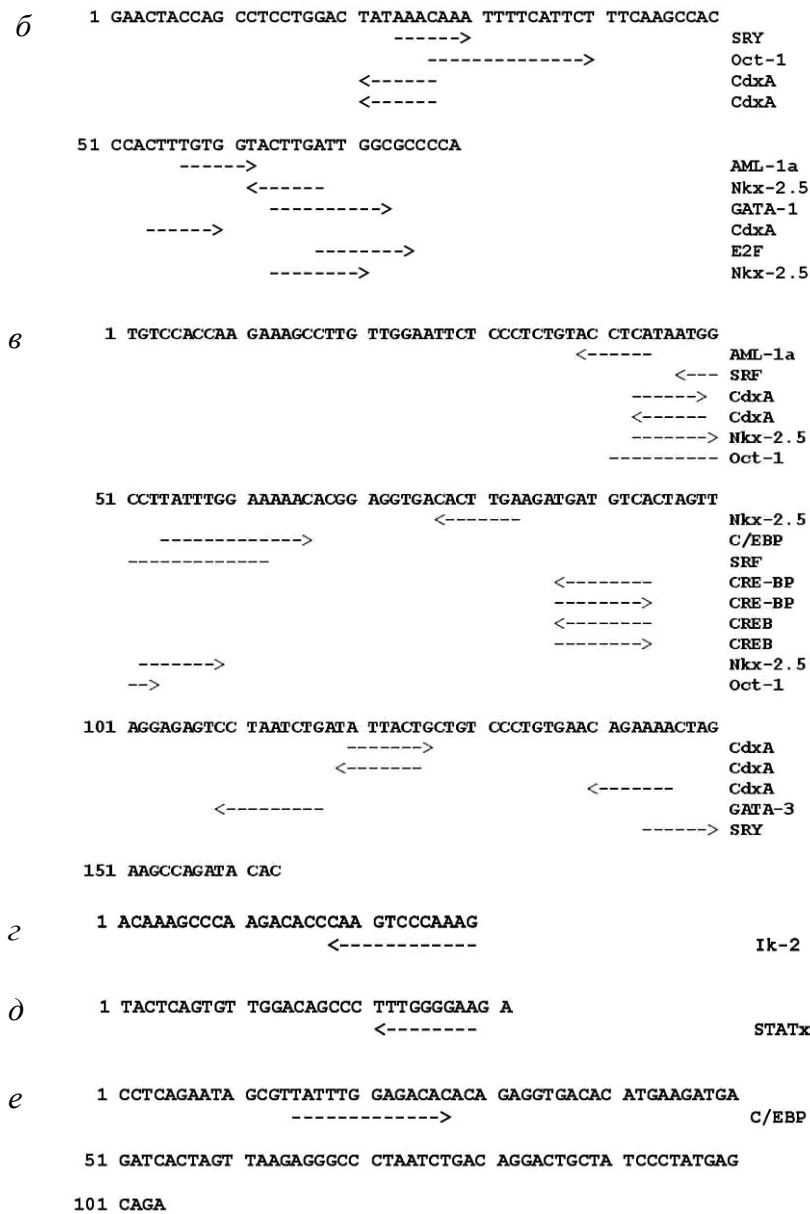


Рис. 2. Можливі сайти зв'язування транскрипційних факторів у мобільних генетичних елементах, виявлених у промоторних ділянках гена репаративного ферменту O⁶-метилгуанін-ДНК метилтрансферази: *a* – *AluSp* (*Homo sapiens*); *б, в* – *MLT1B* (*Mus musculus*); *г* – *CLAUDIA1_TM* (*Mus musculus*); *д* – *Copia12-VV_I* (*Mus musculus*); *е* – *MLT1B* (*Rattus norvegicus*)

Аналізуючи промоторні ділянки гена *Mgmt* *Mus musculus* і *Rattus norvegicus* ідентифікували фрагменти МГЕ, які належать до класу LTR-повторів або ендегенних ретровірусів (табл. 2, рис. 1). Цікаво, що у випадку реферованої послідовності промотору mO⁶P3 *Mus musculus* фрагмент LTR-повтору є частиною корового промотору і містить послідовність гомологічну сайту зв'язування для транскрипційного фактора STAT, що, очевидно, вказує на залучення LTR-повтору в регуляцію досліджуваного гена. Реферована послідовність промотору гена *Mgmt* *Rattus*

norvegicus rO⁶P1 і відома mO⁶P1 *Mus musculus* містить фрагмент LTR (довгого кінцевого повтору) ретровірусоподібного MaLR елемента. Він присутній, хоча і зазнав делецій, у промоторі досліджуваного гена у представників гризунів (миша, щур), тоді як у приматів (на прикладі людини) відсутній. Натомість у *Homo sapiens* присутній МГЕ, який належить до класу SINE-елементів (табл. 2). Порівнюючи сайти зв'язування для транскрипційних факторів у МГЕ, які присутні у промоторних ділянках видно, що вони різні у досліджуваних організмів (рис. 2). Лише два із них E2F і Oct-1 присутні у *Homo sapiens* та *Mus musculus* і один C/EBP у *Mus musculus* та *Rattus norvegicus*. Це узгоджується із думкою про ускладнення регуляції генів упродовж еволюції та участі у цьому процесі МГЕ [19-21].

Чи може *AluSp*-повтор, ідентифікований нами у промоторі гена *MGMT*, бути функціональним? Для виявлення функціональних *Alu*-повторів запропоновано принцип, який базується на тому, що наявність у промоторах генів цис-регуляторних модулів і CpG-острівців, які перекриваються із *Alu*-повтором, підвищує ймовірність того, що даний *Alu*-повтор виконує регуляторну роль [22]. Як видно із наведених результатів (рис.2), *AluSp*-повтор перекривається із цис-регуляторним модулем, але, застосовуючи два методи пошуку CpG-острівців, їх не було виявлено для даного МГЕ. Тому питання його функціональної активності є дискусійним і потребує подальших досліджень.

Висновки

У промоторній ділянці гена *MGMT Homo sapiens* ідентифіковано *AluSp*-повтор, який містить сайти зв'язування для восьми транскрипційних факторів. Наявність цис-регуляторного модуля може свідчити про функціональну активність даного МГЕ.

Література

1. *International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome // Nature.*- 2001.- vol.409, № 6822.- P.860-921.
2. *Deininger P.L., Moran J.V., Batzer M.A., Kazazian H.H. Jr. Mobile elements and mammalian genome evolution // Curr. Opin. Genet. Dev.* - 2003.- vol.13, № 6.- P.651-658.
3. *Евгеньев М.Б. Мобильные элементы и эволюция генома // Молекулярная биология.*- 2007.- Т.41, № 2.- С.234-245.
4. *Medstrand P., van de Lagemaat L.N., Dunn C.A., Landry J.R., Svenback D., Mager D.L. Impact of transposable elements on the evolution of mammalian gene regulation // Cytogenet Genome Res.*- 2005.- vol.110, № 1-4.- P.342-352.
5. *Jurka J. Conserved eukaryotic transposable elements and the evolution of gene regulation // Cell. Mol. Life Sci.*- 2008.- vol.65, № 2.- P.201-204.
6. *Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks // Nat.Rev.Genet.*- 2008.- vol.9, № 5.- P.397-405.
7. *Kazazian H.H. Jr. Mobile elements and disease // Curr. Opin. Genet. Dev.*- 1998.- vol.8, № 3.- P.343-350.
8. *Callinan P.A., Batzer M.A. Retrotransposable elements and human disease // Genome Dyn.*- 2006.- vol.1.- P. 104-115.
9. *Sorek R., Ast G., Graur D. Alu-containing exons are alternatively spliced // Genome Res.*- 2002.- vol.12, № 7.- P.1060-1067.
10. *Jordan I.K., Rogozin I.B., Glazko G.V., Koonin E.V. Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements // Trends Genet.*- 2003.- vol.19, № 2.- P.68-72.
11. *Shankar R., Grover D., Brahmachari S.K., Mukerji M. Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements // BMC Evol.Biol.*- 2004.- vol.4, № 1.- P.37.
12. *Thornburg B.G., Gotea V., Makalowski W. Transposable elements as a significant source of transcription regulating signals // Gene.*- 2006.- vol.365.- P.104-110.

13. Polak P., Domany E. Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes // BMC Genomics.- 2006.- vol.7.- P.133.
14. Hamdi H.K., Nishio H., Tavis J., Zielinski R., Dugaiczky A. Alu-mediated phylogenetic novelties in gene regulation and development // J.Mol.Biol.- 2000.- vol.299, № 4.- P.931-939.
15. Усманова Н.М., Казаков В.И., Томилин Н.В. Ретротранспозоны *Alu*- семейства из цис-регуляторных модулей промоторов генов *DNaseII* и *SAML* влияют на генную экспрессию в клетках A549 и HEK293 // Цитология.- 2008.- Т.50, № 3.- С.249-255.
16. Pegg A.E. Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases // Mutat. Res.- 2000.- vol.262, № 2-3.- P.83-100.
17. Guan Q., Matsumoto K., Nakabeppu Y., Iwaki T. A comparative immunohistochemistry of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and p53 in diffusely infiltrating astrocytomas // Neuropathology.- 2003.- vol.23, № 3.- P.203-209.
18. Kohany O., Gentles A.J., Hankus L., Jurka J. Annotation, submission and screening of repetitive elements in Repbase: Repbase Submitter and Censor // BMC Bioinformatics.- 2006.- vol.7.- P. 474.
19. Mariño-Ramírez L., Lewis K.C., Landsman D., Jordan I.K. Transposable elements donate lineage-specific regulatory sequences to host genomes // Cytogenet. Genome Res.- 2005.- vol.110, №1-4.- P.333-341.
20. Polavarapu N., Mariño-Ramírez L., Landsman D., McDonald J.F., Jordan I.K. Evolutionary rates and patterns for human transcription factor binding sites derived from repetitive DNA // BMC Genomics.- 2008.- vol.9.- P.226.
21. Bourque G., Leong B., Vega V.B., Chen X., Lee Y.L., Srinivasan K.G., Chew J.L., Ruan Y., Wei C.L., Ng H.H., Liu E.T. Evolution of the mammalian transcription factor binding repertoire via transposable elements // Genome Res.- 2008.- vol.18, №11.- P.1752-1762.
22. Oei S.L., Babich V.S., Kazakov V.I., Usmanova N.M., Kropotov A.V., Tomilin N.V. Cluster of regulatory signals for DNA polymerase II transcription associated with Alu family repeats and CpG islands in human promoters // Genomics.- 2004.- vol.83, № 5.- P.873-882.

Резюме

В промоторной области гена *MGMT Homo sapiens* идентифицировано *AluSp*-повтор, который несет сайты связывания для восьми транскрипционных факторов. Наличие цис-регуляторного модуля может свидетельствовать о функциональной активности данного МГЕ.

AluSp repeat having eight binding sites for transcription factors have been identified in the human *MGMT* promoter. The availability of cis-regulatory module may be evidence of possible functional significance of this mobile element.

РОМАНИЮК Л.В.¹, ЖУМИНСКАЯ А.И.², МУКВИЧ Н.С.¹, ТОВКАЧ Ф.И.¹

¹Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
Украина, Киев ГСП, Д03680, ул. Академика Заболотного, 154,
e-mail: lyuromanyuk@rambler.ru

²Одесский национальный университет им. И.И Мечникова,
Украина, 65029, Одесса, ул. Дворянская, 2

ОБЩАЯ ТРАНСДУКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ И ПЛАЗМИДНЫХ МАРКЕРОВ ЭРВИНИОФАГОМ ZF40

Явление трансдукции - это перенос бактериальных генов из одной клетки в другую бактериофагами, приводящий к изменению наследственных признаков клетки.

Трансдукция рассматривается как один из методов генной инженерии, где фагам отведена роль универсального инструмента при горизонтальном переносе генов [1]. Как и плазмиды, вирусы бактерий способны преодолевать межвидовые генетические барьеры, широко распространяя различные гены, в том числе и гены, отвечающие за формирование патогенности у бактерий [2]. Трансдукция осуществляется как умеренными, так и вирулентными бактериофагами, способными переносить хромосомные гены, а также внехромосомные генетические элементы [3,4]. Главным этапом в образовании трансдуцирующих частиц бактериофагов является процесс упаковки ДНК. В основе механизма генерализованной трансдукции лежит циклическая пермутация фагового генома, которая позволяет упаковывать в прокапсид не только фаговую, но и плазмидную ДНК или любой участок бактериальной хромосомы [5].

Ранее было установлено, что для фага ZF40 *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Есс) характерны циклическая пермутация вирионной ДНК и механизм упаковки генома по типу "заполнения" головки [6]. Цель представленной работы состояла в изучении возможности фага ZF40 осуществлять перенос хромосомных генов и внехромосомных генетических элементов.

Трансдуцирующими фагами в работе были два *cleag*-мутанта фага ZF40- c_6 и 421. ZF40 c_6 – точечный мутант, был получен с помощью гидроксилamina [7]. Вирулентный мутант ZF40/421 имел более существенные и значимые изменения в упаковке ДНК [8]. Трансдуцирующие лизаты фагов ZF40 c_6 и ZF40/421 получали методом слитного лизиса на штамме-доноре Есс RC5297. Реципиентами для последующего заражения служили ауксотрофные мутанты *E. carotovora*. Биохимические мутанты, зависимые по урацилу Есс62А–d1/7, Есс62А–d1/8 получены после действия 2 – аминопуриннитрат [9]. Группа других мутантов, Есс62А–d1/50arg⁻, Есс62А–d1/P5met⁻, Есс62А–d1/17-8met⁻ Есс62А–d1/58met⁻ получены с помощью N–метил–N'–нитро–N–нитрозогуанидина - НГ [9]. Для определения переноса генов нехромосомного происхождения использовали плазмиду рКМ101 *Salmonella typhimurium* TA38 с геном устойчивости к ампициллину. Ранее эта плазида была перенесена помощью транскоњугации в клетки бактерии Есс RC5297, которая является индикатором для фага ZF40 [1]. Эксперименты по трансдукции осуществляли на твердой среде LB. Трансдуцирующие лизаты ZF40/421 и ZF40 c_6 по 5 мкл с титром $2,0 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, а также их разведения 10^{-1} , 10^{-2} и 10^{-3} наносили непосредственно на чашечные газоны индикаторных штаммов и инкубировали 18 часов при 28°C. В местах нанесения пятен фаголизатов вырезали агаровые блочки размером 3×3×3 мм с выжившими клетками индикаторного штамма и помещали их в 2 мл жидкой среды LB. Блочки инкубировали 18 часов при 28°C. Суспензию клеток центрифугировали при 10000 об/мин, 5 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 0,5 мл жидкой минимальной среды наносили на селективные чашки. Отбор и учет трансдуктантов проводили через 72 часа. Частоту трансдукции выражали отношением числа трансдуктантов к числу бляшкообразующих частиц в 1 мл (БОЕ/мл) [10].

В результате проведенных экспериментов нам удалось осуществить перенос хромосомных маркеров arg⁺, met⁺, ura⁺ двумя *cleag*-мутантами фага ZF40, а перенос плазмиды рКМ 101 только одним из *cleag*-мутантов - ZF40 c_6 (Таблица). Частота трансдукции плазмидного маркера обычно ниже, чем любого из хромосомных. Мы объясняем это тем, что плазида рКМ 101 является экзогенной по отношению к *E. carotovora* и поэтому, хотя и имеет соответствующий рас-сайт, упаковывается в фаговую головку менее эффективно, чем фаговая ДНК и ДНК бактерии-хозяина. Так передача Ar^r – маркера плазмиды рКМ101 фагом ZF40 c_6 происходит с частотой 10^{-8} , а перенос фагом ZF40/421 вообще не был зафиксирован. Существенные изменения в геноме ZF40/421, связанные с нарушением упаковки ДНК в прокапсид, возможно и объясняют этот факт. [8]. В отличие от этого, трансдукция хромосомных маркеров не только возможна, но и характеризуется высокими показателями частоты: от $1,4 \times 10^{-6}$

до $7,5 \times 10^{-5}$ для представителей двух популяционных наборов фага ZF40/421 (Таблица). Частоты трансдукции биохимических маркеров ауксотрофных мутантов характеризуются широким диапазоном значений: $7,0 \times 10^{-8}$ - $2,0 \times 10^{-4}$. Показатель низкой частоты для маркера $ura^{+}-1$ очевидно, связан с особенностью мутации в этом локусе. Это подтверждается достаточно высоким значением частоты трансдукции для другого локуса $ura^{+}-2$ - оперона. То, что эти локусы отличаются, демонстрируют показатели частоты обратных мутаций - $< 2,2 \times 10^{-9}$ и $7,5 \times 10^{-8}$ для $ura^{+}-1$ и $ura^{+}-2$ соответственно (Таблица).

Таблица

Частота трансдукции генетических маркеров *Erwinia carotovora* фагом ZF40

Трансдуцируемый маркер	Мутанты фага ZF40			Частота обратных мутаций
	c ₆	421-1*	421-2*	
$ura^{+}-1$	$7,0 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-6}$	—	$< 2,2 \times 10^{-9}$
$ura^{+}-2$	$1,3 \times 10^{-5}$	—	$1,1 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-8}$
arg^{+}	—	—	$7,5 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-7}$
$met^{+}-1$	$2,0 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-7}$
$met^{+}-2$	—	$5,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-6}$
$met^{+}-3$	—	$6,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-6}$	$< 2,0 \times 10^{-8}$
Ap^r	$7,5 \times 10^{-8}$	не обнаружено	не обнаружено	—

* - представители двух популяционных наборов фага ZF40/421

“ — “ не исследовали

Как было отмечено выше, специфические мутации в геноме фага, а также низкая множественность инфекции (0,01-0,1) позволили получить жизнеспособные трансдуктанты. При первичном отборе наблюдали выраженную гетерогенность колоний трансдуктантов. Однако, все варианты хорошо росли на селективных средах и были резистентны к трансдуцирующим фагам.

Способность *clearg*-мутантов фага ZF40 переносить гены: *arg*, *met*, *ura* бактерии-хозяина, а также внехромосомные маркеры плазмиды pKM101 позволило нам отнести эти фаги к общетрансдуцирующим. Подобная ситуация характерна для фагов Erch12, EC2 *E. chrysanthemi* [11,12], 59 и 49, фКР *E. carotovora* [10,13], где перенос *arg*, *met*, *ura* генов наблюдался с частотой $2,0 \times 10^{-8}$ – $9,0 \times 10^{-6}$. Использование твердой среды LB позволило увеличить частоту трансдукции от $7,0 \times 10^{-8}$ до $2,0 \times 10^{-4}$. Применение такого подхода важно для фагов подобных ZF40, которые характеризуются процессом реадсорбции фаговых частиц.

Таким образом, впервые показана способность эрвиниофага ZF40 осуществлять общую трансдукцию хромосомных и плазмидных генов. Это создает предпосылки для использования этого фага в качестве инструмента при исследовании молекулярно-генетической организации практически значимой бактерии *E. carotovora*.

Литература

1. Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Метод исследования горизонтального переноса плазмид у *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2002. – 64, №3. – С. 20 – 26.
2. Mann B.A., Slauch J.M. // Transduction of low-copy number plasmids by bacteriophage P22 // Genetics. – 1997. – 146. – P.447 – 456.

3. Casjens S.R., Gilcrease E.B., Winn-Stapley D.A. et al. The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18: complete genome sequence and DNA packaging strategy // J. Bacteriol. – 2005. – 187, №3. – P. 1091 – 1104.
4. Hertwig S., Popp A., Freytag B. et al. Generalized transduction of small *Yersinia enterocolitica* plasmids // Appl. and Environ. Microbiol. – 1999. – 65, №9. – P.3862 – 3866.
5. Jobocka M.B., Rose D.J., Plunkett G. et al. Genome of bacteriophage P1 // J. Bacteriol. – 2004. – 186, №21. – P.7032 – 7068.
6. Паницина Ф.И., Товкач Ф.И. Внутригеномная гетерогенность умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2006. – 68, №6. – С. 42 – 47.
7. Кушкина А.И., Товкач Ф.И. Индикаторная система для изучения лизогенного развития умеренного бактериофага ZF40 // Мікробіол. журн. – 2005. – 67, №3. – С.50 – 60.
8. Ivanytsya T.V., Kushkina A.I., Tovkach F.I. Mechanism of formation of defective phage particles of *Erwinia carotovora* // Abstr. International conference "Phage Biology, Ecology and Therapy Meeting., Tbilisi, June 12 – 15, 2008. – Tbilisi, Georgia. – P42.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – Москва: Мир, 1976. – 436 с.
10. Муквич Н.С., Романюк Л.В., Кушко Я.Г. Генетический перенос хромосомальных маркеров *Erwinia horticola* 450 умеренными фагами 49 и 59 // Мікробіол. журн. – 1987 – 49, №4. – С.31 – 35.
11. Chatterjee A.K., Brown M.A. Generalized transduction in the enterobacterial phytopathogen *Erwinia chrysanthemi* // J. Bacteriol. – 1980. – 143, №3. – P.261 – 268.
12. Resibois A., Colet M., Faelen et al. OEC2, new generalized transducing phage of *Erwinia chrysanthemi* // Virology. – 1984. – 137, №1. – P.102 – 112.
13. Toth I., Perombelon M., Salmond G. Bacteriophage ОКР mediated generalized transduction in *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* // J. Gen. Microbiol. – 1993. – 139, №4. – P.2705 – 2709.

Резюме

Впервые показано, что умеренный эрвиниофаг ZF40 способен осуществлять общую трансдукцию хромосомных и плазмидных генов бактерии *Erwinia carotovora*. На твердой среде LB удалось получить повышение эффективности трансдукции. Такой подход важен для фагов подобных ZF40, у которых наблюдается процесс реадсорбции фаговых частиц. Перенос бактериальных генов по типу общей трансдукции сопряжен с циклической пермутацией фаговой ДНК. Полученные данные создают предпосылки для молекулярно-генетического изучения процесса патогенеза у эрвиний.

Вперше показано, що помірний ервініофаг ZF40 здатен здійснювати загальну трансдукцію хромосомних і плазмідних генів бактерії *Erwinia carotovora*. На твердому середовищі LB вдалося отримати підвищення ефективності трансдукції. Такий підхід важливий для фагів подібних ZF40, у яких спостерігається процес реадсорбції фагових часток. Перенос бактеріальних генів по типу загальної трансдукції сполучений з циклічною пермутацією фагової ДНК. Отримані створюють умови для молекулярно-генетичного вивчення процесу патогенеза у ервіній.

For the first time it was shown that the temperate erwiniaphage ZF40 was capable to mediate the generalized transduction of chromosomal and plasmid genes of bacterium *Erwinia carotovora*. The increasing of transduction efficiency was firstly obtained on solid medium LB. This method has the great importance for the phage ZF40 because such phages

were characterized by the readsorption of phage particles. The transmission of bacterial genes due to the generalized transduction links with the permutation of phage DNA. The obtained data are the importance prerequisite for molecular and genetical studying of pathogenesis processes in erwinias.

**САМАТАДЗЕ Т.Е.,¹ ЗЕЛЕНИНА Д.А.,³ ШОСТАК Н.Г.,¹ ВОЛКОВ А.В.,³
ПОПОВ К.В.,¹ РАЧИНСКАЯ О.А.,¹ БОРИСОВ А.Ю.,² ТИХОНОВИЧ И.А.,²
ЗЕЛЕНИН А.В.,¹ МУРАВЕНКО О.В.¹**

*1-Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН Россия, 119991,
Москва, ул. Вавилова, 32, , e-mail: tsamatadze@gmail.com*

*2 – ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук, Санкт-
Петербург, Пушкин-8 196608; e-mail: Alexey_Borisov@arriam.spb.ru*

*3 - Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и
океанографии, Москва 107140; e-mail: dzel67@mail.ru*

ХРОМОСОМНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНОМА ГОРОХА ПОСЕВНОГО (*PISUM SATIVUM* L.).

Бобовые (FABACEAE) представлены 18000 видами растений включающие в себя как мелкие однолетние травянистые растения, так и крупные тропические деревья. Эти растения обладают уникальной способностью создавать симбиотические сообщества с некоторыми родами бактерий и микориз, образуя важнейшие азотфиксирующие системы в биосфере.

Среди бобовых подсемейство PAPILIONOIDEA содержит большое число сельскохозяйственных культур, одной из которой является горох посевной (*Pisum sativum* L.). Небольшой размер генома (1С=4,3 млрд.п.н.), семь пар хромосом (2n=14) среднего размера (4-6 мкм) делают его прекрасным объектом для цитогенетических исследований. Кроме того, горох является лучшим модельным объектом для изучения тройного симбиоза (бобовое растение+грибы арбускулярной микоризы+клубеньковые бактерии).

Несмотря на то, что в России и за рубежом создано большое количество сортов различного направления селекции (зерновые, кормовые, овощные), однако, как правило, все коммерческие сорта гороха обычно имеют недостаточно высокий симбиотический потенциал. Кроме того, сравнительного анализа геномов сортов и линий гороха различного направления селекции с помощью хромосомных и молекулярных маркеров до настоящего времени не проводилось, что и явилось целью данного исследования.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили семена четырех сортов зернового гороха: Frisson, Sparkle, Rondo, Капитал, двух овощных сортов: Finale и Виола, одного кормового сорта Роза Краун, двух генетических линий: SGE и Sprint-2, а также двух транслокационных линий: L-108 (T_{2-4s}) и M-10 (T_{2-7s}).

С-дифференциальное окрашивание, Ag-ЯОР-окрашивание, двуцветный FISH с зондами рТа 71, содержащими 45S рДНК, рТа 794, содержащими 5S рДНК, хромосомный и RAPD-PCR анализ проводили по описанным ранее методикам (Саматадзе и др., 2002; 2005; Зеленина и др., 2006; Muravenko et al., 2009).

Результаты и обсуждение

Проведено изучение рисунков С-окраски хромосом в изучаемых сортах и линиях гороха. По морфологии и рисунку С-бэндинга были идентифицированы все

хромосомы. Сравнительное изучение рисунков С-окрашенных хромосом гороха в сортах и генетических линиях выявило полиморфизм гетерохроматических блоков, расположенных около ядрышкоорганизующих районов хромосом 4 и 7. Обнаружено, что размеры С-блоков в теломерных районах генетических линий и сортов на 1 и 2 хромосомах были одинаковыми, а на 3-7 хромосомах различались по размерам. У всех сортов зернового гороха крупный С-блок на хромосоме 4 локализован на спутнике, а среднего размера С-блок на хромосоме 7 – в районе, прилегающем к спутничной нити. В кариотипах генетических линий и у двух сортов овощного гороха Finale и Виола размеры этих С-блоков были практически одинаковы. В кариотипах изученных линий Sprint-2 и SGE более крупные теломерные С-бэнды выявлены на 3-7 хромосомах.

В связи с тем, что 1 и 2 хромосома кариотипа гороха по морфологии сходны для точной идентификации этих хромосом были изучены С-окрашенные хромосомы двух транслокационных линий L-108 (T_{2-4s}) и M-10 (T_{2-7s}). В результате С-окраски легко идентифицировался рисунок хромосомы 1, которая не участвовала в перестройке, что позволило представить полный кариотип С-окрашенных хромосом изучаемых сортов и линий гороха.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) пробой рТа71 позволила выявить в кариотипах всех сортов и двух генетических линий 45S рДНК в районах вторичных перетяжек хромосом 4 и 7. В кариотипах сортов гибридизационные сигналы с пробой рТа71 были интенсивнее на хромосоме 7, чем на хромосоме 4, а у линий они были одинаковыми. Минорных сайтов 45S рДНК не обнаружено. FISH с пробой рТа794 дала возможность локализовать 5S рДНК на 1, 3 и 5 хромосомах в кариотипах всех исследованных сортов и линий. Дополнительных сайтов локализации 5S рДНК не выявлено. В кариотипах изученных сортов интенсивность сигналов гибридизации пробы рТа794 была практически одинаковой. У генетических линий на хромосоме 5 интенсивность сигнала гибридизации рТа794 была значительно выше.

Исследование локализации 45S рДНК на спутничных хромосомах показало, что сигналы гибридизации на хромосоме 4 располагаются по длине спутничной нити и в спутнике, а на хромосоме 7 – в районе хромосомы, прилегающем к вторичной перетяжке и по длине спутничной нити. Таким образом, большая часть 45S рДНК входит в состав С-блоков, расположенных у вторичных перетяжек 4 и 7 хромосом, что может быть одной из причин полиморфности блоков приспутничного гетерохроматина. В изученных сортах зернового и овощного гороха сигнал гибридизации 45S рДНК был интенсивнее на хромосоме 7. У исследованных генетических линий интенсивности сигналов гибридизации рибосомных генов на обеих спутничных хромосомах были приблизительно одинаковы.

Изучение транскрипционной активности в кариотипах всех изученных форм с использованием Ag-ЯОР-окрашивания выявило наличие Ag-положительных районов в области вторичных перетяжек на спутничных хромосомах 4 и 7. На хромосоме 7 всегда наблюдался крупный блок серебра, как у линий, так и у сортов. В ядрах изученных образцов гороха при этом наблюдалось от одного до четырех Ag-окрашенных ядрышек.

По суммарной площади окрашенных серебром ядрышек изученные сорта гороха достоверно не различались, за исключением сорта Rondo. Не обнаружено корреляции между направлением селекции исследуемой формы и особенностями ее генома по хромосомно-молекулярным маркерам, однако существование такой корреляции исключить нельзя, поскольку исследуемая выборка очень мала, а для такого заключения требуется изучение геномов десятков сортов с известной историей происхождения.

Геномный полиморфизм четырех коммерческих сортов гороха с высоким симбиотическим потенциалом (трех сортов зернового гороха: Frisson, Sparkle, Rondo, одного гороха овощного сорта Finale), а также двух генетических линий: SGE и Sprint-2 был исследован с помощью RAPD-PCR с 4 информативными праймерами OPA06, OPA09 и OPA10 и OPA15 и последующего анализа RAPD-спектров в полиакриламидном геле. Метод позволил провести геномную идентификацию сортов и линий гороха. В то же время внутрисортовой и внутрелинейный полиморфизм в данном исследовании оказался крайне низким: при сравнении образцов в пределах кластеров полиморфные локусы были выявлены только в линии SGE и сорте Finale. Обнаружены, по крайней мере два сортоспецифичный фрагмента, по одному для сорта Rondo и линии Sprint 2, которые можно рассматривать как потенциальные маркеры для идентификации данных сортов.

Таким образом, геномы изученных сортов и линий различаются по хромосомному и геномному полиморфизму и имеют свои сортоспецифические особенности, что может явиться основой для дальнейшей детальной кариотипической и генотипической характеристики и создания паспорта генотипа такого важного модельного объекта цитогенетических исследований к которым принадлежит горох посевной.

Выводы

1. Выявлены различия рисунков С-окраски на спутничных хромосом в кариотипах сортов разного направления селекции.
2. Уточнена локализация сайтов гибридизации 5S и 45S рДНК, установлен межсортовой полиморфизм по размерам сайтов рибосомных генов на 4 и 7 хромосоме.
3. Статистический анализ суммарной площади интерфазных ядрышек, окрашенных серебром, не позволил выявить различий между изученными генотипами гороха.
4. С помощью RAPD-PCR анализа выявлен значительный межсортовой и низкий внутрисортовой геномный полиморфизм.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 07-04-13566-офи_ц и Программой «Динамика генофондов растений, животных и человека».

Литература

1. Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Зеленин А.В., Гостимский С.А. Идентификация хромосом генома гороха (*Pisum sativum* L.) по рисунку С-окраски. // Доклады Академии Наук. -2002.- т. 387. N 5.- С.714-717.
2. Саматадзе Т.Е., Муравенко О.В., Большева Н.Л., Амосова А.В., Гостимский С.А., Зеленин А.В. Изучение хромосом сортов и транслокационных линий гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием FISH, Ag-ЯОР и DAPI-дифференциального окрашивания. // Генетика.-2005.- N 12.- С. 1665 – 1673.
3. Зеленина Д.А., Хрусталева А.М., Волков А.А. Сравнительное исследование популяционной структуры и определение популяционной принадлежности нерки (*Oncorhynchus nerka*) Западной Камчатки с помощью RAPD-PCR и анализа полиморфизма микросателлитных локусов. // Генетика, 2006, т. 42, N 5, с. 693 – 704.
4. O.V. Muravenko, O. Yu. Yurkevich, N.L. Bolsheva, T.E. Samatadze, I. V. Nosova, D.A. Zelenina, A. A. Volkov, K. V. Popov, A.V. Zelenin. Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis. *Genetika*, 2009, v.135, N 2, p. 245-255.

Резюме

С помощью С-/Ag-ЯОР-дифференциального окрашивания, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и RAPD-PCR анализа проведено изучение кариотипов 4 сортов и 2 линий гороха посевного. Показана перспективность использования

данных методов цитогенетического анализа для разработки методических подходов и принципов составления хромосомных паспортов.

C- and Ag-NOR-staining techniques, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and RAPD-PCR analysis were used to study karyotypes of four varieties and two lines of pea. It was shown that these comparative cytogenetic analysis methods were rather perspective for the development of methodical approaches and principles of making chromosome passports.

ТИТОК М.А., ЧЕРНОВА А.И., ПУНТУС И.Ф., ВАСИЛЕНКО С.Л., ХАМЗА Ф.Д.
Белорусский государственный университет,
Беларусь, 220030, Минск, пр-т Независимости, 4, e-mail: titok@bsu.by

ОРГАНИЗАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Ароматические углеводороды попадающие в природную среду обитания в результате аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, при сгорании различных видов топлива, выбросах коксо-, газо- и нефтехимических производств, а также содержащиеся в выхлопных газах автомобилей, представляют серьезную опасность для всех звеньев естественных биоценозов, приводя к их изменению или полной трансформации. По химической природе их можно разделить на моноароматические (бензол, толуол, ксилол и др.) и полиароматические (нафталин, антрацен, фенантрен, бифенилы, пирен, бенз(а)пирен, дибенз(а)пирен, перилен и др.). Следует отметить, что промежуточным продуктом окисления некоторых моно- и полициклических ароматических углеводородов (например, бензола, толуола, ксилола, нафталина, фенантрена) является катехол и его производные, вследствие чего полная деградация этих соединений может происходить с участием одних и тех же ферментных комплексов. Основная роль в утилизации ароматических углеводородов в природной среде обитания принадлежит микроорганизмам. Большим метаболическим потенциалом в отношении этих соединений обладают бактерии рода *Pseudomonas*, способные к их полной или частичной трансформации. Кроме того, представители этой таксономической группы характеризуются широким спектром метаболических реакций и способны утилизировать целый ряд органических субстратов. Изучение организации природных штаммов-деструкторов является основой, позволяющей целенаправленно создавать эффективные биологические средства очистки окружающей среды от органических соединений.

Целью настоящей работы явилось изучение физиологических свойств и структурно-функциональной организации систем биodeградации у природных нафталинутилизирующих бактерий.

Материалы и методы

В работе использовали 102 штамма природных нафталинутилизирующих бактерий *Pseudomonas*, а также типовые штаммы *Pseudomonas* (Всесоюзная Коллекция Микроорганизмов и Вирусов, Москва, Россия) и типовые плазмиды группы IncP-9 и IncP-7 (коллекция кафедры генетики БГУ).

Среды. Бактерии выращивали в минимальной среде М9 [Ошибка! Источник ссылки не найден.]. В качестве источника углерода и энергии использовали: глюкозу в концентрации 0,2 %, бромнафталин – 1 %. Нафталин, м-ксилол, о-ксилол, п-ксилол, керосин, дизельное топливо, бензиловый спирт, гексадекан наносили на крышку чашки Петри. Толуол и бензол вносили путем помещения на крышку чашки Петри запаянного с одного конца пластикового наконечника, содержащего 200 мкл одного из этих

соединений. Фенантрен, антрацен и нефть вносили в 3 мл минимальной жидкой среды по 5 мг.

Выделение тотальной ДНК осуществляли с использованием саркозилового метода [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора реактивов TaKaRa Ex Taq™ (Япония).

Для амплификации генов большой субъединицы нафталин-1,2-диоксигеназы (*nahAc*) и салицилат-1-гидроксилазы (*nahG*), а также *rep*-генов плазмид IncP-7 и IncP-9 использовали олигонуклеотидные праймеры при режимах амплификации, предложенных в работах [Ошибка! Источник ссылки не найден.3-5]Ошибка! Источник ссылки не найден..

Рестрикцию продуктов амплификации осуществляли с помощью ферментов *MspI*, *RsaI*, *HaeIII* в условиях, рекомендованных фирмой изготовителем (Fermentas, Литва). В качестве реперной ДНК для определения размеров фрагментов использовали синтетические DNA Ladder Mix и 100-bp DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Электрофоретический анализ проводили согласно [Ошибка! Источник ссылки не найден.].

Модельные почвенные системы готовили согласно описанию, приведенному в работе [6].

Определение активности ферментов проводили в бесклеточных экстрактах на спектрофотометре UV-160A (“Shimadzu”, Япония). Активность нафталиндиоксигеназы, салицилатгидролазы, катехол-2,3-диоксигеназы и катехол-1,2-диоксигеназы определяли согласно методами, описанными в работе [6]. Удельную активность ферментов выражали в наномолях потребленного кофактора или образующегося продукта в минуту на 1 мг общего клеточного белка. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически [6].

Результаты и обсуждение

Для отбора наиболее перспективных штаммов-деструкторов использовали два критерия. Первый касался показателей скорости роста в среде, содержащей в качестве единственного источника углерода и энергии нафталин. Второй – способности утилизировать спектр органических субстратов. В частности, исследовались полициклические (антрацен и фенантрен, пирен), моноциклические (бензол, толуол, ксилол и их производные), ациклические углеводороды (октан), являющиеся компонентами сырой нефти, а также продукты нефтепереработки (гексадекан, дизельное топливо, керосин) и некоторые другие ксенобиотики (бромнафталин, бензиловый спирт, камфора). Предполагалось, что показатель скорости роста может быть напрямую или косвенно связан с физиологическими особенностями организации изолированных микроорганизмов. В частности, он может быть обусловлен способностью генов биодegradации эффективно экспрессироваться в определенном генетическом окружении, а также зависеть от времени клеточного цикла, в ходе которого происходит удвоение и распределение генетического материала между дочерними клетками, в том числе и внехромосомного происхождения. Второй параметр характеризует метаболический потенциал изолированных бактерий.

Показателем скорости роста в среде с нафталином служило время, необходимое бактериальной популяции для достижения стационарной фазы роста (исходная концентрация бактерий составляла 10^3 кл/мл). На основании полученных данных природные нафталинутилизирующие бактерии были условно разделены на три группы: бактерии первой группы достигали стационарной фазы роста через 48 часов культивирования (57 штаммов), второй – через 72 часа (30 штаммов) и третьей – через 96 часов (24 штамма)

На следующем этапе работы с использованием метода жидкостной хроматографии была изучена динамика изменения концентрации нафталина в

модельной почвенной системе в процессе культивирования в ней бактерий группы I и III. Для этого использовалась стерильная почва с нафталином в концентрации 2 г/кг, в которую вносили нафталинутилизирующие бактерии в концентрации $10^3 - 10^4$ кл/мл. В результате было установлено, что присутствие в почве нафталинутилизирующих бактерий штамма NL19 (группа I) и NL32 (группа III) обеспечивало достоверное снижение концентрации нафталина, хотя его уменьшение наблюдалось и в отсутствие микроорганизмов (за счет испарения). При этом, через 7 дней количество нафталина в почве в присутствии бактерий штамма NL19 (группа I) снизилось до уровня отрицательного контроля, в то время как бактерии штамма NL32 (группа III) не обеспечивали полную деградацию нафталина через 21 день

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что физиологические параметры роста природных бактерий в среде с нафталином коррелируют с их способностью деградировать нафталин в модельной почвенной системе и могут быть использованы в качестве критерия для первичной характеристики штаммов-деструкторов

В результате анализа природных нафталинутилизирующих бактерий на способность утилизировать органические субстраты было выявлено 9 штаммов, способных использовать в качестве единственного источника углерода и энергии от восьми до двенадцати соединений, 64 штамма – от трех до семи соединений, а 7 штаммов – не обладали дополнительными биодеградационными возможностями. Следует отметить, что ряд штаммов, обладающих широким спектром утилизации органических соединений, характеризовались относительно высокой эффективностью утилизации нафталина (в частности, штаммы AL1, AL21, NL21, NL26 и NL61 отнесены к группе I).

Для дальнейшей характеристики были использованы штаммы, отнесенные на основании скорости роста в среде с нафталином к группе I.

С использованием техники полимеразной цепной реакции с последующим рестрикционным анализом продуктов амплификации были идентифицированы внехромосомные генетические элементы. Установлено, что в клетках природных нафталинутилизирующих бактерий присутствуют плазмиды группы IncP-9, представленные δ - (19 штаммов), ζ - (4 штамма) и ι -подгруппой (23 штамма), а также внехромосомные генетические элементы группы IncP-7 (4 штамма). Для 7 штаммов плазмиды не были выявлены.

Проведен рестрикционный анализ продуктов амплификации генов *nahAc* и *nahG*, обеспечивающих синтез ключевых ферментов катаболизма нафталина. Установлено, что природные репликоны содержат уникальные сочетания генов *nahAc* и *nahG*, что может свидетельствовать о сопряженном характере изменения нуклеотидных последовательностей данных генетических детерминант.

На следующем этапе была изучена активность ключевых ферментов катаболизма нафталина, а именно нафталиндиоксигеназы (НО), салицилатидроксилазы (СГ), катехол-2,3-диоксигеназы (K2,3O) и катехол-1,2-диоксигеназы (K1,2O).

Выбор штаммов для анализа активностей ключевых ферментов метаболизма нафталина был продиктован результатами предыдущих исследований. Представлялось важным установить наличие связи между активностью ферментов и скоростью роста на среде с нафталином (сравнить штаммы I, II и III группы), выяснить зависит ли активность ферментов от типов генов *nahAc* и *nahG* и, наконец, охарактеризовать детерминанты плазмидного (НО, СГ, K2,3O) и хромосомного (K1,2O) происхождения.

Анализ активностей ключевых ферментов метаболизма нафталина (при использовании салицилата в качестве индуктора) позволил сделать следующие выводы.

Активность ключевых ферментов метаболизма нафталина не коррелирует со скоростью роста бактерий в среде с нафталином. Например, активность нафталиндиоксигеназы (НО) у штаммов I группы варьировала от 13,8 до 170,0

нмоль/(мин мг белка), у штаммов II и III группы от 22,7 до 172,9 нмоль/(мин мг белка). Такая же картина наблюдалась для салицилатгидроксилазы (СГ), активность которой у штаммов I группы варьировала от 2,5 до 79,3 нмоль/(мин мг белка), а у штаммов II и III группы определялась в интервале от 3,2 до 103,3 нмоль/(мин мг белка). Полученные данные позволяют предположить, что физиологические параметры роста бактерий в среде с нафталином зависят в большей степени от особенностей клеточного цикла (скорости деления клеток) и не связаны с эффективностью экспрессии генов, детерминирующих метаболизм нафталина. Тем не менее, использование в качестве штаммов-деструкторов бактерий I группы является предпочтительным, поскольку по сравнению с бактериями группы II и III они могут обладать селективным преимуществом при попадании в среду, содержащую ПАУ. Быстрое увеличение численности бактериальной популяции, обусловленное особенностями клеточного цикла, может обеспечить бактериям I группы большую конкурентоспособность в борьбе за выживание в сложившихся микробиоценозах.

Активность ключевых ферментов метаболизма не связана с типами генов *nahAc* и *nahG*. Бактерии, имеющие одинаковые комбинации данных детерминант обладают разной активностью (например для типа C18-V1/ pDTG1 активность HO составляла от 28,5 до 172,9 нмоль/(мин мг белка), а СГ – от 4,2 до 103,3 нмоль/(мин мг белка)).

Оптимальная комбинация хозяин-плазмида предполагает выбор плазмиды, содержащей детерминанты, обеспечивающие синтез ферментов (HO, СГ, K2,3O) с высокой ферментативной активностью и бактерий-хозяев, обладающих высокой скоростью роста на среде с нафталином (группа I), способных утилизировать широкий спектр органических субстратов и характеризующихся высокой активностью K1,2O. Анализируя полученные результаты можно полагать, что для конструирования эффективных штаммов-деструкторов предпочтительным является использование плазмид pNL4, pNL61 и pAL1. В качестве бактерий хозяев можно использовать штаммы NL21, NL26, NL61, AL1, AL21, характеризующиеся высокой скоростью роста в среде с нафталином (группа I), относительно высоким уровнем ферментативных активностей ключевых ферментов метаболизма нафталина и способные утилизировать достаточно широкий спектр органических субстратов

Работа выполнена при финансовой поддержке, гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований Б08Р-102 и задания 1.08 ГППИ «Новые биотехнологии».

Литература

1. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир. 1984.- 480с.
2. *te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D.* Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1986.- vol. 8, № 8.- P.2541-2545.
3. *Ferrero M., Llobet-Brossa E., Lalucat L. et al.* Coexistence of two distinct copies of naphthalene degradation genes in *Pseudomonas* strains isolated from the western Mediterranean region // Appl. Environm. Microbiol.- 2002.- vol. 68, № 2.- P.957–962.
4. *Измалкова Т.Ю., Сазонова О.И., Соколов С.Л.* и др. Разнообразие генетических систем биodeградации нафталина у штаммов *Pseudomonas fluorescens* // Микробиология.- 2005.- vol. 74, № 1.- P.60–68.
5. *Василенко С.Л., Титок М.А.* Особенности наследования плазмид биodeградации в клетках гомо- и гетерологичных хозяев // Микробиология.- 2008.- Т. 77, № 1.- С.21–28.
6. *Волкова О.В., Анохина Т.О., Пунтус И.Ф.* и др. Влияние плазмид биodeградации нафталина на физиологические характеристики ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* // Прикладная биохим. и микробиол.- 2005.- Т. 41, № 5.- С.525-529.

Резюме

На основании результатов проведенного исследования предложены критерии для отбора эффективных штаммов деструкторов ПАУ, учитывающие скорость роста

бактерий в среде с нафталином, способность утилизировать органические субстраты и обладающие высокими активностями ключевых ферментов метаболизма нафталина.

On the basis of results of the conducted research, criteria for selection of effective strains that degrade PAH are offered, considering the growth rate with naphthalene as a sole source of carbon and energy, ability to utilise organic substrates and high activity of the key ferments of naphthalene metabolism.

На підставі результатів проведеного дослідження запропоновані критерії для відбору ефективних штамів деструкцій ПАВ, що враховують швидкість росту бактерій в середовищі з нафталином, здатність утилізувати органічні субстрати і що володіють високими активностями ключових ферментів метаболізму нафталіну.

ЦИГАНКОВА В.А.¹, ІУТИНСЬКА Г.О.².

¹*Інститут біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України
02094, Київ, вул. Мурманська, 1*

²*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Д 03680 ГСП, Київ, вул. Академіка Заболотного, 154*

ДОСЛІДЖЕННЯ СТУПЕНЮ ГОМОЛОГІЇ мРНК ПРИ НОРМАЛЬНОМУ І СТИМУЛЬОВАНОМУ РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТУ РОСЛИН

Недостатнє фінансування сільськогосподарського виробництва потребує пошуку і розробки нових відносно недорогих елементів екологічно безпечних технологій ведення сільського господарства. Багаторічний досвід показує, що найперспективнішими з них є використання в сільському господарстві регуляторів росту рослин, за допомогою яких можливо не тільки скоротити витрати на виробництво сільськогосподарської продукції, але й збільшити вихід з одиниці площі кількості і підвищення якості сільськогосподарської продукції (тобто підняти врожайність культур), а також підсилити імунітет (захисні властивості) рослин при скороченні використання хімічних засобів захисту, підвищити посухостійкість і холодостійкість культурних рослин і забезпечити створення кращих умов для симбіозу рослин з мікрофлорою ґрунту.

Реальними для виробників стали регулятори росту рослин, створені в Інституті біоорганічної хімії і нафтохімії НАН України [1]. При перевірці дії цих регуляторів першочергова увага надається з'ясуванню механізму їх дії на функції генетичного апарату клітин (експресію генів), з метою пошуку сполук, не шкідливих для рослинного організму і навколишнього середовища.

Напрямок цієї роботи послужили: вивчення рівня експресії генів, а також ступеню гомології мРНК у рослин, що оброблялися та необроблялися регуляторами росту на різних етапах онтогенезу.

Матеріали та методи

В чашках Петрі або пластмасових коробочках, місткістю в 200 мл, заповнених перлитом, пророщували насіння і вирощували рослини квасолі і пшениці від початку проростання і до кінця їх вегетації, а на пшениці вивчали показники формування кореневої системи. Живильним середовищем служило середовище Мурасіге (MS) (контроль). В дослідні проби додавали регулятори росту (окремо Емістим і Аверком, або ж їх комбінацію).

Аверком – комплекс фізіологічно активних речовин (ауксинів, гіберелінів та цитокінінів, а також амінокислот, ліпідів, в т.ч. жирних кислот), що продукується авермектинсинтезуючим штамом *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 [2]. Продукент Аверкому був селекціонований у відділі загальної та ґрунтової мікробіології ІМВ НАН України. Аверком позитивно впливає на мікробні

угруповання ґрунту. Комплексні мікробні препарати були створені на основі високоефективних штамів азотфіксуючих мікроорганізмів-мікросимбіонтів сої (*Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018 і *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В- 6035) та фосфатмобілізуючого штаму *Bacillus megaterium* УКМ В-5724, селекціонованих співробітниками відділу загальної та ґрунтової мікробіології ІМВ НАНУ [3].

Досліди проводили при температурі 25⁰С і 18-годинному світловому фотоперіоді в світловому блоці. В дослідях використовували зародкову вісь квасолі, морфогенетичні, фізіологічні і біохімічні характеристики якої раніше детально були вивчені [4], а також дорослі рослини сої на стадії цвітіння.

Виділення сумарного препарату РНК. Тканини зародкових осей квасолі руйнували в буферному розчині 1 (0,05М трис-НСl, рН 7,6; 0,01М MgCl₂; 0,06 М КСl; 1%-ний ДДС-На и 4 М гуанідінтіоціанат). Отриманий лізат двократно обробляли гарячим водонасиченим фенолом з хлороформом; РНК із водної фази осаджували етанолом, обробляли протеїназою К, повторно депротейнізували сумішшю фенолу з хлороформом и знову осаджували етанолом. Присутні в препаратах РНК домішки полісахаридів екстрагувалися за допомогою метоксиетанола, після чого РНК осаджували цетавлоном, а від цетавлону РНК відмивали багатократним перерозчиненням в 0,01 М розчині оцтовокислого калію і переосадженням етанолом з надміром оцтовокислого калію [5].

Розділення полі(А)⁺мРНК і полі(А)⁻мРНК проводили шляхом хроматографії сумарних препаратів РНК на оліго (dT)-целюлозних колонках [5]. кДНК було синтезовано на полі(А)⁺мРНК матриці [5] вікористовуючи зворотну транскриптазу (ревертазу) та [α-³²P]-мічений дезоксі-ЦТФ. Отримані [α-³²P]-кДНК із контрольних рослин були фіксовані на нітроцелюлозному фільтрі та гібридизували (методом ДОТ-блотингу) з кДНК дослідних рослин [5]. Радиоактивність проб було визначено згідно з роботою [4].

Результати та обговорення

В серії проведених нами дослідів з Івіном, Біоланом, Радостимом були встановлені наступні факти: вже на ранньому етапі розвитку (при виході насіння із стану спокою), коли включаються процеси біосинтезу РНК і білків, дія регуляторів росту опосередковується шляхом стимуляції генної експресії як мРНК, так і рРНК, що приводить і до збільшення білкового синтезу, внаслідок чого прискорюється проростання насіння і формування органів рослини (Таблиця 1).

Таблиця 1

Включення ³Н-уридину в мРНК і рРНК цитоплазми клітин зародкової осі квасолі при нормальному і стимульованому Радостимом рості і розвитку (імп/хв/мгРНК)

Час, година.	Контроль		Дослід (Радостим)	
	мРНК	рРНК	мРНК	рРНК
6	10 ± 0,5	25 ± 2,4	23,3 ± 2,2	26,8 ± 6,4
12	12 ± 1,2	28 ± 3,8	16,7 ± 6,3	25,4 ± 7,2
18	1156 ± 7,4	870 ± 14,8	1430 ± 8,7	1380 ± 6,4
24	3480 ± 24,3	2342 ± 17,3	6240 ± 34,4	3150 ± 16,8
30	5800 ± 26,4	3600 ± 22,6	10230 ± 17,5	4085 ± 22,2
36	24340 ± 26,9	5430 ± 13,4	52170 ± 28,3	10246 ± 18,1

В окремих дослідях ми показали, що підвищення синтезу РНК пов'язане саме зі стимуляцією транскрипції генів, а не за рахунок збільшення копій (ампліфікації) генів [6], тобто регулятори росту сприяють максимальному розкриттю генетичного потенціалу клітин рослин. Це відбувається, на нашу думку, шляхом посилення рівня і швидкості транскрипції за рахунок прискорення формування в промоторах рослин

ініціаторних транскрипційних комплексів з елементів регуляторних ділянок генів, РНК-полімерази і трансфакторів білкової природи.

Особливості дії регуляторів на експресію генів також вивчали по ступеню гомології мРНК в клітинах контрольних та дослідних рослин сої на стадії цвітіння, одержаних із насіння обробленого мікробними та грибовими препаратами. У таблиці 2 представлені результати цих досліджень.

Одержані результати свідчать: при всіх екзогенних регуляторів росту на вказаній стадії розвитку рослин сої (стадії цвітіння) популяції мРНК у оброблених регуляторами рослин відрізняються від популяції мРНК контрольних рослин. Найбільші розбіжності відносно контролю спостерігаються при використанні Біосилу та Радостиму (відповідно 76 % та 78 %). Менша різниця - при використанні УКМ В – 6035 та особливо УКМ В – 6018 (90 % та 93 %). Використання комплексу препаратів призводить до зменшення розбіжності між контрольними та дослідними рослинами по популяціям мРНК.

Таблиця 2

Дослідження гомології популяцій мРНК у рослин сої оброблених комплексними мікробними препаратами у 3-х денних проростків.

№ п/п	Варіанти дослідів	% по відношенню до контролю
1	Контроль	100
2	Bradyrhizobium japonicum УКМ В – 6035	90
3	Bradyrhizobium japonicum УКМ В – 6018	93
4	Біосил	76
5	Радостим	78
6	Bradyrhizobium japonicum УКМ В – 6018 + ½ Біосилу	80
7	Bradyrhizobium japonicum УКМ В – 6018 + ½ Радостиму	77
8	Bradyrhizobium japonicum УКМ В – 6018 + Bacillus megaterium УКМ В – 5724	88
9	Bradyrhizobium japonicum УКМ В – 6035 (сенсibiliзований)	94
10	Bradyrhizobium japonicum УКМ В – 6035 (гельна форма)	92

Дійсно дані літератури свідчать про те, що різні регулятори росту опосередковують свою дію в клітинах через створення (синтез) специфічних по відношенню до своєї структури балансів фітогормонів [7], які відповідно активують різні каскади генів, що прискорюють аналогічні етапи онтогенезу рослин (через прямі, чи резервні шляхи) для досягнення ідентичного кінцевого результату. Наприклад, синтез ауксину ІОК може здійснюватись з триптофану через індоліл-3-пірвіноградну, індоліл-3-масляну кислоту, триптамін та індол-3-ацетальдоксим або триптофан—незалежним шляхом з індолу за участю попередника індол-3-ацетонітрилу та під контролем неоднотипових груп генів [8]. Одержані нами результати по складу популяцій мРНК підтверджують також цей висновок. На користь висновку свідчать також дані про зміну популяцій мРНК на окремих етапах ембріогенезу та постембріогенезу рослин бавовнику [9].

Висновки

Отримані дані свідчать, що кінцевий (інтегральний) біологічний ефект (підсилення онтогенезу рослин) за допомогою різних регуляторів росту або їх композицій досягається шляхом активації неоднотипових груп генів, через продукти яких реалізується генетична програма різними метаболічними шляхами (як основними, так і обхідними паралельними шляхами).

Література

1. Кухарь В.П., Карабанов Ю.В., Павленко А.Д., Петренко В.С., Вершова В.Л., Шукова П.С., Бакутина Н.А., Борисенко В.П. Новый регулятор роста – Ивин // Физиологически активные соединения. - 1986, №18. - С.3-14.
2. Козирицька В.С., Валагурова О.В., Петрук Т.В., Іутинська Г.О., Білявська Л.О. Биологические свойства авермектинового комплекса *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас-2179 // Agrarian Science . – 2007. - №2. – Р. 21 – 29.
3. Леонова Н.О., Титова Л.В., Танцюренко О.В., Антипчук А.Ф., Іутинська Г.О. Ефективність застосування нітрагіну і регуляторів росту при вирощуванні сої // Сільськогосподарська мікробіологія (Міжвідом. Тематич. Наук. Збірник). – Чернігів: ЦНТЕІ. – 2007. – Вип.5. С. 74 - 85
4. Сытник К.М., Мусатенко Л.И., Пушкарев В.М., Нестерова А.Н., Галкин А.П. Исследование синтеза РНК в органах зародышевой оси прорастающих семян фасоли // Укр. бот. журнал. - 1982, т. XXXIX, № 3. - С.104-111.
5. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning: A laboratory manual. - New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982. – 480 p.
6. Цыганкова В.А., Мусатенко Л.И., Галкина Л.А., Галкин А.П., Пономаренко С.П., Сытник К.М., Икин Д.Е. Особенности действия регуляторов роста на экспрессию генов в клетках зародышей семян в раннем постэмбриогенезе // Биотехнология. – 2008, т.1, № 2. – С. 81 – 92.
7. Romaniuk N.D. et all. Endogenous level of phytohormones under the plant growth regulators influence // International Simp. “Intracellular signalling in plant and animal systems”. Kiev, Ukraine. – 2001. – Р. 91.
8. Normanly J., Slovin J.P., Cohen J.D. Rethinking auxin biosynthesis and metabolism // Plant Physiol. – 1995. – 107. – Р. 323 – 329.
9. Galau G.A., Dure III L. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by reciprocal heterologous complementary deoxyribonucleic acid-messenger ribonucleic acid hybridization // Biochem.- 1981, 20. - P. 4169 - 4178.

Резюме

Методом ДОТ-блоттингу кДНК контрольних рослин з кДНК рослин сої на стадії цвітіння, одержаних із насіння, обробленого препаратами мікробіологічного походження, виявлено відсоткові розбіжності між популяціями мРНК контрольних та дослідних рослин. Зроблено висновок, що підсилення онтогенезу рослин за допомогою різних регуляторів росту досягається шляхом активації неоднотипових груп генів.

Методом ДОТ-блоттинга кДНК контрольных растений с кДНК растений сои на стадии цветения, полученных из семян, обработанных препаратами микробиологического происхождения или их композициями, выявлены процентные различия между популяциями мРНК контрольных и опытных растений. Сделан вывод, что усиление онтогенеза растений с помощью разных регуляторов роста достигается путем активации неоднотипных групп генов.

Using DOT-blott method cDNA of control plants with cDNA soy plants on the flowering stage, from seed treated by preparations of microbiological origin or their compositions, the percent differences are revealed between mRNA populations of

control and experimental plants. A conclusion is done, that increasing of plant ontogenesis with use different growth regulators is achieved by activating of unsame type groups of genes

KURCHII B.A.

Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 31/17 Vasylkivska St., 03022 Kiev, Ukraine

THE MOLECULAR MECHANISM OF HYDROGEN BOND FORMATION BETWEEN T-A BASE PAIRS WITHIN A PROMOTER AND A SIGMA FACTOR

The canonical viewpoint on DNA packaging in higher eukaryotes is that DNA in the nucleus is wrapped around a protein core of two molecules of each of the core histones H2A, H2B, H3 and H4 [8, 9]. Both DNA replication and chromatin assembly occur simultaneously during the S-phase of the cell cycle. It is generally assumed that the parental nucleosomes are transiently disrupted before S-phase and are subsequently assembled onto two DNA daughter strands by an unknown mechanism [9]. *De novo* assembly of nucleosomes occurs by the deposition of a tetramer of the core histones H3 and H4 followed by the deposition of a pair of dimers of the histones H2A and H2B to reconstitute the nucleosome. The formation of the nucleosome in larger eukaryotes is accomplished by the binding of the histone H1 to the core histones H3, H4, H2A and H2B.

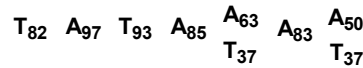
Nucleosome core particles that contain a 'core particle' of the fixed length of DNA [146 base pairs, bp] wrapped 1.65 times around an octamer of 'core' histone proteins are the most thoroughly described in the literature. Although the core histones are arranged as the 2(H3-H4) tetramer and two H2A-H2B dimers positioned on both sides of the tetramer, deeper knowledge of the structure about the origin and preferential positioning stability of the nucleosome along the DNA chain is still unsettled or at least fragmentary. It is suggested that the individual nucleosome is a particle of a flattened cylinder 10.5 nm in diameter and 5.7 nm in height (i.e., the nucleosome possesses in the disk-shaped form that has sizes approximately 6 nm × 11 nm × 11 nm) [8].

The function of four different core histones H2A, H2B, H3, and H4 is to package of DNA into the cell nucleus but little is known about the functional role of each of them in the higher eukaryotic histone octamer. Earlier we have described a model for histone arrangements in the nucleosomes of higher eukaryotes [4–6].

Transcription involves synthesis of an RNA by RNA polymerases. Firstly, RNA polymerase must bind to the double-strand of DNA. The initiation stage requires the recognition of a short region of DNA duplex. The sequence of DNA that is necessary for this reaction is called the promoter. The basic initiation of transcription is performed by the multisubunit RNA polymerase, so called sigma (s) factor (s) [3], which directly contacts the promoter sequences. Sigma factors specifically recognize the distinguishable promoter DNA determinants that are responsible for the binding of RNA polymerases to DNA. Hence, the sigma factor determines which gene must be transcribed. Initiation occurs when an RNA polymerase binds to the promoter, and the site at which the first nucleotide is incorporated is called the startpoint. The identification of transcription factor binding sites is a fundamental problem in the understanding of a signal transduction platform for extracellular or intracellular signals and the regulation of all genome functions.

Prokaryotic and eukaryotic organisms contain a variety of sigma factors that specifically recognize different promoter sequences. Many studied genes have similar promoter sequences, with a consensus sequence of TTGACA at the -35 position and TATAAT at the -

10 position. The consensus sequence TATAAT also is called the Pribnow box. Another sequence of 7 bp



has a separation from the start point from 19 to 27 bp and is called TATA or Hogness box. Here the subscript denotes the percent occurrence of the most frequently found base [7].

It is essential to note that although there are many sigma factors in the cell, most of them in free forms do not bind to promoter sequences. In this connection we proposed that both the promoter and any polymerase must have unique fragment of DNA, called a gene lock and gene key [4–6]. Figure 1 present a model to explain how the promoter and sigma factor are disposed in on the chromosome and RNA polymerase and can interact during transcription reaction.

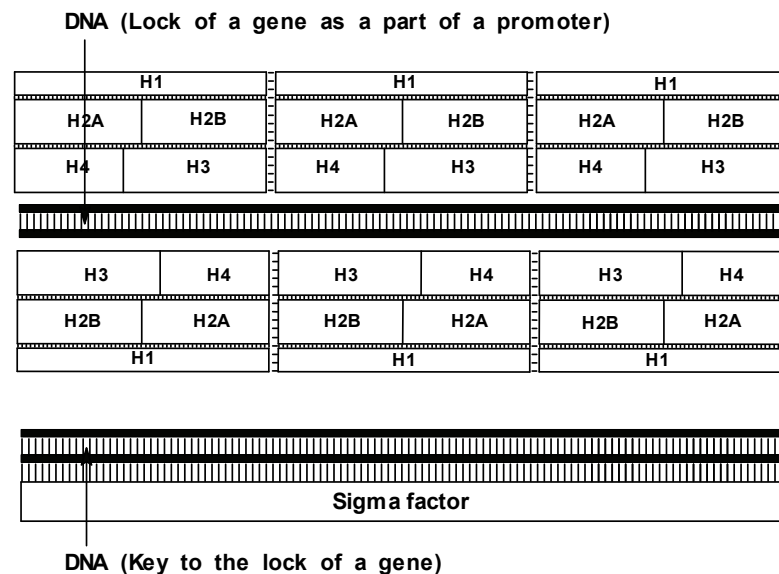


Figure 1. A general model to explain how a sigma factor of RNA polymerases (a gene key) can attach to the gene promoter (a gene lock). The sigma factor can possess in the linear sizes approximately from 80 bp to 100 bp. It is believed that there are at list 100 contacts between the histone octamer and DNA [2] (not shown).

We propose that each gene/cluster lock (it is a part of a promoter) and each gene key (it presents a sigma factor) begin with adenine (A) or thymine (T) bases. The starting point of RNA/DNA synthesis is the formation of non-covalent hydrogen bonds between paired AT bp of the lock and the key at the beginning of doubled strands of DNA (TA or TATA) and also between one pair of AT bp that can be disposed at different distance to the end of the lock and the key as we can see, for example, in the case with TTGACA and TATAAT boxes. The hydrogen bond is formed between the hydrogen at N6 of the adenine and the oxygen at C2 of the thymine (Figure 2). This process leads to the separation of doubled strands of DNA in the lock into two single strands of DNA.

Many cellular substances are proposed to be signaling molecules between genetic information in nucleus and biochemical processes occurring in the cytoplasm. Nevertheless, the molecular mechanisms by which these putative substances initiate, for example, transcription is unknown. It is not clear how the cell knows which gene (for example from 20,000 to 25,000 in human genome [1]) should be transcribed at any given time. We propose that messengers between accession to genetic information and biochemical processes that occurs in accordance with this information are small molecules of DNA named as keys to the gene (i.e. a parole, also called a sigma factor). All cellular organelles are supplied by such genetic keys that are silenced before the destruction of these organelles. We believe each

gene/cluster has a lock which is also composed of DNA, and disposed on one nucleosomal triplet. Hence, all genes/clusters are closed for transcription and can be open only by such keys that are separated from cellular organelles during programmed synthesis or damaging (physically or in oxidative reactions) of cellular structures.

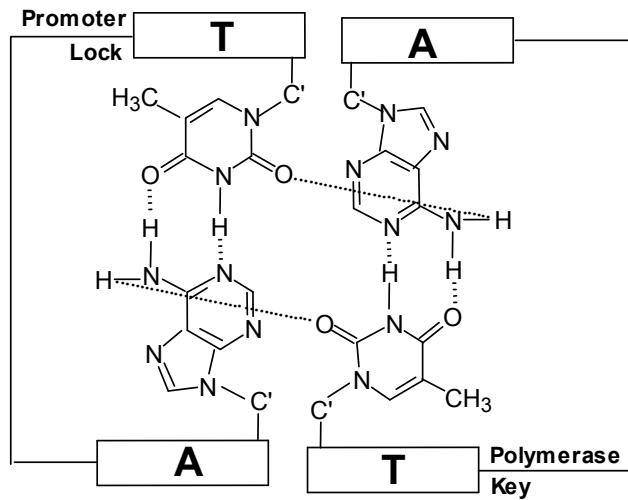


Figure 2. The formation of hydrogen bonds between TA base pair of the promoter and AT base pair of sigma factor.

The gene lock (a fragment of a promoter) and the gene key (a sigma factor) are collinear, but the base pairs within the sigma possess inverse position (Figure 3). Between the TATA box and TA bp are disposed only GC or CG base pairs. Hence, only coincidence TA bp between two fragment of DNA (within a promoter and a sigma factor) permits to form stable hydrogen bonds and initiate transcription.

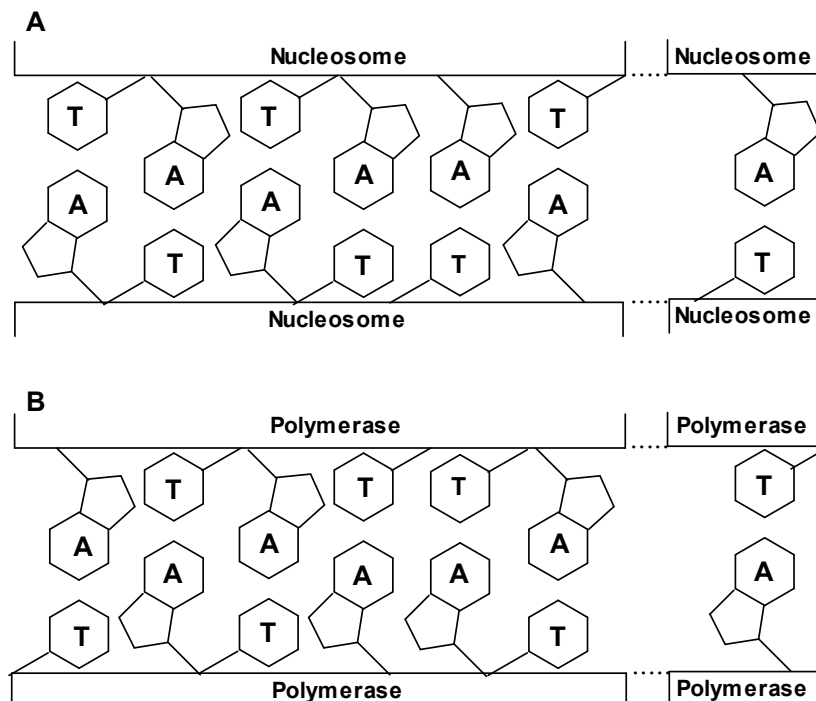


Figure 3. The fragments of a promoter (A) and a sigma factor (B) that contain AT bp. Between the TATA box and TA bp are disposed only GC or CG base pairs.

1. *Fujii S., Kono H., Takenaka S. et al.* Sequence-dependent DNA deformability studied using molecular dynamics simulations // *Nucleic Acids Research*. –2007. – **35**. –P.6063–6074.
2. *Gangaraju V. K., Bartholomew B.* Dependency of ISW1a chromatin remodeling on extranucleosomal DNA // *Mol. Cell. Biol.* –2007. –27. –P.3217–3225.
3. *Gruber T.M., Gross C.A.* Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space // *Annu. Rev. Microbiol.* –2003. –**57**. –P. 441–466.
4. *Kurchii B.A.* What Regulate the Growth Regulators? –Kiev: Logos Publisher, 1998. –202 p. (In Russian and English).
5. *Kurchii B.A.* (2004) On the lock and key for the eukaryal gene. A viewpoint // *Ilyinskikh N.(ed.). Natural Sciences and Humanism*. –Tomsk (Russia): Siberian State Med. Univ., 2004. –P.14-16.
6. *Kurchii B.A.* On the molecular nature of the lock and the key for the eukaryal genes/clusters // *Proceeding of IX Ukrainian Biochemical Congress, 24-27 October 2006, Kharkiv (Ukraine)*. –P.49-50.
7. *Lewin B.* *Genes*. Second edition. –New York, Chichester, Brisbane, Toronto, ingapore: John Wiley and Sons, 1985. –716 p.
8. *Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T. J.* Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature (London)*. –1997. –**389**. –P. 251–260.
9. *Widom J.* Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* –1998. –**27**. –P.285–327.

In this report it is described the molecular mechanisms of a promoter (a gene lock) and a sigma factor (a gene key) interaction during transcription reaction. The hydrogen bond is formed between the hydrogen at N6 of the adenine and the oxygen at C2 of the thymine. This process leads to the separation of doubled strands of DNA in the gene lock into two single strands of DNA and transcription initiation.

В цьому повідомленні описані молекулярні механізми взаємодії промотора (генний замок) і сигма фактора (генний ключ) в реакції транскрипції. Водородна зв'язок утворюється між водородом при N6 аденіна і кислородом при C2 тиміна. Цей процес веде до розділенню подвійної нитки ДНК в генному замку на дві окремі нитки ДНК і ініціації транскрипції.

В цьому повідомленні описуються молекулярні механізми взаємодії промотора (генний замок) і сигма фактора (генний ключ) в реакції транскрипції. Водневий зв'язок утворюється між воднем при N6 аденіна і киснем при C2 тиміна. Цей процес визиває розходження подвійної нитки ДНК в генному замку на дві окремі нитки ДНК і ініціацію транскрипції.

МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ

БАВОЛ А.В., ДУБРОВНАЯ О.В., ЛЯЛЬКО И.И. ЗЛАЦКАЯ А.В.

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская, 31/17, e-mail: bavol1@rambler.ru

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ПШЕНИЦЫ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КУЛЬТУРАЛЬНОМУ ФИЛЬТРАТУ *GAEUMANNOMYCES GRAMINIS VAR. TRITICI*

Биотехнологические методы культуры *in vitro* различных эксплантов (органов или частей органов, изолированных от донорного растения) в настоящее время широко используются для решения прикладных задач селекции сельскохозяйственных культур [1-3], и в частности, мягкой пшеницы [4,5]. Одним из направлений современной биотехнологии, которое уже получило практическое применение, является клеточная селекция, как метод создания новых форм растений путем выделения мутантных клеток и соматональных вариаций в селективных условиях. Устойчивость к болезням — одна из важных задач селекции, которую также пытаются решить с помощью культуры *in vitro* [6]. Возможность получения устойчивых форм при клеточной селекции обусловлена, прежде всего, соматональной изменчивостью, мутагенным действием рострегулирующих веществ питательной среды и веществ, которые входят в селективную среду, а также действием селективного фактора, направленного против выживания неустойчивых форм [7,8]. Методом клеточной селекции уже получены формы пшеницы, устойчивые к фузариозу [7-10], септориозу [11] и гельминтоспориозу [12-14]. Кроме того, показано, что метаболиты некротрофных фитопатогенов не только удобный инструмент для отбора устойчивых генотипов, но и могут быть источником изменчивости, увеличивая частоту и расширяя спектр генетических изменений [7,8, 15-17].

Офиоболлезная корневая гниль, возбудителем которой является *Gaeumannomyces graminis var. tritici* — одна из наиболее вредоносных болезней пшеницы. В ряде стран офиоболлез может быть основной причиной снижения продуктивности зерновых, в том числе и в Украине. Поскольку генетических источников устойчивости к патогену мало, целесообразно использовать методы клеточной селекции для ускоренного получения толерантных форм.

Следует отметить, что цитологические и молекулярно-генетические особенности каллусных культур мягкой пшеницы при клеточной селекции изучены недостаточно. Вместе с тем, данное исследование позволяет выявить специфические генетические механизмы, которые обуславливают изменчивость в процессе отбора и получения устойчивых форм. Такие исследования способствуют более эффективному использованию биотехнологических приемов для решения генетико-селекционных задач у пшеницы.

В связи с этим, целью настоящей работы было изучение особенностей изменчивости генома на хромосомном и молекулярном уровне каллусных культур пшеницы в процессе клеточной селекции на устойчивость к культуральному фильтрату (КФ) *Gaeumannomyces graminis var. tritici*.

Материалы и методы

Работы по клеточной селекции проводились на сорте-двуручке мягкой пшеницы Зимоярка, созданным в Институте физиологии и генетики НАН Украины. Для отбора каллусных линий, устойчивых к метаболитам *G. graminis var. tritici*, использовали прямую клеточную селекцию [16]. В качестве селективного агента применяли КФ фитопатогена, который получали при выращивании высоковирулентных штаммов гриба на жидкой питательной среде Чапека.

Для установления генетической структуры клеточных популяций каллусов в процессе культивирования на контрольной и селективной средах, исследовались клетки

на стадии метафазы. Частоту и спектр хромосомных aberrаций изучали анафазным методом. Анализировали 70-100 метафазных пластинок и клеток на стадиях ана- и телофаз в каждом варианте опыта. Цитогенетический анализ каллусных культур проводили в период наибольшей митотической активности на 5-7 сутки культивирования в 1,3,5 и 7 пассажах.

Экстракцию ДНК проводили с помощью СТАВ-метода [18]. Для исследования уровня полиморфизма ДНК использовали ISSR-анализ, который выполняли по методике амплификации с температурой отжига 50°C [19]. Разделение продуктов амплификации осуществляли в 1,4 % агарозном геле, с последующей визуализацией продуктов амплификации в ультрафиолетовом свете с применением бромистого этидия. Длину продуктов ПЦР определяли с помощью пакета прикладных программ TotalLab v.2.01 (Nonlinear Dynamics). В работе использовали 34 произвольных ISSR-прайма, 3 ди-, три-, тетра- и пентануклеотидными мотивами [20].

Результаты и обсуждение

Клеточную селекцию проводили по разработанной нами схеме [16]. В результате были отобраны штаммы, которые сохраняли способность к росту на селективной среде. От этих штаммов получено 7 устойчивых линий, которые имели прирост биомассы в селективных условиях, 4 из которых сохраняли морфогенетический потенциал.

Цитогенетический анализ каллусных культур показал высокую степень гетерогенности и наличие значительных отличий в характере протекания цитологических процессов между каллусами, выращиваемых на контрольной и селективной средах. Если в контрольных каллусах первые полиплоидные метафазы были выявлены на 5-ые сутки выращивания, то после перенесения на селективную среду такие метафазы наблюдали, начиная уже с 2-х суток культивирования. Анализ числа хромосом в каллусных клетках разных штаммов, исследовавшихся на протяжении семи пассажей, свидетельствует о сходстве цитогенетических процессов, происходящих у них. Так, в каллусах первого пассажа отмечалось достоверное увеличение числа полиплоидных клеток до 26,1±4,1%, в то же время в контроле этот показатель составлял 12,6±3,3% (табл. 1). Появление полиплоидных клеток связано с образованием реституционных ядер в ранней анафазе за счет нарушения веретена деления и, как следствие этого, нерасхождение хромосом к полюсам. Выявлены отдельные клетки с большим числом хромосом, которые, в дальнейшем, очевидно, не делятся.

Таблица 1

Распределение по числу наборов хромосом в клетках каллусных культур пшеницы в процессе культивирования на контрольной и селективной средах, %
(на примере линии № 2)

Вариант опыта	Уровень ploидности	Пассаж			
		1	3	5	7
Контроль	3x	1,0±0,7	1,1±0,6	-	2,2±0,9
	6x	80,6±5,2	67,8±5,1	48,4±4,5	48,9±4,4
	12x	12,6±3,3	25,6±3,5	42,9±4,3	40±4,0
	анеуплоиды	5,8±2,4	5,6±1,4	8,8±2,1	8,9±2,2
Селективная среда	3x	-	-	1,2±1,0	-
	6x	58,7±5,4	54±5,3	47,6±5,1	45,9±2,4
	12x	26,1±4,1	34,5±4,4	39,3±4,1	45,9±2,9
	анеуплоиды	15,2±3,9	11,5±3,3	9,5±2,8	8,2±2,8

Одновременно с полиплоидизацией наблюдалось достоверное увеличение количества анеуплоидных клеток до 15,2±3,9% в сравнении с 5,8±2,4 % в контроле. Это явление связано с потерей хромосом в процессе митозе и часто сопровождается наличием в клетке микроядер. В целом, популяции клеток контрольного и

культивировавшегося на селективной среде каллусов достаточно гетерогенны по числу хромосом, количество которых в клетках составляло от 7 до 84 и более. Выявлены двух- и трехядерные клетки, а также клетки с фрагментированными ядрами.

В анафазах отмечены хромосомные и хроматидные мосты, единичные и парные фрагменты, что свидетельствует о наличии мутационного процесса, который вызывает нарушение целостности хромосом. В первом пассаже количество клеток с абберациями в контрольном каллусе было на уровне $2,9 \pm 1,7\%$, в то же время в каллусах, культивированных на селективной среде, отмечено достоверное увеличение их числа до $13,33 \pm 2,4\%$ (табл. 2). У контрольных каллусов в спектре аббераций присутствовали только мосты (66,7%) и фрагменты (33,3%).

Таблица 2

Частота аббераций хромосом в каллусах пшеницы, %
(на примере линии №2)

Варианты опыта	Пассаж			
	1	3	5	7
Контроль	$2,94 \pm 1,7^*$	$4,34 \pm 0,3^*$	$4,44 \pm 0,3$	$5,33 \pm 0,4$
Селективная среда	$13,33 \pm 2,4^*$	$9,18 \pm 1,7^*$	$5,56 \pm 0,8$	$6,85 \pm 0,7$

* Отличия достоверны при $P_{0,05}$

В третьем пассаже в каллусах, культивированных на селективной среде, наблюдалось дальнейшее увеличение числа полиплоидных клеток до $34,5 \pm 4,4\%$, в то же время количество анеуплоидных клеток достигало $11,5 \pm 3,3\%$, что достоверно не отличалось от контроля. Количество клеток с абберациями снизилось до $9,18 \pm 1,7\%$, что может быть связано с адаптацией к условиям культивирования и/или с элиминацией поврежденных клеток. В пятом пассаже количество полиплоидных клеток в каллусах, которые выращивались на разных средах, достоверно не отличалось и составляло $\approx 40\%$, частота появления клеток с хромосомными абберациями практически не менялась. Подавляющее число аббераций выявляется в виде хроматидных мостов, что свидетельствует о сохранении в клеточных поколениях дицентрических хромосом в результате цикла “разрыв-слияние-мост”. Определенная стабилизация уровня хромосомных перестроек в каллусных культурах может указывать на то, что произошел отбор клеточной популяции, приспособленной к росту на селективной среде. В клетках седьмого пассажа частота и спектр хромосомных перестроек практически не изменялись. Не выявлено достоверных отличий и по уровню плоидности клеток.

Известно, что при селекции *in vitro* генетические изменения в клетках происходят не только на цитологическом, но и на молекулярном уровне. [21,22]. Поэтому, чтобы выявить такие изменения, мы исследовали полиморфизм в спектрах продуктов амплификации ДНК исходного каллуса, устойчивых каллусных линий и каллусов, которые не подвергались влиянию селективного фактора методом ISSR-ПЦР [20]. Показано высокую надежность и информативность данного метода для анализа устойчивых клеточных линий пшеницы. Наиболее эффективными оказались праймеры 3 динуклеотидными мотивами (GA)_n, (AC)_n, (TG)_n и (AG)_n.

У устойчивых каллусов выявлены специфические изменения в нуклеотидных последовательностях ДНК. Установлено, что все устойчивые клеточные линии отличаются от исходного каллуса и каллуса, который не подвергался действию селективного фактора, наличием специфических ампликонов длиной 2347 пн (праймер 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3') и 1745 пн (праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTC-3') (рис. 1), а также отсутствием ампликона длиной 1108 пн (праймер 5'-ACACACACACACACACC-3').

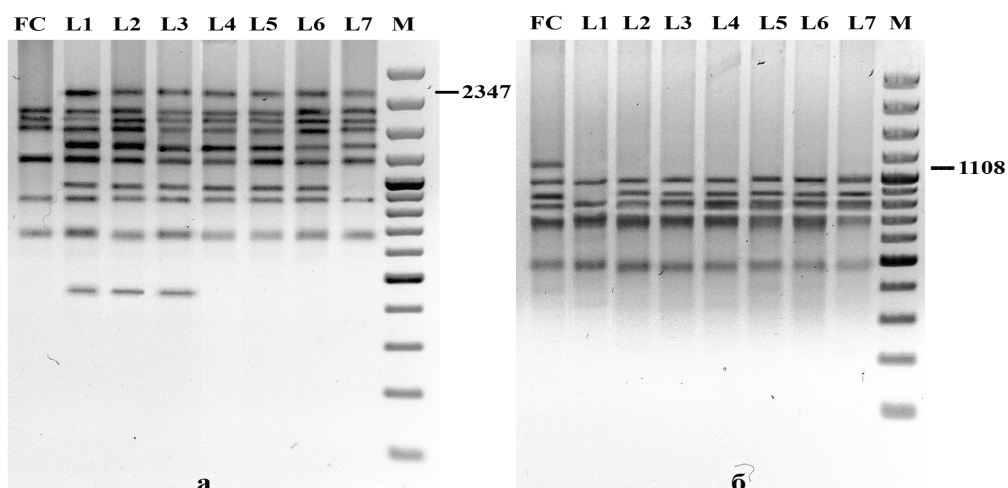


Рис. 1. Спектры продуктов амплификации ДНК: а - праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTC-3'; б - праймер 5'-ACACACACACACACACC-3'. FC- исходный каллус; L1-L7 – каллусные линии, устойчивые к КФ *G. graminis var. tritici*, М - маркер молекулярных масс (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder). С правой стороны отмечен размер специфических ампликонов, пн

В ходе исследований для сравнения устойчивых каллусов и каллусов, на которые не действовали КФ, рассчитывали значения генетических дистанций (D_j) по Жаккарду по 227 локусам. В соответствии с полученными данными была составлена дендрограмма, на которой выделялись два четко отличимых кластера. Первый - полностью сопоставим с группой линий, полученных нами путем клеточной селекции, а второй – с группой каллусов, не подвергавшихся действию селективного фактора. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при клеточной селекции генетические изменения, возникающие в культуре *in vitro*, носят направленный характер.

Наличие/отсутствие определенных ампликонов у всех устойчивых линий (при условии наличия/отсутствия этих фрагментов у исходного каллуса и каллусов, которые не подвергались действию КФ) может свидетельствовать о их непосредственной связи с признаком устойчивости. Именно такие ампликоны, потенциально могут быть использованы как маркеры устойчивости.

Выводы

Показано что в каллусах, подвергавшихся влиянию селективного фактора, на начальных этапах клеточной селекции отмечалось достоверное увеличение числа полиплоидных и анеуплоидных клеток в сравнении с контролем, а также значительное увеличение числа клеток с абберациями. Устойчивые к культуральному фильтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici* клеточные линии пшеницы характеризуются наличием специфических изменений в нуклеотидных последовательностях ДНК. Установлено, что все устойчивые клеточные линии отличаются от исходного каллуса и каллуса, который не подвергался действию селективного фактора, наличием специфических ампликонов длиной 2347 пн (праймер 5'-TCTCTCTCTCTCTCG-3') и 1745 пн (праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGTC-3'), а также отсутствием ампликона длиной 1108 пн (праймер 5'-ACACACACACACACACC-3').

Литература

1. Атанасов А.А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск: Наука, 1993. - 242 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
3. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. СПб.: Изд-во Санкт-Петербургск. ун-та, 2003. 227 с.

4. Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К., Кушнаренко С.В. Биотехнология зерновых культур. Алма-Ата: Гылым, 1992. 240 с.
5. Анапияев Б.Б. Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы. Алматы: Гылым, 2001. 220 с.
6. Волощук С. И., Волощук Г. Д., Гурко В. С. Створення вихідного матеріалу озимої пшениці, стійкого до грибних патогенів методами клітинної селекції // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть – К: Логос. – 2001. – Т. 1, № 4. – С. 610 – 614.
7. Волощук С.И. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* Schwabe // Дис. на здобуття наук. ст. канд. с.-г. наук. К.: Ін-т агроєкології УААН, 2006. -249 с.
8. Lu W., Zhou M., Zhang X. Studies and improvement of wheat breeding for scab resistance using biotechnology // Wheat improvement for Scab resistance: Proc. Intern. Symp.- 5- 11 May 2000.- Sunghou and Nanjing, China, 2000.- P.151-156.
9. Ahmed, K.Z., Mesterházy, Á., Bartók, T., Sági, F. In vitro techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for Fusarium-resistance. II. Culture filtrate technique and inheritance of Fusarium-resistance in the somaclones // Euphytica .- 1996.- v.91, №3 .- P. 341-349.
10. Клечковская Е., Игнатова С., Слепченко А. Селекция in vitro генотипов пшеницы с комплексной устойчивостью к фузариозу злаков // Биология клеток растений in vitro, биотехнология и сохранение генофонда: Тез. Докл. VII междунар. Конф. 25-28 ноября 1997 г. Москва, Россия. –Москва, 1997. –С. 372.
11. Джос Л., Калашиникова Е.А. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу // Сельскохозяйственная биотехнология.- Избранные работы / Под ред. Шевелухи В.С. – М.: Евразия +, 2000.- С. 61-71.
12. De Cristaldo R., De Carvalho F., Barbieri R., Kohli M., Dornelles C., Handel C., Bered, F. Response of different subcultures of wheat callus to toxic filtrates of *Helminthosporium sativum* // J. of Genetics and Breeding.-1997.-v. 51, N1.- P. 39-43.
13. Shawla H., Wenzel G. In vitro selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum* // Theor. and Appl. Genet. -1987. – Vol. 74. –P. 841-845.
14. Shawla H. S., Wenzel G. Resistant wheat plants against *Helminthosporium sativum* from embryo derived callus cultures // Wheat Inf. Serv. -1989. –Vol. 69, N1.-P.8-12.
15. Губанова Н. Я., Дубровная О. В., Чугункова Т. В. Отбор и цитологический анализ устойчивых к токсину *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* клеточных линий кормовой свеклы и регенерантов из них // Цитология и генетика, – 1999. -33-№4. -С. 9-15.
16. Бавол А. В., Дубровна О.В, Лялько І.І. Добір та цитологічний аналіз стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* клітинних ліній пшениці та регенерантів з них // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів -2008. - 6, №2 –С.191-200.
17. Дубровна О.В. Спектр аберацій хромосом в клітинних популяціях калюсних культур кормових буряків при відборі на стійкість до токсину збудника бактеріозу // Физиология и биохимия культ. растений.- 2003.- Т. 34, № 3.- С. 241-247.
18. Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A.S. et al. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome // Theor. and Appl. Genet. – 1993. – vol. 86. – P. 705-712.
19. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al. A microsatellite map of wheat // Genetics. – 1998. – 149. – P. 2007-2023.
20. Бавол А. В., Злацька А. В. Поліморфізм ДНК калюсних ліній пшениці, стійких до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, за використання ISSR-методу // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009. –том 41, №1.–С. 69-74.
21. Priya R., Khimani A., Subramanian R. Characterization of Fusarium Wilt Resistant and Susceptible Varieties of ginger (*Zingiber officinale*) through Random Amplified Polymorphic DNA Markers // Current Trends in Biotechnology and Pharmacy, -2007. -№1. - P. 87-95.

22. Zheng, X., Wolff D. Randomly Amplified polymorphic DNA Markers Linked to Fusarium Wilt Resistance in Diverse Melons // Hort. Sci. -2000. – 35, №4.- P. 716-721.

Резюме

Проведен цитогенетический и молекулярно-генетический анализ култусных культур при клеточной селекции на устойчивость к культуральному фильтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. Показано что в каллусах, подвергавшихся влиянию селективного фактора, на начальных этапах клеточной селекции, отмечалось достоверное увеличение числа полиплоидных и анеуплоидных клеток в сравнении с контролем, а также значительное увеличение числа клеток с абберациями. Выявлено, что при действии культурального фильтрата генетические изменения на молекулярном уровне, которые возникают в культуре *in vitro*, носят направленный характер. Установлено, что все устойчивые клеточные линии отличаются от исходного каллуса и каллуса, который не подвергался действию селективного фактора, наличием специфических ампликонов длиной 2347 пн (праймер 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3') и 1745 пн (праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTTC-3'), а также отсутствием ампликона длиной 1108 пн (праймер 5'-ACACACACACACACACC-3').

Проведено цитогенетичний та молекулярно-генетичний аналіз калюсних культур за клітинної селекції на стійкість до культурального фільтрату *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. Показано, що у калюсах, які зазнавали дії селективного чинника, на початкових етапах клітинної селекції спостерігалось достовірне збільшення числа поліплоїдних та анеуплоїдних клітин порівняно з контролем, а також значне підвищення числа клітин з абераціями. Виявлено, що за дії культурального фільтрату генетичні зміни на молекулярному рівні, що виникають в культурі *in vitro*, носять спрямований характер. Встановлено, що всі стійкі клітинні лінії відрізнялись від вихідного калюсу та калюсу, який не зазнавав дії селективного чинника наявністю специфічних ампліконів довжиною 2347 пн (праймер 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3') та 1745 пн (праймер 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTTC-3'), а також відсутністю амплікону довжиною 1108 пн (праймер 5'-ACACACACACACACACC-3').

The cytogenetical and molecular peculiarities of callus culture in cultivation on the selective medium where studied. On the initial stages of cellular selection in calluses, which were cultivated on the selective medium, has been revealed increase in number of polyploidy and aneuploidy cells and cells with different aberrations. Specific changes in sequence of DNA were revealed in resistant calluses. It was established, that all resistant cellular lines differ from initial callus and callus which was not treated to action of the selective factor by the presence of specific amplicons in the length 2347 bp (primer 5'-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3') and 1745 bp (primer 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTTC-3'), and also absence by the amplicon in the length 1108 bp (primer 5'-ACACACACACACACACC-3').

ВЛАСЕНКО В.А.

Мироніський інститут пшениці імені В.М. Ремесла УААН,
Україна, 08853, Київська обл., Миронівський р-н, с. Центральне,
e-mail:vlaskenova@ukr.net

ОСОБЛИВОСТІ ГЕНОМ-ПЛАЗМОННОГО ВПЛИВУ НА МІНЛИВІСТЬ ВИСОТИ РОСЛИН У АЛОПЛАЗМАТИЧНИХ ФОРМ ТА ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ

При розробці теорії віддаленої гібридизації Г.Д. Карпеченко [1] звернув увагу на роль цитоплазми, припускаючи її різноманітність у різних форм одного виду. У багатьох дослідженнях з пшеницею та спорідненими видами виявлено вплив цитоплазми на

спадковість і взаємодія її з ядерним генетичним матеріалом [2-4]. Більшість учених [5-7] вказують на важливість взаємодії цитоплазми з геномом і можливість практичного селекційного використання цього явища. Значущий позитивний ефект чужинної цитоплазми спостерігали на прояві різних ознак і властивостей у пшениці: біохімічної та хлібопекарської якості зерна [8], врожаю зерна і його складових [9,10], стійкості до хвороб [11, 12] і абіотичних факторів [13, 14] та інше [15-17]. Спостерігали [18] як негативний, так і позитивний цитоплазматичний вплив на селекційні ознаки без будь-якої взаємодії з ядерними генами. За окремими ознаками деякі дослідники [19, 20] у своїх експериментах не виявили ефекту цитоплазми.

Цитоплазматичний ефект залишається актуальною проблемою в адаптивній селекції пшениці, а тому необхідні подальші дослідження різноманіття цитоплазм у сучасних генотипів пшениці, взаємодії геному з плазмомом, зокрема за висотою рослин, і адаптації в конкретних умовах довкілля.

Мета роботи – з'ясувати селекційну значимість 14 цитоплазм споріднених видів пшениці за ознакою висота рослин щодо створення сортів пшениці м'якої озимої для умов Лісостепу України.

Матеріал та методи

Серію цитоплазматичних (ідентично – алоплазматичних) ліній пшениці ярої Chinese Spring (Китай) у 1985 р. люб'язно надав нам О.Г. Давиденко, учений Інституту генетики і цитології АН Біларусі (він отримав їх з Японії від професора К. Цуневакі, автора цих ліній). Назви цих ліній на 15 цитоплазмах подаються в інтерпретації О.Г. Давиденко [15]: C04 з цитоплазмою *Ae. squarrosa typica*; C05 – *Ae. comosa*; C08 – *Ae. speltoides*; C10 – *Ae. sharonensis*; C21 – *T. dicocoides spontaneum*; C22 – *T. dicocum*; C28 – *Ae. cylindrica*; C33 – *Ae. kotschyi*; C34 – *Ae. variabilis*; C36 – *Ae. ventricosa*; C53 – *Ae. juvenalis*; C56 – *Ae. vavilovii*; ASS – *Ae. squarrosa strangulate*; HV – *Hyanaldia villosa*; C52 – еуплазматична лінія з цитоплазмою *T. aestivum* на сорті Chinese Spring (контрольний варіант). Упродовж 1986-1991 рр. нами створені (в умовах теплиці) 5 серій ліній пшениці озимої шляхом шести бекросних схрещувань (твел-методом) на основі різних генотипів. Це сорти пшениці м'якої озимої: МПП – Миронівська 808 (М808), Миронівська ювілейна (МЮ) та лінія Еритроспермум 9481 (Е9481); Росії – Донская полуинтенсивная (ДП) та Кинельская 7 (К7). Вивчення гібридів та ліній пшениці озимої проводилось у польових умовах МПП згідно із загальноприйнятою методикою в селекції. Математична обробка і системний аналіз проводились за методиками варіаційної статистики за Б.А. Доспеховим [21].

Результати та обговорення

За даними двохфакторного дисперсійного аналізу отримано достовірні ефекти впливу на формування висоти рослин як геному, так і плазмону в усіх досліджуваних середовищах (табл. 1). При цьому вплив геному значно перевищував вплив плазмону у 8-138 разів, що певною мірою відображають також показники фактичного значення *F*-критерію у них. У гібридних поколіннях (V_3 - V_6) виявлено високу специфічність експресії плазмону. Так, у V_3 в 1989 р. свідчить про вплив плазмону в напрямі збільшення її. На протигагу V_3 у V_4 (1990 р.) жодна з цитоплазм істотно не вплинула на збільшення висоти рослин. Меншу висоту рослин порівняно з плазмотипами C52 формували цитоплазми C05 та C21. На рівні специфічної взаємодії генотип/цитоплазма кількісно переважали випадки (29 з 70-ти) з істотним зменшення висоти рослин (понад 10 см) за рахунок експресії плазмону. Але випадків з істотним підвищенням висоти рослин не зафіксовано. Привертає увагу той факт, що за умов сприятливих для формування вегетативної маси експресія плазмону спрямована переважно у бік зниження висоти рослин, а за більш жорстких умов – підвищення її. Тобто, цитоплазма проявляє сильну модифікуючу функцію в гібридних потомствах.

Таблиця 1.

Результати дисперсійного аналізу біометричних даних за висотою рослин у В₃-В₄ та В₆ від схрещування алоплазматичних ліній пшениці м'якої ярої Chinese Spring з генотипами пшениці м'якої озимої

Гібридне покоління	Плазмон			Геном		
	<i>F</i> факт.	<i>F</i> крит.	<i>P</i> знач.	<i>F</i> факт.	<i>F</i> крит.	<i>P</i> знач.
В ₃ (1989 р.)	2,205953	1,872589	0,01881	5,915074	2,536581	0,00048
В ₄ (1990 р.)	1,962612	1,872589	0,03851	15,97377	2,536581	0,00000
В ₆ (1993 р.)	3,802451	1,872589	0,00017	32,09431	2,536581	0,00000
В ₆ (1994 р.)	1,95070	1,872589	0,04086	269,3796	2,536581	0,00000
В ₆ (1995 р.)	5,508885	1,872589	0,00000	91,82065	2,536581	0,00000

Достовірність впливу як геному, так і плазмону на формування висоти рослин у різних умовах середовища дає можливість провести трифакторний дисперсійний аналіз, прийнявши роки досліджень за фактор – екологічний градієнт. Істотний вплив мали всі фактори (табл.2), за винятком взаємодії плазмон / геном та плазмон / геном / екологічний градієнт.

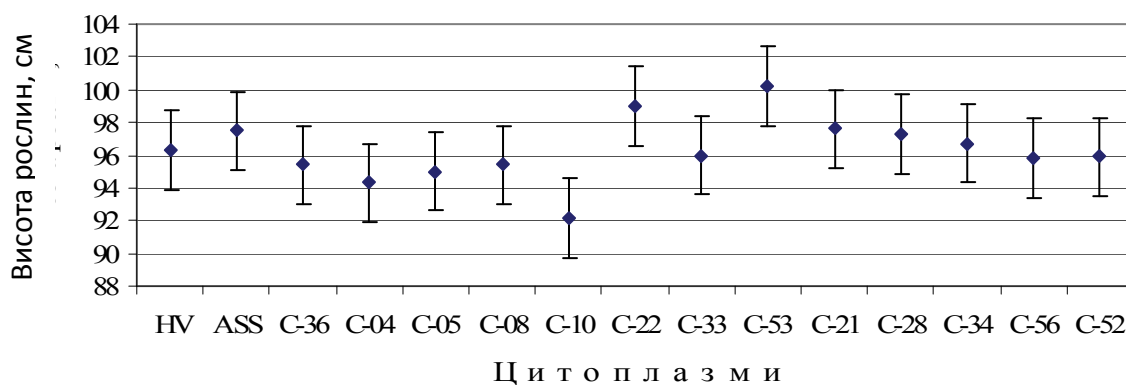
Таблиця 2.

Дані трифакторного дисперсійного аналізу мінливості висоти рослин у алоплазматичних ліній пшениці озимої (МПП, 1993-1995 рр.)

Джерело варіювання	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> фактичне	<i>P</i>	
Плазмон (П)	1385	14	99	2,4	0,004**	
Геном (Г)	20400	4	5104	122,1	0,000***	
Екологічний градієнт (Е)	22200	2	11100	265,7	0,000***	
Взаємодія	П / Г	1244	56	22	0,5	0,9970000
	П / Е	1855	28	66	1,6	0,034*
	Г / Е	2344	8	293	7	0,000***
	П / Г / Е	2135	112	19	0,5	1
Похибка	12538	300	42			

Примітка: Достовірно за *F*-критерієм при $p <$: * - 0,05; ** - 0,01; *** - 0,001.

У процесі виявлення цитоплазм з істотною силою впливу на формування висоти рослин у алоплазматичних ліній пшениці озимої підтверджується наявність потужного екологічного градієнта. Так, у 1993 р. за середньої висоти рослин у генотипів з рідною цитоплазмою 84 см у плазмотипів С04 вона була достовірно меншою, а у С22 та С53 – більшою. Наступного року середня висота рослин у еуплазматичних ліній була більшою на 15 см, а у різних плазмотипів – на 11-25 см, що в середньому в досліді склало 102 см. У 1994 р. за більш сприятливих умов для формування вегетативної маси рослин плазмотици С04, С21, С22, С28, С33, С36, С53, А55 та НV істотно впливали на збільшення висоти рослин. У 1995 р. жодна з цитоплазм істотно не збільшила показники ознаки, як це спостерігалось у 1994 р., більше того – плазмотип С10 мав істотно меншу висоту рослин. Цей ефект істотно вплинув на середній показник ознаки за 3 роки вивчення, що можна сприймати за позитивний селекційний ефект і залучати плазмотици С10 як джерело, що зменшує висоту рослин (рис.). Водночас плазмотици С22 та С53, за середнім показником ознаки у 1993-1995 рр., істотно збільшували висоту рослин, з якими у схрещування необхідно залучати короткостеблові генотици.



Коректний ефект при: $F_{(14; 300)} = 2,367$; $p = 0,00394$; $HP_{05} = 3\text{см}$

Мінливість висоти рослин під впливом плазмонів (МПП, 1993-1995 рр.)

Висновки. У серіях створених алоплазматичних ліній пшениці м'якої озимої (5 генотипів з 15 цитоплазмами) істотний вплив на мінливість висоти рослин мали усі основні фактори (екологічний градієнт, геном, плазмон та взаємодії – плазмону і геному з екологічним градієнтом), за винятком взаємодії плазмон/геном та плазмон/геном/екологічний градієнт. При цьому значну перевагу має вплив ядерних генетичних компонентів над цитоплазматичними. Проте істотне зниження висоти рослин може відбуватися за участі в схрещуваннях генотипів з цитоплазмою *Ae. sharonensis*, а підвищення – *T. dicocum* та *Ae. juvenalis*.

Література

1. Карпеченко Г.Д. Теория отдаленной гибридизации: Избр. тр. – М.: Наука, 1971. – С. 147-209
2. Tsunewaki K. Cytoplasmic variation in *Triticum* and *Aegilops* // Proceedings 7th Intern. Wheat Genet. Symp. – Kyoto, 1988. – P. 53-62.
3. Палилова А.Н. Генетические системы у растений и их взаимодействие. – Минск: Наука и техника, 1986. – 160 с.
4. Ekiz H., Konzak C.F. Preliminary diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Breeding. – 1994. – V. 113, N 1. – P. 47-52.
5. Ekiz H., Konzak C.F. Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat. I. Analysis of alloplasmic lines // Crop Sci. – 1991. – 31 (6). – P. 1421-1427.
6. Панайотов И., Гоцов К. Влияние цитоплазмы на наследственную изменчивость пшеницы // С.-х. биология. – 1975. – Т.10, №4. – С. 610-613.
7. Семенов О.Г. Изучение плазмо-ядерного взаимодействия у гибридов *Triticum aestivum* L. на чужеродной цитоплазме // Мат. II совет.-индийского симпозиума по пробл. ген. и сел. культур. раст. – Баку: Элли, 1976. – С. 65-67.
8. *Cytoplasmic effects on quality traits of bread wheat (Triticum aestivum L.)* / H. Ekiz, A. Safi Kiral, A.Akcin, L.Simsek // Wheat: Prospects for Global Improvement. – Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. – P. 255-262.
9. Хангильдин В.В., Симоненко В.К. Влияние чужеродных цитоплазм на взаимосвязь компонентов продуктивности колоса у аллоплазматических линий яровой пшеницы // Цитология и генетика. – К., 1996. – Т. 34, №2. – С. 41-46.
10. Khangildin V.V., Sechnyack A.L. Influence of alloplasms on ear efficiency in introgressive wheat hybrids // Genetic Collections, Isogenic and Alloplasmic Lines / International Conference; Novosibirsk, Russia, July 30 – August 3, 2001. – Novosibirsk: IC&G, 2001. – P. 80-81.
11. Parfenova T.A. Nuclear-cytoplasmic interactions in common wheat resistance to fungal pathogens // Keystone Symp. on host-fungus pathogen interact., February 25 – March 3, 1995 / J. Cell. Biochem. – 1995. – N 19. – P. 163.
12. Волуевич Е.А., Булойчик А.А. Влияние чужеродного плазмона растения-хозяина на устойчивость мягкой пшеницы к возбудителю твердой головни // Цитология и генетика. – К., 1999. – Т. 33, №4. – С. 43-48.

13. *Sutka J., Worland A.J., Maystrenko O.J.* Slight effect of cytoplasm on frost resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Cer. Res. Com.* – 1991. – N. 19. – P. 311-317.
14. *Палилова А.Н., Силкова Т.А.* Эффекты чужеродных цитоплазм на зимостойкость ярово-озимых гибридов F₁ пшеницы // *Изогенные линии и генет. коллекции.* – Новосибирск, 1993. – С. 53-55.
15. *Давыденко О.Г.* Экспрессия и трансмиссия признака мужская стерильность в цитоплазмах *Aegilops* и *Triticum* // *Биологич. основы повышения прод-ти зерн. к-р: Сб. науч. тр. Мироновский НИИ сел. и семен. пшен.* – 1985. – С. 45-48.
16. *Кохметова А.М.* Генетические аспекты адаптивности пшеницы. – Алматы, 2005. – 226 с.
17. *Panayotov I.* New wheat hybrids, created by (k)-cms // *Abstracts of 6th Int. Wheat Conf., 5-9 June 2000, Budapest, Hungary.* – Hungary: LENIA DTP Studio, 2000. – P. 294.
18. *Sagi L., Barnabas B.* Evidence for cytoplasmic control of in vitro microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* – 1989. – 78. – P. 867-872.
19. *Danon T., Eyal Z.* Inheritance of resistance to two *Septoria tritici* isolates in spring and winter bread wheat cultivars // *Euphytica.* – 1990. – 47 (3). – P. 203-214.
20. *Силкова Т.А.* Влияние чужеродных цитоплазм на формирование хозяйственно ценных признаков у аллоплазматических линий мягкой пшеницы: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.15 / Ин-т генетики и цитологии АН БССР.–Минск,1988.–18с.
21. *Доснехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агропромиздат, 1985. – 351 с.

На серіях створених алоплазматичних ліній пшениці м'якої озимої (5 генотипів з 15 цитоплазмами) виявлено значну перевагу впливу ядерних генетичних компонентів над цитоплазматичними на мінливість висоти рослин. Проте істотне зниження висоти рослин відбувається за участі в схрещуваннях генотипів з цитоплазмою *Ae. sharonensis*, а підвищення – *T. dicocum* та *Ae. juvenalis*.

На созданных сериях аллоплазматических линий пшеницы мягкой озимой (5 генотипов на 15 цитоплазмах) выявлено значительное преимущество влияния ядерных генетических компонентов над цитоплазматическими на изменчивость высоты растений. Однако существенное снижение высоты растений происходит при участии в скрещиваниях генотипов с цитоплазмой *Ae. sharonensis*, а повышение – *T. dicocum* и *Ae. juvenalis*.

On the created series of alloplasmatic lines of winter bread wheat (5 genotypes on 15 cytoplasm) considerable advantage of influence of nuclear genetic components over cytoplasmic on the variability of plant height was revealed. However, the substantial reduction of plant height takes place when crossing genotypes with the cytoplasm of *Ae. sharonensis* and increase – *T. dicocum* and *Ae. juvenalis*.

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

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (*Beta vulgaris* L.), ИНДУЦИРОВАННАЯ ТРИТОНОМ X-100

К эпигенетическим относят наследуемые в ряду клеточных и половых поколений изменения признаков, не связанные с изменением последовательности нуклеотидов в ДНК генов [1]. Огромное внимание исследователей к эпигенетической изменчивости делает актуальным поиск эпимутагенов. Наиболее известным в настоящее время эпимутагеном является 5-азациитидин, вызывающий деметилирование ДНК хромосом и активирующий

метилованные ранее гены [2-5]. Деметилированное состояние генов сохраняется в ряду последовательных поколений, обуславливая стойкие изменения различных морфологических признаков. На сахарной свекле обнаружены изменения степени стерильности пыльцы, ветвления цветоносных побегов и признака раздельно- и сростноцветковости [4, 5].

Наряду с 5-азациитидином, модифицирующим нуклеотиды в молекуле ДНК, выявлен принципиально новый тип эпимутагена, который действует на процесс взаимодействия белков с биологическими мембранами. Такое действие обнаружено у известного детергента Тритон X-100 [6]. Установлено, что Тритон X-100 вызывает наследуемые изменения морфологических признаков при воздействии на семена пшеницы в момент их прорастания [6]. В основе таких изменений может лежать способность Тритона X-100 не только изменять структуру мембран и отделять от мембран белки, но и изменять взаимодействие нуклеопротеидов с ядерной мембраной и ядерным матриксом. Такое воздействие Тритона X-100 хорошо согласуется с моделью многомерного кодирования наследственной информации у растений. Согласно этой модели наследственная информация кодируется не только последовательностью нуклеотидов, но и дифференциальной степенью эндоредупликации отдельных участков хромосом [7, 8]. В этой модели существенная роль отведена процессам взаимодействия ДНК хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом. В связи с этим представляло интерес изучить воздействие Тритона X-100 на сахарную свеклу и тем самым выявить дополнительные доказательства гипотезы о многомерности кодирования наследственной информации. В пользу предложенной модели могут свидетельствовать любые изменения морфологических признаков и физиологических процессов у экспериментальных растений. Целью настоящего исследования было изучение влияния Тритона X-100 на прорастание семян и на морфологические признаки у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.).

Материалы и методы

В исследование были взяты семена, полученные путем саморепродукции от способного к агамоспермному размножению растения сахарной свеклы № 8-3 (урожай 1998 г.), а также были использованы семена предоставленной нам А.В. Мглинцом (ИЦиГ СО РАН) популяции однолетней сахарной свеклы (урожай 1989 г.). Контрольные растения были выращены из семян, которые замачивали в проточной воде в чашках Петри в термостате при 29⁰С. Опытные растения были выращены из семян, замоченных в 0.1 % растворе Тритона X-100 в течение 18 часов при температуре 29⁰С. Проростки высаживали весной 2008 года в гидропонную теплицу, а 11 июня 2008 года из теплицы в открытый грунт, где растения росли до 10 октября 2008 года. Учет признаков у растений проводили в два периода: в день пересадки и в день уборки.

Результаты и обсуждение

Обнаружено, что воздействие Тритоном X-100 оказывает влияние, как на процессы прорастания семян, так и на проявление морфологических признаков листа и корня у растений сахарной свеклы. Так, из 300 контрольных семян от растения сахарной свеклы № 8-3 (8-3к) проросло 133 семени (44.3 %), а из 510 семян этого же растения, обработанных Тритоном X-100 (8-3тр), проросло 355 семян (69.6 %). Оценка с помощью критерия G [9] показала достоверность различий между контролем и опытом (G=13.312). Различия наблюдались не только в количестве проросших семян, но и в динамике прорастания (рис. 1).

Из рисунка 1 видно, что срок прорастания семян 8-3тр продолжительнее срока прорастания семян 8-3к на 5 дней, причем у опытных семян пик прорастания приходится на 9-й день, тогда как у контрольных - на 4-й день. Растянутасть срока прорастания у опытных семян говорит о том, что Тритон X-100 уменьшает энергию прорастания, хотя способность к прорастанию у семян данного генотипа увеличивается.

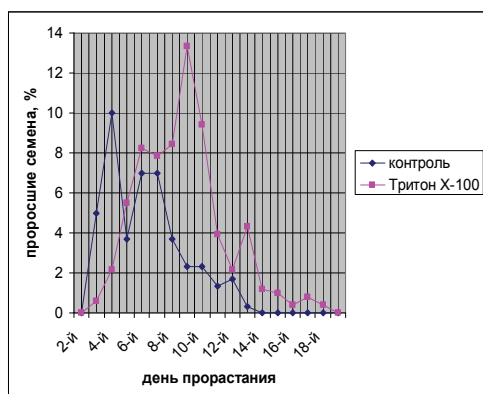


Рис. 1. Динамика прорастания контрольных и обработанных 0.1 % раствором Тритона X-100 семян растения 8-3.

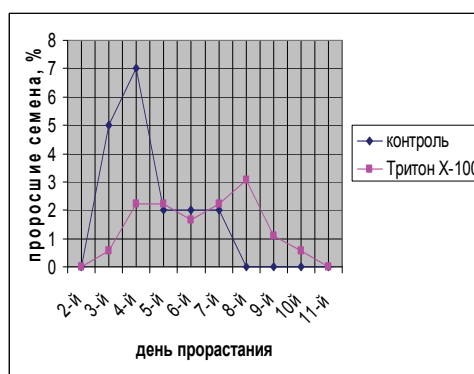


Рис. 2. Динамика прорастания семян контрольных и обработанных 0.1 % раствором Тритона X-100 семян однолетней сахарной свеклы

Снижение энергии прорастания под воздействием Тритона X-100 обнаружилось и в опыте с однолетней популяцией сахарной свеклы (рис. 2). В эксперимент было взято 100 шт контрольных семян и 360 шт опытных. Из контрольных проросло 18 семян (18 %), а из опытных семян – 49 (13.6 %). Различия по способности к прорастанию между контролем и опытом в данном случае недостоверны ($G=0.852$). Пик прорастания у опытных семян приходится на 8-й день, тогда как у контрольных – на 4-й день (рис. 2).

Увеличение сроков прорастания свидетельствует о том, что обработка Тритоном X-100 изменяет функционирование генома растения.

Подтверждением этого служат данные о характере изменчивости морфологических признаков листа и корня у растений сахарной свеклы. В контрольных и обработанных Тритоном X-100 растениях выявлен полиморфизм по ряду морфологических признаков листа и корня. Наиболее четко идентифицируемые признаки были следующие: *загиб листа*, *загиб корня*, *глазки на головке корня*, *облиственность головки корня*, *короткий корень* и *мелкий корень*. Признак *облиственность головки корня* характеризуется наличием большого числа мелких листочков у оснований черешков крупных листьев. Признак *короткий корень* характерен для корней диаметром не более 4 см и длиной 7 см и не имеющих сужения в нижней части. Признак *мелкий корень* был присущ корнеплодам, которые можно было рассматривать как неразвившиеся; они имели диаметр не более 2 см.

Всего было пересажено в грунт 102 контрольных растения (8-3к) и 199 – опытных (8-3тр). К моменту уборки сохранились и были учтены при анализе 96 контрольных растений (8-3к) и 189 – опытных (8-3тр).

Характерно, что степень проявления ряда признаков зависела от времени наблюдения (табл. 1), поэтому учет признаков проводили в два срока (табл. 1).

Различия между контрольными и опытными растениями по признаку *загиб листа* были достоверны лишь в момент высадки в грунт ($P < 0.05$), а к моменту осенней уборки различия стали недостоверны (табл. 1).

Таблица 1

Влияние 0.1 % раствора Тритона X-100 на морфологические признаки растения сахарной свеклы № 8-3

Признак	Дата учета	8-3 к, шт (%)	8-3 тр, шт (%)	G-тест	P
<i>Загиб листа</i>	11.06.2008	23 (22.5)	80 (40)	5.0008	< 0.05
	10.10.2008	42 (43.8)	100 (52.9)	0.7368	
<i>Загиб корня</i>	11.06.2008	11 (11)	21 (10.5)	0.003	
	10.10.2008	26 (27.1)	99 (52.4)	7.1952	< 0.01

<i>Облиственность головки корня</i>	11.06.2008	7 (6.9)	22 (11.05)	1.1852	
	10.10.2008	20 (20.8)	79 (41.8)	6.676	< 0.01
<i>Мелкий корень</i>	11.06.2008	19 (18.6)	49 (24.6)	0.9006	
	10.10.2008	13 (13.5)	10 (5.3)	4.616	< 0.05
<i>Короткий корень</i>	11.06.2008	10 (9.8)	11 (5.5)	1.5668	
	10.10.2008	10 (10.4)	4 (2.1)	7.8786	< 0.01
<i>Глазки</i>	10.10.2008	4 (4.2)	62 (32.8)	25.0975	< 0.01
<i>Щавелево-видный лист</i>	10.10.2008	7 (7.3)	35 (18.5)	5.4316	< 0.05

Различия между контрольной и опытной группами растений по признакам *загиб корня*, *облиственность головки корня*, *короткий корень*, *мелкий корень*, *глазки* на головке корня и *щавелево-видный лист* были достоверными в момент осенней уборки (табл. 1).

Таким образом, все взятые в исследование признаки изменяли и усиливали свое проявление под влиянием Тритона X-100, причем наиболее сильные различия между контролем и опытом накапливались к моменту осенней оценки. Возникающие под действием Тритона X-100 изменения очень разнообразны. Так, например, если *загиб листа* и *загиб корня* можно рассматривать как результат разной скорости деления клеток на разных сторонах данного органа, то увеличенный процент *глазков* на корнях обработанных Тритоном X-100 растений говорит о том, что здесь затронуты процессы дифференцировки, процессы качественной перестройки работы генома. Более того, большое число разнообразных изменений говорит о том, что воздействию Тритона X-100 подвергается не отдельный ген, а значительная часть генома. Выявленные изменения морфологических признаков наблюдаются не только на начальных, но и на более поздних стадиях развития, отделенных от момента воздействия Тритоном X-100 большим промежутком времени и большим числом клеточных поколений. Это позволяет предположить, что измененные состояния мембран способны сохраняться в ряду клеточных поколений. Таким образом, полученные данные говорят о том, что Тритон X-100 можно рассматривать как эпимутаген.

Выводы

Неионный детергент Тритон X-100 вызывает четко идентифицируемые изменения морфологических и физиологических признаков у растений сахарной свеклы. Это свидетельствует о том, что биологические мембраны, и в первую очередь мембраны ядра клетки, являются важным элементом структурной организации генома, определяющим не только его функциональное состояние, но и его изменчивость.

Работа финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009-2011 гг. «Индукция эпигенетических изменений как новый эффективный метод создания исходных селекционных форм растений».

Литература

1. *Bird A.* DNA methylation patterns and epigenetic memory // *Genes and Development*. - 2002. - vol. 16, № 1. - P. 6-21.
2. *Jones P.A.* Alternating gene expression with 5-azacytidine // *Cell*. - 1985. - vol. 40. - P. 485–486.
3. *Jablonka E., Lamb M.J.* The inheritance of acquired epigenetic variations // *J. Theor. Biol.* - 1989. - vol. 139. - P. 69–83.
4. *Малецкая Е.И., Юданова С.С., Малецкий С.И.* Влияние эпимутагена 5-азациитидина на строение метамеров цветоносных побегов у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // *Генетика*. - 2006. - т. 42, № 7. - С. 895–904.
5. *Maletskaya E.I., Yudanov S.S., Maletskii S.I.* Epigenetic and epiplastome variability in apozygotic progenies of Sugar beet with 5-azacytidine // *Sugar Tech*. - 2002. - vol. 4, № 1-2. - P. 52–56.

6. Махмудова К.Х., Богданова Е.Д., Левитес Е.В. Способ индукции эпигенетической изменчивости у мягкой пшеницы. Патент на изобретение №2322801. Оpubл. Бюл. № 12. 27.04.2008.
7. Levites E.V. Sugarbeet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech. - 2005. - vol. 7, № 2-3. - P. 67–70.
8. Levites E.V. Marker enzyme phenotype ratios in agamospermous sugarbeet progenies as a demonstration of multidimensional encoding of inherited information in plants // on-line: <http://arxiv.org/abs/q-bio/0701027>
9. Weber E. Grundriss der biologischen statistic. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. - 1986. -652 p.

Резюме

Выявлено влияние неионного детергента Тритон X-100 на морфо-физиологические признаки у сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.). Полученные результаты и известные свойства Тритона X-100 как детергента свидетельствуют о роли взаимодействия хромосом с ядерной мембраной и ядерным матриксом в функционировании генома, а также позволяют рассматривать Тритон X-100 как эпимутаген нового типа. Появление индуцированных изменений у сахарной свеклы можно рассматривать как результат воздействия Тритона X-100 на многомерную систему кодирования наследственной информации.

The effect of non-ion detergent Triton X-100 was revealed in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) morpho-physiological traits. The obtained results a Triton X-100 properties, known as a detergent, are indicative of chromosome-nuclear membrane and -nuclear matrix interaction in genome functioning, and they also allow us to consider Triton X-100 as a new type epimutagen. Appearance of induced variabilities in sugar beet can be considered as a result of Triton X-100 effect on the multi-dimensional coding system of inherited information.

КРИНИЦЫНА А.А.^{1,2}, СПЕРАНСКАЯ А.С.², ПОЛЬТРОНИЕРИ П.³, САНТИНО А.³, ШЕВЕЛЕВ А.Б.⁴

¹ ГНУ Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН

Россия, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, e-mail: krinitsina@mail.ru

² Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, д1, стр. 12

³ National Research Council of Italy, ISPA-CNR
Italy, 73100, Lecce, via Monteroni

⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Россия, 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2

ГЕНЫ БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ ТИПА КУНИТЦА ГРУППЫ А (PKPI-A) ИЗ *SOLANUM BREVIDENS* PHIL

Ингибиторы, принадлежащие к семейству соевого ингибитора трипсина Кунитца (PKPI), широко распространены среди растений различных систематических групп. Белки этого семейства в большом количестве обнаруживают в семенах и запасующих органах растений, а также в механически поврежденных или пораженных фитопатогенами органах растений. При этом PKPI участвуют в защите растений от патогенных микроорганизмов и насекомых вредителей, поскольку могут воздействовать на секретируемые экстрацеллюлярные протеиназы фитопатогенов, разрушающие растительную ткань и на протеиназы желудочно-кишечного тракта насекомых (Мосолов, Валуева, 2005). Поэтому

изучение белков данного семейства, а так же генов, которые их кодируют, может помочь в создании новых культиваров, обладающих повышенной устойчивостью к вредителям и заболеваниям.

Установлено, что в картофеле белки РКРІ представлены многочисленными изоформами, среди которых на основании сходства N- и C-концевых аминокислотных последовательностей выделяют, как минимум, пять различных структурных групп, из которых три (РКРІ-А, РКРІ-В и РКРІ-С) относительно хорошо изучены (Ishikawa et al., 1994; Heibges et al., 2003b; Vauw et al., 2006). Представители первой группы этого семейства (РКРІ-А) способны подавлять активность сериновых протеиназ клана химотрипсина (трипсина, химотрипсина и эластазы из лейкоцитов человека) и ингибировать аспартатные протеиназы, в частности катепсин D (Ishikawa et al., 1994).

При создании современных сортов культурного картофеля (*S. tuberosum* L.) с целью формирования у культиваров особых свойств, связанных с устойчивостью к вредителям и болезням, в качестве генетического материала привлекаются как другие культивируемые, так и дикие некультивируемые виды картофеля (Симаков и др, 2005). Так в последние годы в селекции картофеля для создания новых сортов методом соматической гибридизации используется дикорастущий не клубненосный вид *Solanum brevidens* Phil. (Solomon-Blackburn, Barker, 2001).

Гены ингибиторов *PKPI-A* в геноме картофеля представлены множественными копиями и отличаются высоким уровнем полиморфизма, который составляет 88 — 99%, тогда как данных о строении и полиморфизме этих генов в геноме *S. brevidens* до настоящего времени практически нет, что приводит к невозможности оценить перспективность использования именно этих генов для получения новых качеств сортов, связанных с устойчивостью к фитопатогенным организмам.

Целью данной работы являлось реконструировать нуклеотидные последовательности кодирующей области генов ингибиторов протеиназ типа Кунитца группы А из генома дикорастущего вида *S. brevidens* и провести сравнительный анализ последовательностей реконструированных генов *S. brevidens*, а также известных по данным литературы последовательностей РКРІ из культивируемых сортов картофеля.

Материалы и методы.

В качестве источника геномной ДНК использовали двухнедельные зеленые побеги *S. brevidens* с растений, полученных из коллекции Института картофелеводства НАН (Беларусь), и выращиваемых в культуре *in vitro*. Выделение тотальной ДНК растений производилось по адаптированному методу, описанному в работе (Ежова и др., 2002).

Для амплификации генов, кодирующих РКРІ-А, из генома *S. brevidens*, использовали праймеры РКРІ-А1 и РКРІ-А2 («Синтол», Россия), разработанные на основании уже известных последовательностей этой группы генов и соответствующие N и C концам зрелого белка, соответственно. Т отжига праймеров составляла 56°C в 5 предциклах и 60°C в 25 основных циклах. ДНК матрицу вносили в смесь в концентрации 0,01 мкг/мкл. Смесь ампликонов размером около 600-650 п.н. клонировали в вектор pGEM-T («Promega», США) согласно инструкции производителя. Наличие вставки определяли методом рестрикционного анализа и ПЦР с теми же праймерами при таких же условиях.

Полученные последовательности были просеквенированы и проанализированы при помощи программ MEGA3.1 и BioEdit

Результаты и обсуждение

В результате было отобрано 35 клонов, несущих плазмиды со вставками ожидаемого размера, получивших название *SbrAA-* с различными порядковыми номерами. Установленные секвенированием последовательности нуклеотидов были проанализированы методом кластерного анализа, который показал, что 33 из 35 клонов входят в состав шести кластеров, при этом число клонов, входящих в состав отдельных кластеров варьировало от 2 до 15. Каждый отдельный кластер включал копии индивидуальных генов, отличающиеся отдельными артефактными нуклеотидными

заменами, предположительно, образовавшимися процессе амплификации. Сравнение и индивидуальный анализ замен последовательностей, входящих в состав выделенных кластеров позволил провести реконструкцию последовательностей шести генов группы А, которые были названы *Sbr-KPI-A1*, *Sbr-KPI-A2*, *Sbr-KPI-A3*, *Sbr-KPI-A4*, *Sbr-KPI-A5* и *Sbr-KPI-A6*.

Один клон, *Sbr-AA-7*, содержал гибридную последовательность, состоящую из фрагментов генов *Sbr-KPI-A3* и *Sbr-KPI-A4*, и, вероятно, являлся артефактом ПЦР. Последовательности клонов *Sbr-AA-6*, *Sbr-AA-9*, *Sbr-AA-11* и *Sbr-AA-30* отличались от прочих специфическими нуклеотидными заменами и, скорее всего, являлись копиями еще, как минимум, двух генов группы А. Структура этих генов не может быть реконструирована на основании имеющихся данных.

Сравнение последовательностей нуклеотидов реконструированных генов *Sbr-KPI-A* и генов, представленных в базе данных NCBI, показало, что некоторые из генов *S. brevidens* полностью идентичны генам из картофеля. Так, например, последовательности *Sbr-KPI-A4* полностью совпала с последовательностями генов *PKPI-A3* из *S. tuberosum* сорта Истринский, кДНК *134F08* [DQ168325] и *033A10* [DQ168316] из сорта Kuras (Bauw et al., 2006). Последовательность гена *Sbr-KPI-A2* практически полностью (на 99%) совпадала с последовательностью кДНК *p749* [M96257] из сорта Superior (Hannapel, 1993), а - *Sbr-KPI-A5* была на 98% гомологична *PKPI-A3* из *S. tuberosum* сорта Истринский, *134F08* [DQ168325], *033A10* [DQ168316], *134F08* [DQ168325], *033A10* [DQ168316], *033D02* [DQ16831], *073D02* [DQ207847] из сорта Kuras (Bauw et al., 2006); *PIE9* [AF490593] и *P2B4* [AY083349] из сорта Provita (Heibges et al., 2003a). Последовательности генов *Sbr-KPI-A6* оказалась сходной на 98% с *PKPI-A5* из сорта Истринский и кДНК *CDI* [AF283464] из *Solanum nigrum* L. (Girard et al., неопубл., NCBI).

В тоже время последовательности двух генов *S. brevidens* характеризовались меньшим сходством с известными последовательностями. Так, ген *Sbr-KPI-A1* содержал 97% остатков, идентичных *p749* [M96257] из сорта Superior (Hannapel, 1993). Последовательности генов *Sbr-KPI-A3* и *p749* [M96257] из сорта Superior (Hannapel, 1993), *150D02* [DQ168327], *134F08* [DQ168325], *048E06* [DQ168318], *033A10* [DQ168316], *002D05* [DQ168311] из сорта Kuras (Bauw et al., 2006) совпадали только на 96%. Такие отличия могут приводить к изменениям аминокислотной последовательности, что, в свою очередь приводит к изменениям активности и специфичности ингибитора. Привнесение в геном культивируемых сортов картофеля этих генов может привести к появлению новых признаков, связанных с устойчивостью культивара к фитопатогенным организмам.

Выводы

В геноме дикого не клубненосного вида *Solanum brevidens* Phil. имеется как минимум 6 генов, кодирующих ингибиторы протеаз типа Кунитца группы А (*PKPI-A*), четыре из которых (*PKPI-A2*; *PKPI-A4*; *PKPI-A5* и *PKPI-A6*) практически полностью идентичны генам *PKPI-A* культурного картофеля, тогда как два (*PKPI-A1* и *PKPI-A3*) имеют сходство на 97% и 96%, соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ежова Т.А., Солдатова О.П., Пенин А.А., Шестаков С.В. Молекулярно-генетическое картирование генома растений. – Москва. – 2002. – 70 с.
2. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений // Прикл. биох. микробиол. - 2005. - том 41, №3. – стр. 261-282.
3. Симаков Е.А., Анисимов Б.В., Коришунов А.В., Дуркин М.Л. О концепции развития оригинального, элитного и репродукционного семеноводства картофеля в России // Картофель и овощи. – 2005. - №2. – стр. 2-5.

4. Bauw G., Nielsen H.V., Emmersen J., Nielsen K.L., Jorgensen M., Welinder K.G. Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. // FEBS J. - 2006. - vol. 273, №15. - p. 3569-84.
5. Hannapel D.J. Differential Expression of Potato Tuber Protein Genes // Plant Physiol. – 1993. – vol.94, №3. – p. 919-925.
6. Heibges A, Glaczinski H, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C. Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) // Mol. Gen. Genomics. –2003b. – vol. 269. – p. 535-541.
7. Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt, C. Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) // Mol. Gen. Genomics. - 2003a. – vol. 269. – p. 526-534.
8. Ishikawa A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori T., Nakamura K. A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression // Plant Cell Physiol. – 1994. – vol. 35. – p. 303-312.
9. Solomon-Blackburn R.M., Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches // Heredity. – 2001. – vol. 86, №1. – p. 17 – 35.

Резюме

В геноме дикорастущего неклубненого вида *Solanum brevidens* Phil., имеющего высокую устойчивость к широкому спектру фитопатогенов обнаружено шесть генов, кодирующих ингибиторы протеаз типа Кунитца группы А (PKPI-A). Два из них – PKPI-A1 и PKPI-A3 могут быть потенциальным источником новых свойств сортов картофеля, связанных с повышенной устойчивостью к фитопатогенам.

Six new nucleotide sequences coding for Kunitz-type proteinase inhibitor group A genes (PKPI-A) obtained for *Solanum brevidens* Phil, a species that is closely related to cultivated potato, forms no tubers, is highly resistant to phytopathogens, and is often employed in potato breeding. Two of them (PKPI-A1 and PKPI-A3) can be sources of potato higher resistant to phytopathogens.

**ПРОКОПІВ Т. М.¹, ФАЮРА Л.Р.¹, ПРОТЧЕНКО О.В.¹, ФЕДОРОВИЧ Д.В.¹,
БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р.¹, СИБІРНИЙ А.А.^{1,2}**

¹Інститут біології клітини НАН України, Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова 14/16. ²Rzeszów Universit, Poland, Rzeszów 35-601, Ćwiklińskiej 2.
e-mail: tetyanapropkopiv@gmail.com

ВПЛИВ ІОНІВ ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ НА ФЛАВІНОГЕНЕЗ І АСИМІЛЯЦІЮ ЗАЛІЗА ДРІЖДЖАМИ *PICHTIA GUILLIERMONDII*

Іони металів із змінною валентністю є необхідними для підтримання клітинного гомеостазу. Їх нестача, так само як і підвищений вміст, можуть бути токсичними для клітини, бо приводять до пошкодження різних ланок метаболізму. Деякі мікроорганізми здатні акумулювати іони металів у концентраціях, які значно перевищують їх вміст в оточуючому середовищі, що є дуже важливо для розв'язання багатьох екологічних проблем. Механізми токсичності металів, так само як і потенційні мішені їх дії, вивчені недостатньо. Відомо, що ряд видів дріжджів за умов недостатнього забезпечення залізом активує біосинтез рибофлавіну (РФ). Типовим представником цієї групи є дріжджі *Pichia guilliermondii*, у яких надсинтез РФ виникає також при вирощуванні у середовищах, що містять 0,9 мМ хлорид кобальту або 0,3 мМ біхромат калію [Boretsky et al., 2007;

Fedorovych et al., 2001]. Отримано мутанти *P. guilliermondii*, здатні до надсинтезу РФ при оптимальному для росту забезпеченні залізом - *rib80*, *rib81*, *hit1*, *red1-6*, які одночасно мають пошкоджену регуляцію метаболізму заліза і нагромаджують в клітинах підвищені кількості цього металу [Сибірний і співавт., 2006]. Недавно було ідентифіковано транскрипційний активатор SEF1p, що контролює біосинтез РФ у *Candida famata* та *P. guilliermondii* [Dmytruk et al, 2006; Boretsky et al., 2008]. Делеція гена *SEF1* приводить до втрати здатності до надсинтезу РФ. Несподівано виявилось, що, на відміну від $\Delta sef1$ штамів *P. guilliermondii*, подвійні мутанти $\Delta sef1hit1$ зберігають здатність до надсинтезу РФ при вирощуванні у середовищі із 0,9 мМ хлоридом кобальту [В.Борецький]. Це спостереження свідчить про наявність додаткового механізму активації біосинтезу РФ у *P. guilliermondii*.

У даній роботі наведено результати, які вказують, що зміни флавіногенної активності та асиміляції заліза у штама дикого типу та в мутантів з пошкодженою регуляцією біосинтезу РФ *rib80*, *rib81*, *hit1*, *red6* дріжджів *P. guilliermondii* можуть бути викликані не тільки дефіцитом заліза, але й іонами деяких перехідних металів. Отримані результати свідчать на користь припущення, що флавіногенез та поглинання заліза у цього виду дріжджів регулюються у відповідності до окисдативного статусу клітини і, можливо, є елементами антиоксидантного захисту клітини.

Матеріали і методи

У роботі використовували *P. guilliermondii* штам дикого типу ATCC 9058 та мутанти *rib80*, *rib81*, *hit1*, *red6* з порушеною регуляцією біосинтезу РФ [Сибірний і співавт., 2006]. Дріжджі вирощували у середовищі Беркгольдера. Склад середовища та умови культивування описано раніше [Шавловский и соавт., 1978]. Біомасу дріжджів визначали на спектрометрі Helios Gamma UVG-100105 при 600 нм. Концентрацію рибофлавіну визначали флуориметрично на приладі ЭФ-3М, використовуючи як стандарт синтетичний рибофлавін.

Вміст заліза у клітинах вимірювали за допомогою α, α' -дипіридилу [Ковалев и соавт., 1984]. Концентрацію комплексу Fe^{2+} -дипіридил вимірювали на спектрометрі Helios Gamma UVG-100105 при 522 нм. Активність супероксиддисмутази (СОД) в поліакриламідному гелі визначали як описано [Culotta et al., 1997].

Результати і обговорення

Досліджували вплив іонів металів Co(II), Cd(II), Cu(II), Zn(II) на ріст, флавіногенну активність та акумуляцію заліза клітинами дріжджів *P. guilliermondii* дикого типу ATCC 9058 та мутантів з порушеною регуляцією біосинтезу РФ (*rib80*, *rib81*, *hit1*, *red6*), здатних до надсинтезу РФ за умов оптимального для росту вмісту заліза в середовищі (3,6 мМ). Ріст всіх досліджуваних мутантів значно сильніше пригнічувався іонами металів зі змінною валентністю, ніж ріст штаму дикого типу. Найбільш чутливим до дії металів, а особливо до Cd(II) та Cu(II), виявився штам, що містить мутацію *hit1* (рис1).

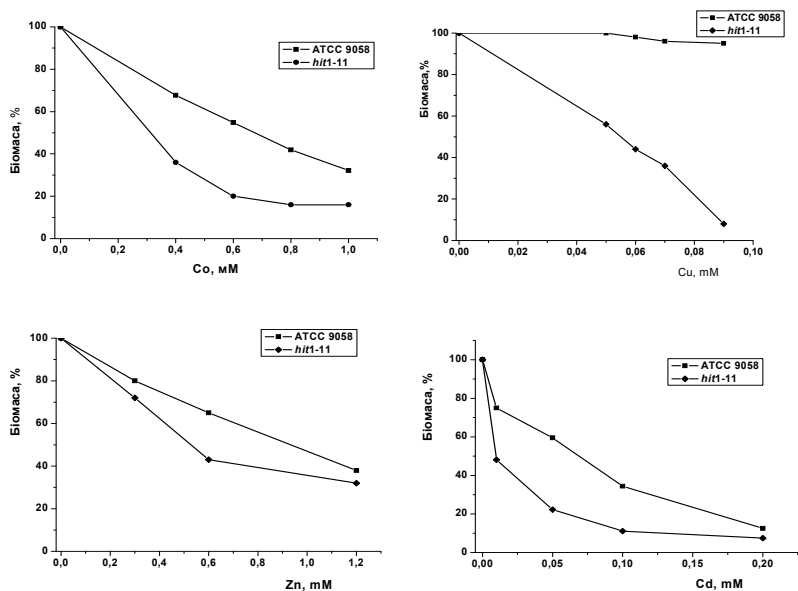


Рис.1 Вплив різних концентрацій іонів Co(II), Cu(II), Zn (II) і Cd(II) на ріст мутанта *hit1*

Зміни флавіногенної активності та асиміляції заліза під впливом іонів перехідних металів вивчали при концентраціях, які на 50% пригнічували ріст клітин дикого типу АТСС 9058 при інкубації клітин з логарифмічної фази росту у рідкому середовищі (1 мг/1 мл) протягом 12-24 годин. При інкубації дріжджів у середовищі, що містило Co (0,9 мМ), продуктивність флавіногенезу зростала у штама дикого типу АТСС 9058 у 5-6 разів, а у мутантів *rib80*, *rib81* та *hit1* – у 5-10 разів (табл.). Дуже сильне зростання продукції РФ (більше як у 20 разів) спостерігалось у найслабшого за флавіногенною активністю мутанта *red6*. Внесення в середовище 1 мМ CdCl₂ не викликало зростання продуктивності біосинтезу РФ у жодного з досліджуваних штамів, проте призводило до екскреції клітинами неідентифікованих сполук з голубою флюоресценцією в ультрафіолеті, можливо, похідних інтермедіатів флавіногенезу. Вплив іонів цинку (0,6 мМ) на продукцію флавінів був значно слабшим, ніж інших металів, а флавіногенна активність штаму *red6* за наявності цинку не змінювалась зовсім. Іони міді незначно змінювали флавіногенну активність досліджуваних штамів (дані не приведені).

Мутанти *P. guilliermondii* з пошкодженою регуляцією біосинтезу РФ характеризуються підвищеним вмістом заліза в клітинах (див. Сибірний і співав., 2006). При інкубації клітин мутантів *rib80*, *rib81* та *hit1* та *red6* в присутності іонів перехідних металів вміст заліза в клітинах додатково зростає в 1,2-2,3 рази. Особливо сильне зростання вмісту заліза в клітинах спостерігалось у мутантів *rib80* та *hit1*, вирощених за наявності в середовищі іонів Co(II). Подібне підвищення вмісту заліза в клітинах з одночасним посиленням синтезу РФ описане у *P. guilliermondii* при дії хромату [Fedorovych et al., 2001]. У нефлавіногенних дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* показано, що за наявності високих концентрацій кобальту транскрипційний активатор Aft1p переміщується в ядро і стимулює експресію генів, задіяних у транспорті заліза [Stadler, Schweyen, 2002].

Таблиця

Продуктивність флавіногенезу штамів дикого типу і мутантів дріжджів *P. guilliermondii*, інкубованих 12 год з/без 0,9 мМ CoCl₂ і 0,6 мМ ZnSO₄ (мкг РФ/ мг клітин)

Штам	АТСС9058 M±m	<i>rib80</i> M±m	<i>rib81</i> M±m	<i>hit1</i> M±m	<i>red6</i> M±m
Контроль	0.11±0.008	2.48±0.21	9.56±0.57	1.69±0.13	0.21±0.001
+Co	0.63±0.044	18.1±1.1	48.86±3.4	15.97±0.9	3.9±0.027
+Zn	0.19±0.015	7.5±0.52	15.1±0.9	5.01±0.4	0.22±0.0017

Про зміни в асиміляції заліза клітинами мутантів свідчить і зростання фериредуктазної активності клітин мутантів при інкубації в середовищі, що містить іони Co(II) і Cu(II). Раніше було показано, що клітини мутантів *rib80*, *rib81*, *hit1*, *red6* здатні з високою швидкістю відновлювати Fe³⁺ до Fe²⁺ [Бабяк і співав., 2001]. В присутності іонів Cd(II) або Zn(II) фериредуктазна активність клітин всіх мутантів знижувалась. Очевидно, за цих умов зростання вмісту заліза в клітинах зумовлене активацією систем поглинання цього металу, в які не залучена фериредуктаза.

Показано, що мутанти *rib80*, *hit1*, та *rib81* знаходяться в стані оксидативного стресу [Protchenko et al., 2000]. В культурах мутантів, інкубованих у середовищі що містило 0,9 мМ Co(II), 0,1 мМ Cd(II), 0,6 мМ Zn(II) ми спостерігали додаткове підвищення рівня малонового діальдегіду, який є одним із маркерів, які відображають оксидативний стан клітини.

При вирощуванні штаму дикого типу за умов дефіциту заліза або в середовищі, що містило 0.9 мМ Со(II), спостерігали зростання продукції РФ та вмісту заліза в клітинах, що супроводжувалось пригніченням активності двох та однієї СОД, відповідно (рис.2).

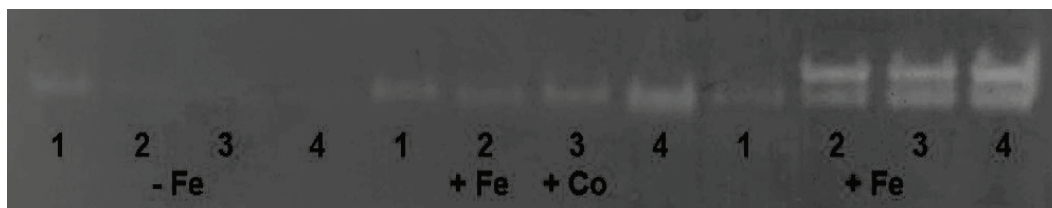


Рис. 2. Вплив умов вирощування на активність СОД в екстрактах клітин штаму дикого типу *P. guilliermondii*.

1,2,3,4-екстракти клітин, вирощених до ранньої логарифмічної, середини логарифмічної, пізньої логарифмічної та стаціонарної фаз росту, відповідно. Нанесено по 40 мкг білка в кожену пробу.

Хоча молекулярні механізми контролю біосинтезу рибофлавіну, асиміляції заліза і відповіді на оксидативний стрес у *P. guilliermondii* невідомі, можна стверджувати про спільність деяких елементів, задіяних в регуляції цих процесів.

Література

1. Бабяк Л.Я., Протченко О.В., Федорович Д.В. Координована регуляція біосинтезу вітаміну В₂ (рибофлавіну) та асиміляції заліза у дріжджів // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. - Київ: Логос. - 2001. - Т.1. – С. 457-461.
2. Сибірний А.А., Федорович Д.В., Борецький Ю.Р., Вороновський А.Я. Мікробний синтез флавінів. – К.: Наукова думка, 2006. – 192 с.
3. Ковалев Л.М., Круликовская Л.И., Якова В.М., Яшина О.Т. Определение железа в дрожжах-сахаромицетах дипиридиловым методом // Научн. докл. высш. школы. - 1984. – Т.12. - С.96-100.
4. Шавловский Г.М., Жарова В.П., Щелокова И.Ф., Трач В.М., Сибірний А.А., Кушминская Г.П. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondii* // Прикл. биохимия и микробиология. - 1978. - Т.14, №2. - С. 184-189.
5. Boretsky Yu. R., Protchenko O. V., Prokopiv T. M., Mukalov I. O., Fedorovych D. V., Sibirny A. A. Mutations affecting regulation of riboflavin synthesis and iron assimilation also cause oxidative stress in the yeast *Pichia guilliermondii* // J. Basic Microbiol.- 2007. – Vol. 47, №5. – P. 371-377.
6. Boretsky V. Y., Futei K. O., Fayura L. R., Boretsky Y. R., Kapustyak K. Y., Ishchuk O. P., Sibirny A. A. Influence of $\Delta sef1$ mutation on riboflavin biosynthesis in the yeast *Pichia guilliermondii*. // 12-th International Congress on Yeasts, Book of Abstracts, Kyiv, 2008. – P. 317.
7. Culotta V. C., Klomp W. J., Strain J., Casareno L.B., Krems B., Gitlin J.D. The copper chaperone for superoxide dismutase. J. Biol. Chemistry.-1997.-Vol. 272, №38.-P.23469-23472.
8. Dmytruk KV, Voronovsky AY, Sibirny AA. Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. Curr. Genet. - 2006.- Vol.50, №3. – P.183–191.
9. Fedorovych D., Krzeminska H., Babjak L., Kaszycki P., Koloczek H. Hexavalent chromium stimulation of riboflavin synthesis in flavinogenic yeast // BioMetals.-2001.-Vol.13.№1.-P.1-9.
10. Protchenko O.V., Boretsky Y.R., Romaniuk T.M., Fedorovych D.V. Oversynthesis of riboflavin by yeast *Pichia guilliermondii* in response to oxidative stress //Укр.біохім.журнал.-2000.-Т.72,№2.-С.19-23.

11. Stadler J.A., Schweyen R.J. The yeast iron regulon is induced upon cobalt stress and crucial for cobalt tolerance // J. Biol. Chemistry.-2002.-Vol. 277, №42.-P.39649-39654.

Резюме

Исследовано влияние ионов переходных металлов на флавиногенез и ассимиляцию железа мутантами *P. guilliermondii* с нарушенной регуляцией биосинтеза рибофлавина. Показано, что стимуляция этих процессов ионами Co(II), Zn(II) и Cd(II) сопровождается усилением оксидативного стресса. Обсуждаются механизмы общей регуляции биосинтеза рибофлавина, метаболизма железа и реакции на оксидативный стресс.

Досліджено вплив іонів перехідних металів на флавіногенез й асиміляцію заліза мутантами *P. guilliermondii* з пошкодженою регуляцією біосинтезу рибофлавіну. Встановлено, що стимуляція обох процесів іонами Co(II), Zn(II) і Cd(II) супроводжується поглибленням оксидативного стресу. Обговорюються механізми спільної регуляції біосинтезу рибофлавіну, метаболізму заліза й відповіді на оксидативний стрес.

Influence of transition metal ions on flavinogenesis and iron assimilation by *P. guilliermondii* mutants defective in regulation of both processes has been studied. It was found that stimulation of flavinogenesis and iron acquisition by transition ions is accompanied with an enhancement of oxidative stress. Mechanisms of joint regulation of riboflavin biosynthesis, iron assimilation and oxidative stress response by *P. guilliermondii* are discussed.

СОКОЛОВА Е.И.

Луганский национальный аграрный университет,
Украина, 91008, г. Луганск, Луганский национальный аграрный университет,
e-mail: s-e-i@mail.ru

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ *BP* И *TFL1* *ARABIDOPSIS THALIANA* ПО ПРИЗНАКУ «ЧИСЛО ЛИСТЬЕВ НА СТЕБЛЕ» В РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Взаимодействие генов в количественной генетике вообще и количественной генетике растений в частности мало изучено. Влияют ли экологические условия на характер совместного действия генов, оставалось неизвестным. Целью данной работы было изучить характер совместного действия генов *BP* и *TFL1* у арабидопсиса Таля (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.) по признаку «число листьев на стебле» в разных экологических условиях.

Арабидопсис Таля (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) – небольшое самоопыляющееся растение семейства Капустные. Арабидопсис является идеальным генетическим объектом, так как наряду с коротким жизненным циклом и малым числом хромосом ($2n=10$), обладает высокой плодовитостью и миниатюрностью, которая позволяет выращивать это растение в лабораторных условиях круглый год. Арабидопсис стал первым организмом, у которого полностью секвенирован геном.

Материалы и методы

A. thaliana выращивался в лаборатории светокультуры Луганского национального аграрного университета в почвенной культуре по стандартной методике [1]. Количество листьев на стебле учитывали у каждого растения отдельно во время раскрытия первого бутона.

Исходной линией была гомозиготная линия арабидопсиса *Landsberg erecta* (*Ler*). На ее основе были получены мутантные чистые линии *bp-1* и *tfl1-2*, краткая характеристика которых приведена в табл. 1. Изучавшиеся линии имеют четкие морфологические отличия от исходной линии (табл. 1).

Характеристика линий арабидопсиса

Локус (аллель)	Название	Фенотип
<i>Ler (er)</i>	<i>Landsberg erecta (erecta)</i>	Растение зеленого цвета, лепестки белого цвета, длинные цветоножки, плоды заостренные, направлены косо вверх
<i>bp-1</i>	<i>Brevipedicullus</i>	Короткие цветоножки. Плоды повернуты вниз
<i>tfl1-2</i>	<i>Terminal flower</i>	Ось соцветия рано заканчивается цветком, укороченное соцветие

Мономутантные линии *bp-1* и *tfl1-2* отличаются от *Ler* только одним геном (*BP* и *TFL1* соответственно), поэтому все отличия между линиями *Ler* и *bp-1* можно приписывать действию гена *BP*. Точно также отличия между линиями *Ler* и *tfl1-2* обусловлены влиянием гена *TFL1*. Для изучения совместного действия генов *BP* и *TFL1* необходим двойной рецессив *bp-1,tfl1-2*, который и был получен в нашей лаборатории [2]. Двойной рецессив *bp-1,tfl1-2* сочетает в себе оба признака – повернутые вниз стручки и укороченное соцветие.

Таким образом, мы располагали четырьмя линиями, которые представляют собой четыре генотипа – *BP-1BP-1TFL1-2TFL1-2* (исходная линия *Ler*); *bp-1bp-1TFL1-2TFL1-2* (линия *bp-1*); *BP-1BP-1tfl1-2tfl1-2* (линия *tfl1-2*); *bp-1bp-1tfl1-2-tfl1-2*. Растения всех четырех линий выращивались в одном ящике. Всего в ящике 196 посадочных мест, таким образом, высаживалось по 49 семян каждой линии. Растения в ящике размещались квадратным способом рендомизированно. Было проведено два опыта, отличающихся условиями выращивания – в одном продолжительность освещения составляла 24 часа, в другом – 12 часов.

Результаты и обсуждение

Ниже представлены результаты эксперимента с 24-часовым режимом освещения. Выживаемость растений была высокая, в результате мы располагали большими выборками (табл. 2). Коэффициент вариации, показывающий относительную изменчивость признака по всем линиям, был высоким (значительным, т.к. более 25%).

Таблица 2

Элементарные статистики гомозиготных линий *Ler*, *bp-1*, *tfl1-2* и *bp-1,tfl1-2* по признаку «число листьев на стебле» при круглосуточном освещении

Линии	Объем выборки	Среднее фенотипическое значение	Ошибка среднего значения	Дисперсия	Коэффициент вариации, %
<i>Ler</i>	49	2.09	0.11	0.58	36.55
<i>bp-1</i>	47	1.53	0.09	0.34	38.14
<i>tfl1-2</i>	49	1.72	0.10	0.47	40.08
<i>bp-1,tfl1-2</i>	45	2.07	0.17	1.34	55.94

Анализ эффектов замены аллелей *BP-1* на *bp-1* и *TFL1-2* на *tfl1-2* свидетельствует о том, что оба гена влияют на изученный признак, причем оба действуют в одном направлении; мутантные аллели *tfl1-2* и *bp-1* являются минус-аллелями, так как уменьшают число листьев на стебле (табл. 3).

Таблица 3

Эффекты замены аллелей *BP-1* на *bp-1* и *TFL1-2* на *tfl1-2* (круглосуточное освещение)

	Генотипы		Разность, шт.	Разность, %	t-критерий Стьюдента
	<i>TFL1-2TFL1-2</i>	<i>tfl1-2tfl1-2</i>			

Генотип <i>BP-1BP-1</i>	2.09±0.11	1.72±0.10	-0.37±0.15	-17.78	2.44*
Генотип <i>bp-1bp-1</i>	1.53±0.09	4.73±0.17	0.53±0.19	34.91	2.82**
Разность, шт.	-0.56±0.14	0.35±0.20			
Разность, %	-26.66	20.34			
t-критерий Стьюдента	3.94***	1.76			

Эпистатическое отклонение определялось по формуле [3]:

$i^{ab} = \overline{AABB} + \overline{aabb} - \overline{aaBB} - \overline{AAbb}$. Ошибка эпистатического отклонения:

$S_{i^{ab}} = \sqrt{s^2_{\overline{AABB}} + s^2_{\overline{aabb}} + s^2_{\overline{aaBB}} + s^2_{\overline{AAbb}}}$. Эпистатическое отклонение оказалось равным $i^{ab} = 0.91 \pm 0.25$ шт.

Достоверность эпистаза устанавливалась с использованием упрощенного t-критерия, равного частному от деления генетического параметра, взятого по модулю, на его ошибку репрезентативности $t = \frac{i^{ab}}{S_{i^{ab}}}$ [3]; $t = 0.91 / 0.25 = 3.69$.

Если значение t больше или равно двум, то параметр, как у нас, считается значимым. Знак i^{ab} указывает на направление эпистаза. В нашем случае имеет место положительный эпистаз.

Относительная оценка силы эпистаза (I) определялась по формуле $I = (i^{ab} / \overline{AABB}) \times 100\%$. $I = (0.91 / 2.09) \times 100\% = 43.4\%$. Итак, в данном эксперименте мы наблюдаем достоверный положительный эпистаз.

Параллельно с этим экспериментом в другом ящике выращивались растения с 12-часовым освещением. Для обоих экспериментов использовались семена с одного поколения, одновременно поставленные на проращивание и высаженные в один день.

Выживаемость и в этом эксперименте была высокая (табл. 4).

Таблица 4

Элементарные статистики гомозиготных линий *Ler*, *bp-1*, *tfl1-2* и *bp-1,tfl1-2* по признаку «число листьев на стебле» (освещение в течение 12 часов)

Линии	Объем выборки	Среднее фенотипическое значение	Ошибка среднего значения	Дисперсия	Коэффициент вариации, %
<i>Ler</i>	49	2.71	0.09	0.42	23.78
<i>bp-1</i>	47	2.89	0.13	0.75	29.91
<i>tfl1-2</i>	49	2.53	0.09	0.42	25.64
<i>bp-1,tfl1-2</i>	45	2.07	0.12	0.61	37.76

Эффекты замены аллелей *BP-1* на *bp-1* и *TFL1-2* на *tfl1-2* не достоверно изменяют число листьев на стебле (табл. 5).

Таблица 5

Эффекты замены аллелей *BP-1* на *bp-1* и *TFL1-2* на *tfl1-2* (12-часовое освещение)

	Генотипы		Разность, шт.	Разность, %	t-критерий Стьюдента
	<i>TFL1-2TFL1-2</i>	<i>tfl1-2tfl1-2</i>			
Генотип <i>BP-1BP-1</i>	2.71±0.09	2.53±0.09	-0.18±0.13	-6.77	1.40
Генотип <i>bp-1bp-1</i>	2.89±0.13	2.07±0.12	-0.83±0.17	-28.58	4.81***

Разность, шт.	0.18±0.16	-0.46±0.15			
Разность, %	6.61	-18.33			
t-критерий Стьюдента	1.15	3.14**			

Оценка взаимодействия генов в данном случае дала следующие результаты: $i^{ab} = -2.87 \pm 0.57$ шт. при $t=2.98$. Эпистатическое отклонение достоверно, однако, оно имеет знак «-» (при 24-часовом дне наблюдался положительный эпистаз).

Налицо изменение направления совместного действия генов – в одних условиях наблюдается положительное взаимодействие генов, в других – отрицательное взаимодействие.

По результатам работы были сделаны следующие **выводы**:

1. При выращивании в условиях круглосуточного освещения между генами *BP* и *TFL1* наблюдается положительный эпистаз.

2. При выращивании гомозиготных линий арабидопсиса в условиях 12-часового освещения между генами *BP* и *TFL1* наблюдается отрицательный эпистаз.

3. В разных экологических условиях может происходить изменение направления совместного действия генов.

Литература

1. Соколов І.Д., Шеліхов П.В., Соколова Т.І., Наумов С.Ю., Сич О.І., Сігідіненко Л.І. Генетика. Практикум: Навч. посібник для студентів вищих навчальних закладів. – 4-е вид., виправлене та доповнено – К.: Арістей, 2003. – 176 с.
2. Сігідіненко Л.І. Створення нових ліній арабідопсису (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), що марковані мутантними генами // Автореф. дис. ... канд. біол. наук. К., 2008. – 20 с.
3. Соколова Е.И. Новый метод оценки эпистатического взаимодействия генов в количественной генетике растений и его сравнение с другими методами // Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів. Т. 5. № 1-2, 2007, С. 77-84.

Резюме

Анализ совместного действия генов *Arabidopsis thaliana BP* и *TFL1* по признаку «число листьев на стебле» показал, что при выращивании в условиях круглосуточного освещения между генами *BP* и *TFL1* наблюдается положительный эпистаз; в условиях 12-часового освещения – отрицательный эпистаз. Таким образом, в разных экологических условиях может происходить изменение направления совместного действия генов.

Аналіз сумісної дії генів *Arabidopsis thaliana BP* і *TFL1* за ознакою «число листя на стеблі» показав, що при вирощуванні в умовах цілодобового освітлення між генами *BP* і *TFL1* спостерігається позитивний епістаз; в умовах 12-годинного освітлення – негативний епістаз. Таким чином, в різних екологічних умовах може відбуватися зміна напрямку сумісної дії генів.

The analysis of joint action of *Arabidopsis thaliana BP* and *TFL1* genes on the basis “number of leaves on a stem” has indicated that positive epistasis is observed between *BP* and *TFL1* genes during cultivation on the condition of twenty-four hour lighting; negative epistasis is observed on the condition of twelve-hour lighting. Thus, change of direction of genes’ joint action may be the result of different ecological conditions.

ТЕХНОЛОГІЇ *IN VITRO*, ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

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

РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* ОХРАНЯЕМОГО ВИДА *BELLEVALIA SARMATICA* (PALL. EX GEORGI) WORONOW (HYACINTHACEAE)

Современная биотехнология предоставляют широкий спектр практических подходов для сохранения биоразнообразия растений, что особенно актуально по отношению к видам, находящимся под угрозой исчезновения и занесённых в реестры охраняемых видов в различных регионах мира. В основе создания технологий сохранения растительного материала с использованием методов культуры *in vitro* лежит возможность массового размножения растений в асептической культуре с последующим переносом регенерантов в условия открытого грунта. Основные принципы размножения растений с помощью методов культуры *in vitro* разработаны достаточно хорошо [1, 2], однако работа с каждым новым объектом требует совершенствования методик (подбор оптимального типа эксплантов, состава питательных сред, условий культивирования и т.п.).

Банк зародышевой плазмы мировой флоры Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины содержит ряд охраняемых видов растений, в том числе представителей семейства Hyacinthaceae [3]. Вид *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow, который относят, по разным классификациям, к семействам Liliaceae или Hyacinthaceae – степное растение, прежде широко распространённое. В настоящее время встречается редко, занесено в списки региональной охраны ряда южных областей Украины, а также в Красную книгу Российской Федерации. Актуальность разработки методов культивирования *B.sarmatica in vitro* связана не только с охраняемым статусом этого растения, но и с тем, что это перспективный декоративный вид для интродукции и получения новых форм для цветоводства. В связи с этим целью работы было изучение возможностей введения *B.sarmatica* в асептическую культуру и разработка эффективных методов размножения *in vitro*.

Материалы и методы

Поверхностная стерилизация семян. В работе использовали семена *B.sarmatica* из банка семян мировой флоры ИКБГИ. Поверхностную стерилизацию семян проводили следующим образом: обработка 70% этанолом в течение 1 мин, далее наполовину разбавленным водой коммерческим препаратом "Белизна" (10 мин) с последующей трёхкратной промывкой стерильной дистиллированной водой. После этого семена подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге и переносили в чашки Петри на безгормональную среду Мурасиге-Скуга (MS) с вдвое уменьшенным содержанием макросолей и сахарозы. Чашки с семенами инкубировали в условиях культуральной комнаты при 16-часовом фотопериоде и температуре 25°C.

Индукция регенерации *in vitro*. Базальные части сформировавшихся луковиц *B.sarmatica* были использованы как экспланты при отработке методов размножения *in vitro*. Экспланты нарезали на фрагменты величиной около 5 мм и культивировали на средах различного минерального состава (MS, среда Гамборга B₅) с бензиламинопурином (БАП) в концентрациях 0,2 и 1 мг/л при 25°C и 16-часовом фотопериоде. Субкультивирование на свежие среды проводили раз в месяц. Сформировавшиеся адвентивные побеги переносили для дальнейшего развития на безгормональную среду B₅ и выращивали в тех же условиях.

Результаты и обсуждение

Прорастание семян началось в течение месяца после поверхностной стерилизации, в итоге через три месяца культивирования проросло 6 семян из 13, использованных в эксперименте (46%). Каких-либо стратифицирующих обработок семян *B.sarmatica* применять не пришлось, в отличие от семян других представителей семейства Hyacinthaceae из нашей коллекции (*Hyacinthella*, *Hyacinthoides*, *Hyacinthus*, *Muscari*, *Ornithogalum*), для прорастания которых требовалась стратификация при 4°C в течение 3-6 месяцев в

зависимости от вида растений. Не исключено, однако, что применение дополнительной стратификации позволило бы увеличить эффективность прорастания семян бэльвалии.

Образовавшиеся проростки были перенесены на безгормональную среду MS. При выращивании в условиях 16-часового фотопериода на этой среде в течение более чем шести месяцев культивирования сформировались луковицы диаметром 7-10 мм, дальнейшее развитие которых приостанавливалось. Вместе с тем условием стабильного сохранения любого типа культуры *in vitro* (культуры асептических растений, органов, дедифференцированных клеток) является активная мультимпликация растительного материала (увеличение числа побегов, накопление биомассы и т.п.). Известно, что вегетативное размножение представителей семейств лилейных и гиацинтовых происходит довольно медленно, в то время как использование методов культуры *in vitro* позволяет ускорить темпы размножения, а также даёт дополнительные возможности для улучшения природных и сортовых форм. Целый ряд публикаций свидетельствует о том, что представители однодольных, в частности, лилейных и гиацинтовых, достаточно легко размножаются в культуре *in vitro* из различного типа эксплантов путём как органогенеза, так и соматического эмбриогенеза [2]. Целью дальнейших экспериментов было индуцировать массовое размножение *B.sarmatica* из сформировавшихся *in vitro* луковиц.

Асептически растущие луковицы разрезали на фрагменты, и их базальные части помещали на питательную среду. Сравнивали влияние двух составов питательных сред (среды Мурасиге-Скуга MS и Гамборга B₅) и двух концентраций БАП (0,2 и 1 мг/л) на эффективность регенерации. В результате по ряду параметров среда B₅ была выбрана в качестве базовой для проведения дальнейшей работы. Как известно, содержание макрокомпонентов и сахарозы в ней меньше, чем в среде MS, что возможно, позитивно сказывалось на процессах регенерации бэльвалии. Эти данные согласуются с данными, полученными на некоторых других видах растений. Так, например, в работе [4] сообщается, что редуцированные уровни неорганических солей и сахарозы были важны для эффективной индукции регенерации у *Alstoemeria*. Питательные среды с меньшим содержанием сахарозы оказались более эффективными в отношении формирования адвентивных луковичек в чешуйках луковиц лилии [5].

В наших экспериментах индукция адвентивных почек *B.sarmatica* начиналась на срезах базальных частей луковиц в течение 1,5-2 месяцев культивирования в присутствии БАП в концентрации 1 мг/л (Рис. 1А). Как известно, для целого ряда видов растений адвентивное побегообразование можно индуцировать совместным действием ауксинов и цитокининов при преобладании цитокининов в питательной среде [1]. Для *B.sarmatica* оказалось достаточным использование только цитокинина. Аналогичные результаты получены нами и для других представителей семейства Нуасинтацевеae из нашей коллекции (данные не опубликованы). В то же время БАП оказывал на процесс регенерации двойное действие. На начальных стадиях культивирования БАП в концентрации 1 мг/л стимулировал индукцию адвентивных почек, однако тормозил их дальнейшее развитие. Поэтому после формирования адвентивных почек экспланты переносили на среды, в которых концентрацию БАП снижали до 0,2 мг/л, где происходило дальнейшее развитие растений (Рис. 1Б). По мере их роста образовавшиеся кластеры разделяли и переносили поодиночке на безгормональную среду B₅ для укоренения. Эффективность укоренения была близка к 100%. Каждая луковица формировала 2-3 листа и мощные корни длиной 10-15 см.

По данным литературы, на морфогенетическую активность в культуре *in vitro* влияет целый ряд факторов. Один из них – тип экспланта. Эффективным для представителей семейств лилейных и гиацинтовых оказалось использование чешуек луковиц, базальных частей листьев, сегментов цветоноса и некоторых других [2, 6, 7]. В работе [8] по разработке методов размножения *Allium sativum* в качестве эксплантов использовали кончики корней, что значительно повышало регенерационный потенциал по сравнению с другими типами эксплантов. Есть данные о том, что мультимпликация путём индукции адвентивных побегов в

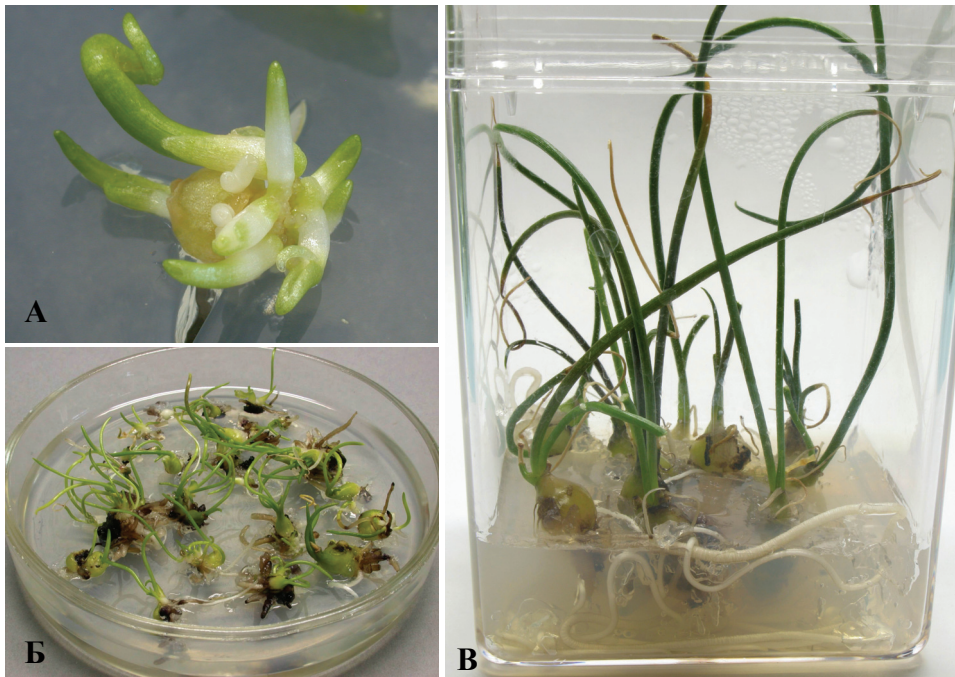


Рис. 1. Размножение *Bellevalia sarmatica* в культуре *in vitro*.

- А – формирование адвентивных побегов в базальной части луковиц на среде с 1 мг/л БАП;
 Б – массовое развитие луковиц на среде, содержащей 0,2 мг/л БАП;
 В – укоренённые растения, готовые к высадке в почву.

эксплантах разного типа (основания листьев, чешуйки или почки) даёт больше побегов, чем развитие меристематических зон в базальной пластинке [7]. В наших экспериментах не удалось индуцировать регенерацию *B.sarmatica* из корневых эксплантов на питательных средах с БАП, как это было сделано при использовании базальных частей луковиц, однако фрагменты корней оказались оптимальными эксплантами для индукции каллусных линий на средах с ауксинами и цитокининами. Полученные каллусные линии могут быть использованы как исходный материал для изучения возможности непрямого регенерации *B.sarmatica*. Тип морфогенеза (прямой или непрямого, органогенез или соматический эмбриогенез) также непосредственно влияет на эффективность размножения *in vitro*. Как известно, регенерация путём соматического эмбриогенеза имеет ряд преимуществ по сравнению с органогенезом для крупномасштабного и быстрого размножения растений, в частности, позволяет значительно увеличить коэффициент размножения. В работе [5] по размножению *Lilium testaceum* регенерацию индуцировали как из чешуек луковиц, так и через каллус. Масштаб размножения был выше при использовании каллуса, однако регенерация из чешуек происходила за более короткие сроки. Кроме того, прямая регенерация всегда предпочтительнее в тех случаях, когда необходимо сохранить генетический статус размножаемого растительного материала.

Результаты, полученные нами по размножению *Bellevalia sarmatica* в культуре *in vitro*, носят предварительный характер. Дальнейшая отработка технологии должна быть направлена на повышение её эффективности, что включает подбор факторов, позволяющих увеличить коэффициент размножения, сократить сроки работы, отработать методы адаптации и переноса в грунт. Вместе с тем разработанный метод является воспроизводимой и эффективной системой поддержания этого охраняемого вида растений в коллекции культур *in vitro*. Кроме того, наличие разработанной системы регенерации является одной из важных предпосылок применения биотехнологических методов для возможного дальнейшего использования данного вида в декоративном цветоводстве.

Выводы

Прорастание семян *Bellevalia sarmatica* в условиях *in vitro* происходило без применения стратификации с эффективностью 46%. Массовое формирование адвентивных побегов индуцируется на среде Гамборга В₅, содержащей 0,2-1 мг/л БАП, при использовании качестве эксплантов базальных частей чешуек луковиц, с последующим развитием и укоренением растений на безгормональной среде.

Работа выполнялась в рамках проекта по поддержанию объекта национального научного достояния Украины "Коллекция зародышевой плазмы растений флоры Украины и мировой флоры".

Литература

1. E.F.George, M.A.Hall, G.-J. De Klerk (eds.) Plant propagation by tissue culture. The 3rd edition. Volume 1. The background. // Springer. – 2008. - 501 p.
2. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин // Київ, "Наукова думка". – 2005. – 270 с.
3. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры. // Цитология и генетика. – 2005. - №14. - с. 41-51.
4. Akutsu M., Sato H. Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstoemeria* calli. // Plant Science. – 2002. – v. 163. – p. 475-479.
5. Wozniowski T., Blaschek W., Franz G. *In vitro* propagation of *Lilium testaceum* and structural investigation of the storage β -1,4-glucomannan // Plant Cell Reports. – 1991. - v. 10. – p. 457-460.
6. Pandey R., Chandel K.P.S., Rao S.R. *In vitro* propagation of *Allium tuberosum* Rottl. ex. Spreng. by shoot proliferation // Plant Cell Reports. – 1992. - v.11. – p.375-378.
7. Selles M., Viladomat F., Bastida J., Codina C. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids // Plant Cell Reports. – 1999. - v. 18, № 7/8. – p. 646-651.
8. Robledo-Paz A., Villalobos-Arambula R., Jofre-Carfias A.E. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. – 2000. - v. 36. - p. 416-419.

Резюме

Разработан метод размножения *in vitro* растений охраняемого вида *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow (Hyacinthaceae) путём индукции адвентивных побегов в эксплантах базальных частей чешуек луковиц, полученных в результате асептического проращивания семян.

Розроблено метод розмноження *in vitro* рослин *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow (Hyacinthaceae), що охороняється, шляхом індукції адвентивних пагонів в експлантів базальних частин лусок цибулин, отриманих після асептичного пророщування насіння.

Method of *in vitro* propagation of endangered species *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow (Hyacinthaceae) has been elaborated via adventitious bulblet formation at the basal parts of the bulb scales.

БІЛИНСЬКА О.В., КУЩЕНКО О.О.

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Української академії аграрних наук Україна, 61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

ВПЛИВ ГАМЕТНОГО ДОБОРУ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ IN VITRO НА МІНЛИВІСТЬ ОЗНАК ПРОДУКТИВНОСТІ ЛІНІЙ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ

Методи експериментальної гаплоїдії приваблюють можливістю швидкого отримання гомозиготних рекомбінантів, за рахунок чого досягається істотне (на 4–5 років) прискорення селекційного процесу [1, 2]. Окрім цього, відомо, що механізм утворення гаплоїдів *per se*, особливо в умовах штучного клімату, може нівелювати дію природного добору і створювати передумови для виникнення рослин-носіїв рідкісних цінних рекомбінацій [3]. Разом з тим, накопичено значний обсяг даних щодо відхилення від теоретично очікуваного розщеплення

1:1 у популяціях ліній подвоєних гаплоїдів, зокрема андрогенного походження, яке накладає певні обмеження на їх використання у генетичних і молекулярно-генетичних дослідженнях [4, 5].

Встановлено, що згадане відхилення є наслідком гаметного добору *in vitro*, суть якого полягає у переважному розвитку по спорофітному шляху мікроспор з вдалим набором генів культурабельності [6]. В разі зчеплення цих генів з генами, які детермінують певні біологічні та господарсько цінні ознаки, відбувається збільшення у популяції подвоєних гаплоїдів частот окремих генотипних і фенотипних класів, що може мати різний вплив на селекційну цінність ліній [7, 8]. З огляду на це метою досліджень була оцінка мінливості за ознаками продуктивності у популяції ліній подвоєних гаплоїдів гібридного походження у зв'язку з відмінностями за здатністю до андрогенезу *in vitro* сортів ярого ячменю, які були батьківськими формами гібридів.

Матеріали та методи

В дослідженнях використано популяцію ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю, створену методом культури пиляків *in vitro* на основі реципрокних гібридів F₁ сортів Харківський 67 і Харківський 74, яким притаманна контрастна здатність до утворення калюсу, ембріоїдів та регенерації рослин.

Аналіз елементів структури урожаю проводили за загальноприйнятою методикою [9]. Аналізували такі ознаки: загальна та продуктивна кущистість, висота рослини, довжина головного колосу, кількість у головному колосі колосків та зерен, маса зерна головного колосу, щільність колосу, кількість та маса зерен з рослини, а також вміст у зерні білка і крохмалю. Враховували отримані раніше дані щодо мінливості за кількістю морфогенних пиляків і зелених рослин-регенерантів у відсотках від загальної кількості культивованих пиляків [10]. Об'єм вибірки – 20 рослин. Узагальнено дворічні експериментальні дані, одержані у роки, які різнилися за гідротермічним режимом. Кластерний аналіз сортів, ліній і гібридів за елементами структури урожаю проводили, використовуючи пакет програм “STATISTICA 6.0”.

Результати і обговорення

Сорти, які було використано в якості батьківських форм гібридів, різнилися за здатністю до андрогенезу *in vitro*, комплексом біологічних та господарсько цінних ознак. Зокрема, сорт Харківський 67 (різновидність *nutans*) належить до степової екологічної групи, характеризується високою стійкістю до посухи впродовж усього вегетаційного періоду, жаростійкий, середньостиглий має хороші круп'яні якості. Сорт Харківський 74 (різновидність *nutans*) належить до лісостепової екологічної групи, порівняно низькорослий, стійкий до вилягання, посухостійкість на ранніх фазах розвитку – вище середньої, у період наливу зерна – середня; має хороші пивоварні якості.

Характерною особливістю комбінації схрещування Харківський 67×Харківський 74 є гібридна депресія у F₁ за ознаками „висота рослини”, „довжина головного колосу” і „маса зерна з рослини”, а також відхилення у бік сорту Харківський 67 за продуктивною кущистістю, кількістю колосків і зерен у головному колосі, кількістю зерен з рослини. За рештою ознак мало місце проміжне успадкування. Водночас у гібридів відмічено гетерозис за гаплопродукційними показниками у культурі пиляків *in vitro*.

Як свідчать результати проведених раніше досліджень [10], кількість морфогенних пиляків у сорту Харківський 74 становила 12,1 %, а у сорту Х67 – 1,0 %. У 12 досліджених ДГ-ліній кількість морфогенних пиляків варіювала від 5,8 до 34,2 %, тобто усі лінії перевищили за цим показником сорт Харківський 67, 6 ліній – сорт Харківський 74, що є свідченням гаметного добору у культурі пиляків *in vitro*.

Десять ліній істотно перевищили сорт Харківський 67 за частотою регенерації зелених рослин, а у чотирьох ліній за цим показником спостерігалось трансгресивне успадкування, що також підтверджує наявність гаметного добору *in vitro*.

Аналіз елементів структури урожаю ліній подвоєних гаплоїдів, проведений у 1998 р., який характеризувався підвищеною температурою і недостатньою кількістю опадів у фазі виходу в трубку і наливу зерна, показав, що лише за загальною, продуктивною кущистістю

та кількістю колосків у головному колосі більшість ліній наближалася до сорту Харківський 67. За висотою рослин і довжиною головного колоса більшість ліній поступилася обом сортам. За рештою ознак спостерігалось відхилення у бік сорту Харківський 74.

Кластерний аналіз за сукупністю усіх ознак продуктивності (рис. 1) підтвердив тенденцію до переважного успадкування андрогенними дигаплоїдами гібридного походження ознак батьківського сорту з більш високою здатністю до андрогенезу *in vitro*.

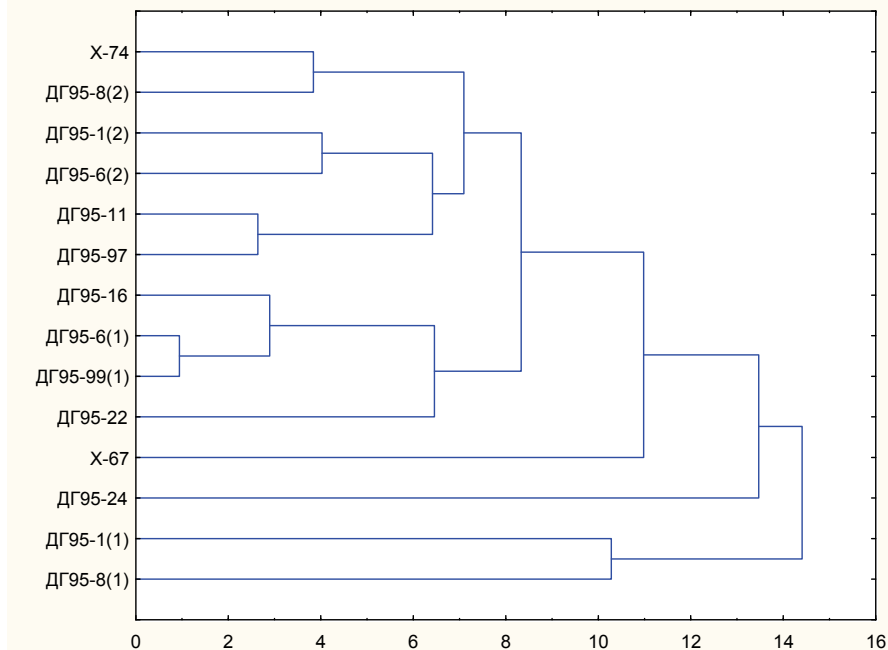


Рис. 1. Дендрограма розподілу сортів ярого ячменю Харківський 67, Харківський 74 та похідних від їхніх гібридів F₁ дигаплоїдних ліній за ознаками продуктивності (1998 р.).

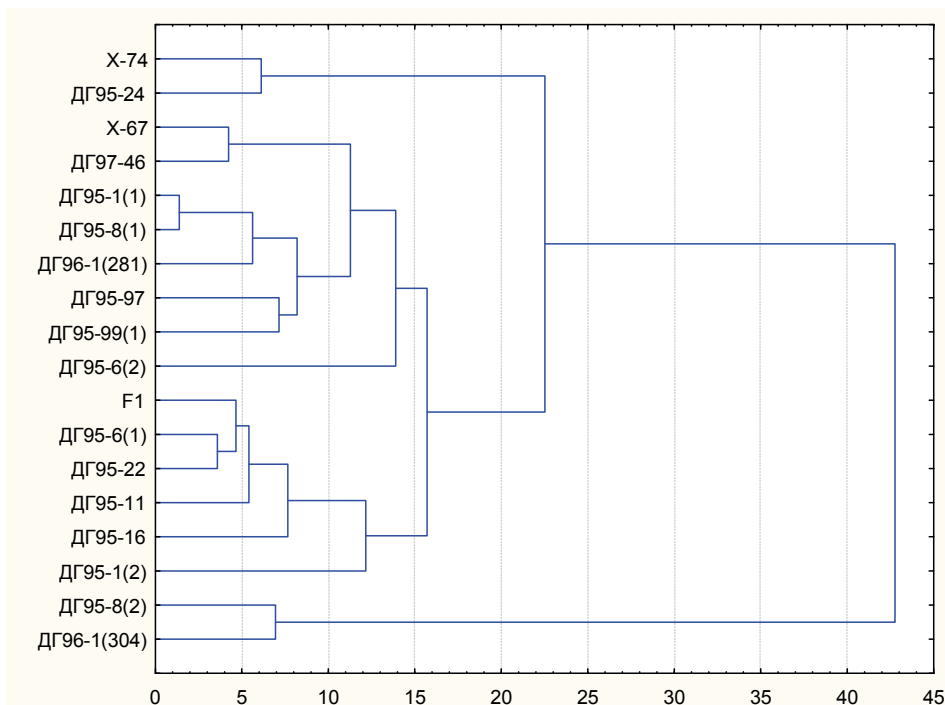


Рис. 2. Дендрограма розподілу сортів ярого ячменю Харківський 67, Харківський 74, реципрокних гібридів F₁ та похідних від них дигаплоїдних ліній за ознаками продуктивності (2000 р.).

Подальші дослідження виявили залежність характеру успадкування ознак продуктивності у популяції ліній подвоєних гаплоїдів гібридного походження від погодних

умов, що відповідає загальновідомим закономірностям успадкування кількісних ознак [11]. Так, у 2000 р., більш сприятливому за гідротермічним режимом для росту і розвитку ярого ячменю, батьківські сорти гібридів не мали істотних відмінностей за загальною і продуктивною кущистістю, масою зерна з головного колосу і масою зерна з рослини. На відміну від 1998 р. більш контрастною була різниця за кількістю насінин з рослини. П'ять ліній перевищили за продуктивною кущистістю обох батьків, у двох ліній мав місце гетерозис за кількістю і масою зерна з рослини. Переважна більшість ліній за елементами структури урожаю відхилялися у бік сорту Харківський 67 або гібридів F₁, які у свою чергу або були на рівні батьківських сортів за певними ознаками, або поступилися їм. Переважного успадкування ознак продуктивності чутливого до андрогенезу *in vitro* сорту Харківський 74 виявлено не було (рис. 2), що, вірогідно, пов'язано з більш повною реалізацією потенційної продуктивності нестійкими до посухи лініями в умовах достатнього зволоження і їхньою більшою варіабельністю за комплексом ознак.

У 2001-2002 рр. було визначено вплив гаметного добору *in vitro* на успадкування дигаплоїдними лініями ознак якості зерна, зокрема, вмісту білка і крохмалю. Результати досліджень показали, що в умовах 2001 року (прохолодна погода з достатнім зволоженням у фазу молочної стиглості і значне підвищення температури у фазу воскової і повної стиглості) якість зерна зазначених сортів була тісно пов'язана з різним рівнем їхньої посухостійкості. Зокрема, у менш посухостійкого сорту Харківський 74 відмічено більш високий вміст білка, але знижений вміст крохмалю, викликані формуванням щуплих зернівок. Що стосується ліній подвоєних гаплоїдів, то у 9 генотипів з 15 вміст білка був на рівні сорту Харківський 74, але лише три лінії мали однаковий із цим сортом вміст крохмалю. У 2002 р. проявилася аналогічна закономірність щодо успадкування вмісту білка у популяціях ліній подвоєних гаплоїдів. Зокрема, із 15 ліній, залучених до експерименту, 8 були за цим показником на рівні сорту Харківський 74, 2 лінії істотно перевищили обидві батьківські форми, а 5 ліній мали вміст білка близький до такого сорту Харківський 67.

Висновки

Мінливість ознак продуктивності і якості зерна у популяції рекомбінантних ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю визначається не лише дією гаметного добору за здатністю до андрогенезу *in vitro*, а й гідротермічним режимом вегетаційного періоду. Відсутність однозначної відповідності між успадкуванням лініями комплексу ознак продуктивності батьківських форм гібридів та здатністю до андрогенезу *in vitro* може свідчити про локалізацію генів, які контролюють останню ознаку, на невеликій кількості хромосом (вірогідно двох або трьох) і актуальність дослідження зчеплення цих генів з окремими кількісними і якісними ознаками.

Література

1. Choo T.M., Reinbergs E., Kasha K.J. Use of haploids in breeding barley // Plant Breeding Review. – 1985. – v. 3. – P. 219–252.
2. 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.
3. Zivy M., Devaux P., Blaisonneau J., Jean R., Thiellement H. Segregation distortion and linkage studies in microspore-derived doubled-haploid lines of *Hordeum vulgare* L. // Theor. Appl. Genet. – 1992. – 83. – P. 919–924.
4. Tompson D.M., Chalmers K., Wangh R., Forster B.P. Thomas W.T.M., Caligari P.D.S., Powell W. The inheritance of genetic markers in microspore-derived plants of barley *Hordeum vulgare* L. // Theor. Appl. Genet. – 1991. – v. 81. – P. 487–492.
5. Tai G.C.C., Seabrook J.E.A., Aziz A.N. Linkage analysis of anther-derived monoploids showing distorted segregation of molecular markers // Theor. Appl. Genet. – 2000. – 101. – P. 126–130.
6. Giuiderdoni E. Gametic selection in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.) // Theor. Appl. Genet. – 1991. – v. 81. – P. 406–412.
7. Snape J.W., Simpson E., Parker B.B. Fridt W., Foroughi-Wehr B. Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in cereal breeding programs // Genetic manipulation in plant breeding. – Berlin-New-York: Walter de Gruyter & Co., 1986. – P. 217–229.

8. Bjornstad A., Skinnes H. Genetic studies of anther culture derived lines in barley // Proc. Six Intern. Barley Genet. Symp. (July 22-27 1991). – Helsingborg, 1991. – v. 1. – P. 191–193.
9. Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса / Под ред В.Д. Кобылянского и Ф. Я. Трофимовской. – Л.: ВИР, 1981. – 92 с.
10. Белинская Е.В. Влияние генотипа родительских компонентов исходной гибридной популяции и отбора в культуре пыльников *in vitro* на андрогенную способность дигаплоидных линий ячменя // Молекулярная генетика и биотехнология: Материалы Международной конференции (6–8 апреля 1998 г.). – Минск, 1998. – С. 143–144.
11. Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Экологическая селекция растений.– Мн.: Технология, 1997. – 372 с.

Резюме

Досліджено мінливість ознак продуктивності і якості зерна у популяції ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю, одержаних методом культури пиляків на основі гібридів сортів з контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*. Виявлено тенденцію переважного успадкування лініями гібридного походження комплексу ознак батьківської форми з більш високими показниками гаплопродукції, прояв якої залежав від агрометеорологічних умов у період вегетації.

Изучена изменчивость признаков продуктивности и качества зерна в популяции линий удвоенных гаплоидов ярого ячменя, полученных методом культуры пыльников на основе гибридов сортов с контрастной способностью к андрогенезу *in vitro*. Выявлена тенденция преимущественного наследования андрогенными линиями гибридного происхождения признаков родительской формы с более высокими показателями гаплопродукции, проявление которой зависело от агрометеорологических условий в период вегетации.

Variability of yield structure components and grain quality in spring barley population of DH-lines produced via anther culture *in vitro* from hybrids of cultivars with a contrast capacity to androgenesis *in vitro* was investigated. A tendency to preferential inheritance by androgenic doubled haploids agronomic traits of the parental form possessing higher culturability was revealed. But this tendency depended on agrometeorological conditions in vegetation period.

ГУЗЕВАТИЙ О.Є.¹, ТРОЦЬКИЙ П.А.²

¹Українська академія аграрних наук, Україна, 01010, м. Київ, вул. Суворова, 9,
E-mail: oleg_guzevatiy@ukr.net

²Інститут розведення і генетики тварин УААН, Україна, 08321, Київська обл.,
Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1

ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ ЗАРОДКІВ, ОТРИМАНИХ *IN VITRO* З ДЕКОНСЕРВОВАНИХ ООЦИТІВ

Для сучасної агробіотехнології характерний комплексний підхід, зокрема як широке застосування низки методів досліджень, таких як молекулярно-біологічних, кріобіологічних, ембріологічних, фізіологічних тощо, так і вирішення широкого спектра господарських завдань. В тваринництві сучасні методи біотехнології створюють значні перспективи для підвищення і розширення можливостей селекції і відтворення сільськогосподарських тварин [1, 2]. Нині значна увага приділяється дослідженням, що пов'язані з отриманням *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин, в першу чергу великої рогатої худоби, на основі використання методів культивування і запліднення *in vitro*, кріоконсервування, визначення і регуляції статі тощо [3, 4, 5]. Заморожування гамет і ембріонів сільськогосподарських тварин відкрило нову еру біотехнологічних методів збереження і відтворення тварин. Заморожування в рідкому азоті при -196°C створило можливість фактично необмеженого зберігання, транспортування і використання біологічного матеріалу для досліджень у будь-яких галузях науки [6- 10].

Метою досліджень була оцінка застосування різних культуральних систем для подальшого розвитку в умовах *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих ооцитів.

Матеріал і методи

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси корів чорно-рябої породи. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, виловлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом.

Перед заморожуванням гамети корів і свиноматок обробляли еквілібраційним розчином, а потім переносили у вітрифікаційний розчин. Всі еквілібраційні (10% гліцерин + 20% пропандіол) та вітрифікаційні (25% гліцерин + 25% пропандіол) розчини для кріоконсервування ооцит-кумулясних комплексів корів були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20% фетальної сироватки.

Після розморожування гамет виведення кріопротекторів з них проводили шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози. Ооцит-кумулясні комплекси корів культивували протягом 27 годин при температурі 38,5°C, 5% CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10% попередньо інактивованою сироваткою корів, 2,5 мкг/мл ФСГ ("Schering corporation"), 1,0 мкг/мл естрадіолу ("Serva"), 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону ("Serva"), 2,0 мМ натрія пірувату ("Sigma"), 2,92 мМ кальція лактату ("Sigma"), 40 мкг/мл гентаміцину.

Після дозрівання поза організмом нативні та деконсервовані яйцеклітини корів підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин корів використовували заморожену сперму бугая. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [11]. Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили в термостаті при температурі 38,5°C, 5% CO₂ в повітрі, в краплях середовища Fert.-TALP. Після 12-18 годин спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування.

Цитогенетичні препарати готували за методом Ushijima M. et al. [12], забарвлювали 10%-ним розчином Гімза ("Fluka") та досліджували під мікроскопом. Отримані результати статистичне обробляли з використанням критеріїв Стьюдента [13].

Результати та обговорення

Добір і застосування певних культуральних систем є одним з головних чинників, що забезпечують життєздатність і подальший розвиток поза організмом ооцитів, зигот і ембріонів [14, 15, 16]. В таблиці наведено результати розвитку ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* з деконсервованих ооцитів корів, за умов використання різних культуральних систем, а саме: у варіанті досліду А використовували моношар клітин гранульози, у варіанті досліду Б – кондиційоване середовище клітин гранульози, у варіанті досліду В – моношар клітин кумулюса, у варіанті досліду Г – кондиційоване середовище клітин кумулюса, варіант досліду К був контролем, в якому культивували зародки, отримані *in vitro* з нативних ооцит-кумулясних комплексів корів.

Таблиця

Використання різних культуральних систем для розвитку *in vitro* зародків великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих ооцитів

Варианти дослідів	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадії									
		2 клітин		3-4 клітин		5-8 клітин		9-16 клітин		морула + бластоциста	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
К	95	41	43,2 ^e ±5,1	35	36,8 ±4,9	30	31,6 ±4,8	24	25,2 ±4,5	12	12,6 ^g ±3,4

А	162	37	22,8 ^b ±3,3	30	18,5 ±3,1	23	14,2 ±2,7	16	9,9 ±2,3	4	2,5 ^f ±1,2
Б	177	22	12,4 ^{ac} ±2,5	12	6,8 ±1,9	5	2,8 ±1,2	3	1,7 ±0,9	–	–
В	153	33	21,6 ^b ±3,3	25	16,3 ±3,0	21	13,7 ±2,8	18	11,8 ±2,6	5	3,3 th ±1,4
Г	186	17	9,1 ^{ad} ±2,1	8	4,3 ±1,5	5	2,7 ±1,2	4	2,2 ±1,1	–	–

b : c, g : h – P < 0,05; a : b, f : g – P < 0,01; b : d, b : e, c : e, d : e – P < 0,001
(різні суперскрипти вказують на вірогідну різницю між показниками)

За результатами експериментальних досліджень встановлено, що деякі із застосованих культуральних систем по різному впливають на подальший розвиток запліднених *in vitro* деконсервованих і дозрілих поза організмом ооцитів корів. Ефективнішим при отриманні *in vitro* зародків великої рогатої худоби як ранніх (2-16 клітинні), так і на доімплантаційних стадіях їх розвитку (морула та бластоциста) виявилось застосування моношарів клітин гранульози (вар.А, 22,8 і 2,5% відповідно) та кумулюса (вар.В, 21,6 і 3,3% відповідно) порівняно з використанням кондиційованих середовищ гранульози (вар.Б, 12,4 і 0% відповідно) та кумулюса (вар.Г, 9,1 і 0% відповідно). В контрольній групі (без заморожування) показники *in vitro* отримання ембріонів великої рогатої худоби ранніх і доімплантаційних стадій розвитку становили відповідно 43,2 і 12,6%.

Таким чином, нині досягнуто певних успіхів з проблеми дозрівання, запліднення і подальшого культивування *in vitro* як нативних, так і деконсервованих гамет, отриманих з антральних фолікулів яєчників корів, що дозволяє отримувати значно більшу кількість необхідного біологічного матеріалу на різних стадіях їх розвитку від тварин з високим генетичним потенціалом як для наукових, так і для практичних цілей.

Висновки

Використання моношарів клітин гранульози та кумулюсу на відміну від застосування їх кондиційованих середовищ більш ефективно для подальшого розвитку в умовах *in vitro* зигот великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих ооцитів корів та сприяє збільшенню одержання зародків як ранніх так і доімплантаційних (морула та бластоциста) стадій їх розвитку відповідно на 10,4-12,5% та 2,5-3,3%.

Література

1. *Betteridge K.J.* Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives // *Theriogenology*.- 2006.- Vol.65, I.5.- P.905-913.
2. *Руденко Є.В.* Роль і перспективи сучасних методів біотехнології в умовах інтенсифікації тваринництва / Є.В.Руденко, О.Є.Гузеватий // Науково-технічний бюлетень.- Харків, 2008.- №96.- С.44-49.
3. *Bazer F.W.* Reproductive biology in the era of genomics biology / F.W.Bazer, T.E.Spencer // *Theriogenology*.- 2005.- Vol.64, I.3.- P.442-456.
4. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle / M.V.Wheeler, J.J.Rutledge, A.M.Brown et al. // *Theriogenology*.- 2006.- V.65, I.1.- P.219-227.
5. *Безуглий М.Д.* Розвиток біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М.Д.Безуглий, О.Є.Гузеватий // Вісник аграрної науки.- 2006.- №12.- С.83-86.
6. *Vajta G.* Improving cryopreservation systems / G.Vajta, M.Kuwayama // *Theriogenology*.- 2006.- Vol.65, I.1.- P.236-244.
7. *Гузеватий О.Є.* Заморожування ооцитів корів на різних стадіях мейотичного дозрівання та оцінка їх життєздатності після деконсервування / О.Є.Гузеватий, П.А.Троцький // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДКДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.- Львів, 2007.- Вип.8, №1-2.- С.287-291.
8. *Seidel G.E., Jr.* Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation // *Theriogenology*.- 2006.- Vol.65, I.1.- P.228-235.

9. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М.Д.Безуглий.- Харків, 2002.- 155с.
10. Woods E.J. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue / E.J.Woods, J.D.Benson, Y.Aga, J.K.Crister // Cryobiology.- 2004.- Vol.48.- P.146-156.
11. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid /Parrish J.J., Sushko-Parrish J.L., Handron R.R. et al. // Biol.Reprod.- 1989.- Vol.40.- P.1020-1025.
12. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts /Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. // Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans.- 1988.- №9.- P.37-38.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия,- М.: Высшая школа, 1990.- 351 с.
14. Макарова З.Н. Роль культуральной среды в процессе получения эмбрионов коров вне организма / З.Н.Макарова, Т.Э.Позднякова, О.Е.Гузеватый // Бюл. науч. работ / ВНИИРГЖ.- 1985.- Вып.85.- С.27-29.
15. Hochi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer // Theriogenology.- 2003.- V.59, I.2.- P.553-697.
16. Use of media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture / Lane N., Gardner D.K., Hasler M.J., Hasler J.F // Theriogenology.- 2003.- V.60, I.3.- P.407-419.

Резюме

Наведено результати експериментальних досліджень розвитку в різних культуральних системах ранніх ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* з деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів корів. Установлено, що застосування моношару клітин гранулози або кумулюса більш ефективно порівняно з кондиційованими середовищами для подальшого розвитку в умовах *in vitro* зигот великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих та дозрілих поза організмом ооцитів корів.

Приведены результаты экспериментальных исследований развития в различных культуральных системах ранних эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro* из деконсервованных ооцит-кумулюсных комплексов коров. Установлено, что применение монослоя клеток гранулёзы или кумулюса более эффективно по сравнению с кондиционированными средами для последующего развития в условиях *in vitro* зигот крупного рогатого скота, полученных из деконсервованных и дозревших вне организма ооцитов коров.

Results of experimental researches of development in the various cultural systems of early bovine embryos used *in vitro* from frozen-thawed bovine oocyte-cumulus complexes are resulted. It's set that application of monolayer of granulose or cumulus cells more effectively comparatively with conditions mediums for subsequent development of *in vitro* bovine zygote, used from frozen-thawed and matured *in vitro* bovine oocytes.

КИЩЕНКО Е.М., БЕЛОКУРОВА В.Б., ПАТОН Е.Б., КУЧУК Н.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: iicb@iicb.kiev.ua*

ПРОСТРЕЛ ЧЕРНЕЮЩИЙ (*PULSATILLA NIGRICANS* STORCK) КАК ОБЪЕКТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Прострел чернеющий (*Pulsatilla nigricans* Storck.) семейства лютиковых (Ranunculaceae) – сокращающийся в численности, уязвимый вид, занесенный в Красную Книгу Украины (2-я категория). Растения этого вида издавна использовались в народной медицине при различных нервных и сердечнососудистых заболеваниях. На сегодняшний день прострел не относят к официальным препаратам, хотя он достаточно популярен в гомеопатии и применяется при заболеваниях нервной системы, кровообращения, желудочно-кишечного тракта и воспалительных процессах. Биологически активные вещества,

обуславливающие лекарственное действие, у *P. nigricans* практически не исследованы [1]. Интенсивное изучение родственных видов *P. chinensis* (Bunge.) Reg. и *P. koreana* (Nakai.) привело к обнаружению в их корнях сапонинов люпанового и олеананового рядов, обладающих противоопухолевой активностью [2-6]. Разработка биотехнологических методов у *P. nigricans* представляет интерес, прежде всего, для сохранения и клонального размножения *in vitro* этого редкого растения, а так же для создания клеточных и корневых культур как источника сырья для получения фармакологически ценных веществ. В связи с этим целью работы было введение *P. nigricans* в асептическую культуру, изучение особенностей морфогенеза, создание культуры недифференцированных клеток *P. nigricans* и корневых трансгенных культур, трансформированных *Agrobacterium rhizogenes*.

Материалы и методы

Семена *P. nigricans* были предоставлены Банком зародышевой плазмы растений мировой флоры (ИКБГИ НАН Украины). Поверхностную стерилизацию семян проводили согласно разработанной ранее методике [7]. Для прорастания семян использовали питательную среду MS/2, в которой была вдвое уменьшена концентрация макросолей и сахарозы по сравнению с питательной средой MS [8] и добавлена гибберелловая кислота (1 мг/л). Асептические растения выращивали на безгормональной среде SH [9] при +24°C и 16 часовом световом периоде с интервалом субкультивирования три недели.

Для инициации первичного каллуса по срезам листовых эксплантов использовали несколько типов сред на базе минерального состава SH с добавлением разных комбинаций регуляторов роста: 1) 2 мг/л дикамба (DC2); 2) 2 мг/л дикамба и 1 мг/л 2-iP (DC2iP1); 3) 1 мг/л 2-iP (iP1); 4) 2 мг/л TDZ (TDZ2); 5) 2 мг/л TDZ и 1 мг/л NAA (TDZ2NAA1); 6) 1 мг/л TDZ и 1 мг/л NAA (TDZ1NAA1); 7) 2 мг/л BAP и 1 мг/л NAA (BAP2NAA1); 8) 1 мг/л BAP и 1 мг/л NAA (BAP1NAA1); 9) 2 мг/л 2,4-D, 0,5 мг/л NAA, 0,5 мг/л IAA и 0,2 мг/л кинетина (4x).

Для получения корневых трансгенных культур «hairy roots» проводили генетическую трансформацию, используя агропиновый штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4. Ночную агробактериальную культуру осаждали, далее ресуспендировали питательной средой MS/2 с 0,2 mM ацетосерингона и инкубировали 2 часа на шейкере (200 об/мин), а затем проводили вакуум-инfiltrацию [10] листовых эксплантов, предварительно культивированных на питательной среде 4x в течение 3 дней. После infiltration экспланты оставляли на фильтровальной бумаге на 2 суток при рассеянном свете, а затем переносили на безгормональную среду SH с 500 мг/л цефотаксима для элиминации бактерий. Образовавшиеся корни отсекали и переносили на питательную среду того же состава.

ДНК из растительных тканей выделяли СТАВ-методом [11]. Реакцию амплификации ДНК проводили в термоциклере Mastercycler® personal (Eppendorf) с использованием пары праймеров, специфических к гену *rolB*: 5'ATGGATCCCAAATTG СТАТТСТТССАСГА3' и 5'TTAGGCTTCTTCTTCAGGTTTACTGCAGC3' (продукт амплификации 780 п.н.). Для ПЦР использовали следующую программу: денатурация 94°C/3 мин; 34 цикла (денатурация 94°C/30 с, отжиг 65°C/30 с, синтез 72°C/45 с); заключительный синтез 72°C/3 мин. Продукты амплификации фракционировали с помощью электрофореза в 0,7% агарозном геле в трис-боратном буфере.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования по введению *P. nigricans* в асептическую культуру показали, что проросток чернеющий обладает низкой всхожестью семян, и для прорастания *in vitro* необходимо присутствие гибберелловой кислоты в питательных средах. Эффективность прорастания составила около 10% на питательной среде MS/2 с добавлением гибберелловой кислоты (1 мг/л), на безгормональных же питательных средах семена не прорастали.

Асептические растения выращивали на безгормональной среде SH. При добавлении в питательную среду 0,5 мг/л BAP происходила пролиферация пазушных почек, что вызывало кущение побегов. Использование этой же питательной среды при культивировании листовых

эксплантов приводило к прямой регенерации побегов, формировавшихся преимущественно вдоль центральных жилок листков (рис. 1а).

При культивировании листовых эксплантов на питательных средах для каллусогенеза, содержащих только цитокинины (iP1, TDZ2) либо только ауксины (DC2), каллус не формировался (табл.). Низкая частота формирования и, в дальнейшем, медленный рост полученных каллусных культур, наблюдался при использовании питательных сред, в которых содержание ауксинов превышало содержание цитокининов (DC2iP1, 4x).

Таблица

Особенности образования каллуса листовыми эксплантами *P. nigricans* в зависимости от состава питательной среды

Среда	Частота образования каллуса, %	Тип каллуса
DC2	0	-
DC2iP1	20	белый, рассыпчатый, растет медленно
iP1	0	-
TDZ2	0	-
TDZ2NAA1	100	желто-зеленый, гранулярный, растет быстро, с высокой частотой формирует эмбриоидоподобные структуры
TDZ1NAA1	100	желто-зеленый, гранулярный, растет быстро
BAР2NAA1	75	зеленоватый, гранулярный, регенерация побегов
BAР1NAA1	75	зеленоватый, гранулярный, регенерация побегов
4x	20	темный, рассыпчатый, витрифицированный, растет медленно

Смещение гормонального баланса в сторону цитокининов приводило к формированию морфогенного каллуса. При использовании питательных сред BAР2NAA1 и BAР1NAA1 наблюдали непрямую регенерацию, частота которой составляла около 25% (отношение регенерирующих эксплантов к их общему количеству). При использовании сред TDZ2NAA1 и TDZ1NAA1 формировался первичный гранулярный быстрорастущий каллус желто-зеленого цвета. При дальнейшем культивировании на тех же средах каллус формировал эмбриоидоподобные структуры (рис. 1б), в количестве 16-20 на чашку Петри за пассаж. Эмбриоидоподобные структуры развивались в побеги с частотой 80% лишь при переносе их на питательную среду SH с 0,4 мг/л гибберелловой кислоты. Полученные результаты указывают на различие между действием TDZ и BAР на морфогенез прострела чернеющего. Хотя TDZ по своему морфофизиологическому воздействию на растения относят к цитокининам [12], он может стимулировать соматический эмбриогенез подобно ауксинам, как было показано для некоторых видов [13-17].

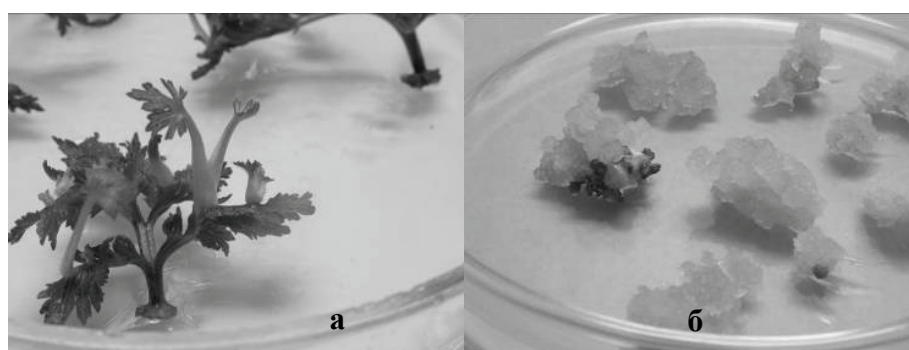


Рис. 1. Морфогенез прострела чернеющего в культуре *in vitro*: прямой органогенез (а) и формирование эмбриоидоподобных структур (б).

Переход к неорганизованному росту в условиях *in vitro* может сопровождаться снижением интенсивности вторичного биосинтеза и/или изменением спектра синтезированных веществ [18], тогда как уровень синтеза и накопления вторичных метаболитов в «hairy roots» культурах обычно стабилен и соответствует интактному растению

или даже превышает его [19]. Поэтому следующим этапом нашей работы было получение корневых трансгенных культур прострела чернеющего.

Генетическую трансформацию растений *P. nigricans* проводили с помощью агробактерий агропинового штамма *A. rhizogenes* A4. Прекультивирование эксплантов на питательной среде 4х способствовало повышению эффективности генетической трансформации (отношение количества эксплантов, формировавших корни после агробактериальной трансформации, к суммарному количеству эксплантов). Было обнаружено, что *P. nigricans* является довольно устойчивой к заражению агробактериями, т.к. корни формировались с частотой 0-20% в зависимости от опыта (в среднем около 5%). Образовавшиеся корни переносили на безгормональную среду SH с цефотаксимом, где они медленно росли. Большая часть из них прекращала рост после 2-3 месяцев культивирования, тем не менее нам удалось отобрать 6 клонов, способных расти на безгормональной питательной среде. Полученные корни не имели типичного фенотипа «бородатых корней», хотя и характеризовались отсутствием положительного геотропизма (рис. 2а). Для подтверждения переноса TL-фрагмента T-ДНК плазмиды pRi проводили ПЦР суммарной ДНК, выделенной из 3 образцов корневых культур, с использованием праймеров, специфических к гену *rolB*. В результате амплификации фрагмент ДНК ожидаемого размера (780 п.н.) дали 2 пробы. Проведенный анализ позволяет сделать вывод о трансгенной природе полученных клонов.

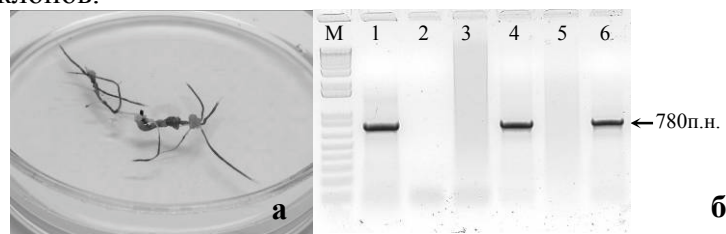


Рис. 2. Корневая культура *P. nigricans*, полученная после трансформации *A. rhizogenes* (а), и ПЦР-анализ корневых культур с использованием праймеров к *rolB* гену (б). М - ДНК-маркер (Invitrogen, 1 Kb Plus DNA Ladder), 1 – положительный контроль, суммарная агробактериальная ДНК, 2 – отрицательный контроль без ДНК-матрицы, 3 – ДНК исходного растения, 4 - 6 – ДНК трансформированных корневых культур

Выводы

В ходе проведенного исследования прострел чернеющий (*P. nigricans* Storck.) был введен в асептическую культуру. При изучении процессов морфогенеза было выявлено различие между действием цитокининов TDZ и ВАР на каллусную культуру прострела: в первом случае регенерация происходила путем соматического эмбриогенеза, во втором - побегообразования. Были созданы культуры недифференцированных клеток и корневые трансгенные культуры *P. nigricans*, трансформированные *A. rhizogenes*. Интеграция *rolB* гена подтверждена с помощью ПЦР анализа.

Работа выполнена в рамках проекта «Створення та застосування клітинних культур-продуцентів для отримання антимікробних та антигрибкових речовин рослинного походження» комплексної програми НАН України «Новітні медико-біологічні проблеми та навколишнє середовище людини».

Литература

1. Філь У.Г. До хімічного вивчення сону чорніючого // Фармакологічний журнал. – 1962. – т. 17, №5. – С. 47-51.
2. Ye W., He A., Zhao S., Che C.T. Pulsatilloside C from the roots of *Pulsatilla chinensis* // J. Nat. Prod. - 1998. – vol. 61, № 5. – P. 658-659.
3. Ye W., Zhang Q., Hsiao W.W., Zhao S., Che C.T. New lupane glycosides from *Pulsatilla chinensis* // Planta Med. – 2002. – vol. 68, № 2. – P. 183-186.
4. Kim Y., Kim S.B., You Y.J., Ahn B.Z. Deoxypodophyllotoxin; the cytotoxic and antiangiogenic component from *Pulsatilla koreana* // Planta Med. – 2002. – vol. 68, № 3. – P. 271-274.

5. Kim Y., Bang S.C., Lee J.H., Ahn B.Z. Pulsatilla saponin D: the antitumor principle from *Pulsatilla koreana* // Arch. Pharm. Res. – 2004. – vol. 27, № 9. – P. 915-918.
6. Bang S.C., Lee J.H., Song G.Y., Kim D.H., Yoon M.Y., Ahn B.Z. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2005. – vol. 53, № 11. – P. 1451-1454.
7. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры. // Цитология и генетика. – 2005. - №14. - с. 41-51.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. - 1962. – Vol. 15. - P. 473-497.
9. Schenk R.U., Hilderbrandt A.C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // Can. J. Bot. - 1972.- Vol. 50. - P. 199-204.
10. Kapila J., De Rycke R., Van Montagu M., Angenon G. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves // Plant Sci. – 1997. – vol. 122. – P. 101-108.
11. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Дрейнера, Р. Скотта, Ф. Армидиджа, Р. Уолдена. – М.: Мир, 1991. – 408 с.
12. Murthy B.N.S., Murch S.J., Saxena P.K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In Vitro Cell Dev. Biol. – 1998. – vol. 34. – P. 267–275.
13. Rugkhla A., Jones M.G.K. Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* and *S. spicatum* // J. Exp. Bot. – 1998. - vol. 49. – P. 563–571.
14. Dolendro Singh N., Sahoo L., Sarin N.B., Jaiwal P.K. The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millsp) // Plant Sci. – 2003. – vol. 164. – P. 341–347.
15. Vila S., Gonzalez A., Rey H., Mroginski L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature zygotic embryos of *Melia azedarach* (Meliaceae) // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. – 2003. – vol. 39. – P. 283–287.
16. Haensch K.-T. Thidiazuron-induced morphogenetic response in petiole cultures of *Pelargonium x hortorum* and *Pelargonium x domesticum* and its histological analysis // Plant Cell Rep. – 2004.- vol. 23. – P. :211–217.
17. Jones M.P.A., Yi Zh., Murch S.J., Saxena P.K. Thidiazuron-induced regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Micropropagation in solid and liquid culture systems // Plant Cell Rep. – 2007. – vol. 26. – P. 13–19.
18. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи Моногр. /; НАН України. Ін-т молекуляр. біології і генетики. — К.: Логос, 2005. — 724 с.
19. Christen P., Roberts M.F., Phillipson J.D. and Evans W.C. High-yield production of tropane alkaloids by hairy-root cultures of *Datura candida* hybrid // Plant Cell Rep. – 1989. – Vol. 8, № 2. – P. 75-77.

Резюме

Создана асептическая культура прострела чернеющего (*Pulsatilla nigricans* Storck.) и изучены особенности морфогенеза *in vitro*. Получены культуры недифференцированных клеток и корневые трансгенные культуры, трансформированные *Agrobacterium rhizogenes*.

Створено асептичну культуру соню чорніючого (*Pulsatilla nigricans* Storck.) та досліджено особливості морфогенезу *in vitro*. Отримано культури недиференційованих клітин та кореневі трансгенні культури, які були трансформовані *Agrobacterium rhizogenes*.

Pasqueflower (*Pulsatilla nigricans* Storck.) aseptic culture was created and peculiarities of its morphogenesis *in vitro* were investigated. Undifferentiated cell cultures and hairy roots transformed with *Agrobacterium rhizogenes* were obtained.

КОВАЛЕВА Л.В., ЗАХАРОВА Е.В., МИНКИНА Ю.В., ТИМОФЕЕВА Г.В.

*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева Российской академии наук,
Россия, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, e-mail: kovaleva_l@mail.ru*

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОРАСТАНИЯ И РОСТА МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА *IN VITRO*

Прорастание и рост мужского гаметофита в прогамной фазе оплодотворения требуют пространственной и временной координации многих событий, включая организацию элементов цитоскелета, ионные потоки, траффик везикул, экзоцитоз, эндоцитоз и др. Регуляторные механизмы гаметофитно-спорофитных взаимодействий, контролирующих эту сложную цепь событий в системе пыльца-пестик, пока не установлены, хотя и активно исследуются (Franklin-Tong, 1999; Lord and Russell, 2002). К настоящему времени установлено, что прорастание пыльцевых зерен и рост пыльцевых трубок в значительной степени регулируется транспортом ионов K^+ и Ca^{2+} через их плазматическую мембрану (Feijo et al., 2001; Dearnaley et al., 1997; Geitmann, Cresti, 1998; Fan et al., 2001). Результаты, полученные в ходе таких исследований, демонстрируют важную роль транспорта основных физиологически важных ионов через плазмалемму клеток пыльцевого зерна в регуляции прорастания мужского гаметофита. Кроме того, получены данные об участии фитогормонов (этилена, АБК, гиббереллинов и цитокининов) в регуляции межклеточных взаимодействий при прорастании пыльцы на поверхности рыльца и росте пыльцевых трубок в проводниковых тканях столбика петунии (Kovaleva & Zakharova, 2003; Ковалева и др., 2005). Показано, что прорастание пыльцевых зерен на поверхности рыльца и рост пыльцевых трубок в тканях столбика после самосовместимого и самонесовместимого опыления протекают в условиях, которые характеризуются различным уровнем эндогенных фитогормонов в спорофитных тканях пестика и сопровождаются сложными перестройками в гормональной системе двух его частей, рыльца и столбика.

Возможность изучения функций и механизмов действия отдельных фитогормонов в регуляции гаметофитно - спорофитных взаимодействий *in vivo* сильно ограничена из-за сложности самой системы пыльца-пестик и предусматривает использование более простых, модельных систем. На модельной системе, *in vitro* прорастающих пыльцевых зернах петунии (*Petunia hybrida* L.), мы исследовали динамику эндогенного содержания фитогормонов и влияние экзогенных фитогормонов на прорастание и рост пыльцевых трубок, а также провели ряд экспериментов для проверки гипотезы о том, что механизмы трансдукции гормональных сигналов в данной системе могут базироваться на транзиторных сдвигах параметров ионного гомеостаза пыльцевых зерен.

Материалы и методы

Исследования проводили на пыльце, собранной со зрелых цветков петунии (*Petunia hybrida* L.). Растения выращивали в почвенной культуре при естественном освещении (16-часовой фотопериод) в оранжерее. Для прорастания пыльцевых зерен и роста пыльцевых трубок их культивировали в термостатируемых условиях при 25-26⁰С на среде, содержащей 15% сахарозы и 0.01 % борной кислоты. По количеству проросших пыльцевых зерен из двухсот, произвольно отобранных и визуальнo наблюдаемых в четырех полях микроскопа, судили о степени их прорастания. Длину пыльцевых трубок измеряли с помощью микроскопа с окуляр-микрометром при 150-кратном увеличении. В каждом варианте опыта оценивали длину 100 проросших пыльцевых трубок в шести повторностях.

Содержание свободных форм эндогенных фитогормонов (ИУК, АБК и цитокининов (сумма зеатина, зеатинрибозида и дигидрозеатина)) в прорастающих *in vitro* пыльцевых трубках петунии определяли в течение 8 ч их культивирования. Образцы фиксировали жидким азотом, лиофильно высушивали и анализировали методом ВЭЖХ в одной навеске (Скоробогатова и др., 1999).

В экспериментах по тестированию действия экзогенных аналогов фитогормонов (ИУК, ГКЗ, АБК и 6-БАП) на прорастание и рост мужского гаметофита *in vitro* указанные соединения вносили в среду культивирования пыльцевых трубок перед началом опыта.

Индикатором рН_c служили флуоресцеин диацетат и *бис*-карбоксифлуоресцеин диацетат. Как липид-растворимые эфиры эти соединения способны проникать через плазматическую мембрану внутрь клеток и превращаться в цитозоле в результате отщепления от них ацетильных групп под действием цитозольной эстеразы соответственно во флуоресцеин и *бис*-карбоксифлуоресцеин. Как заряженные флуорофоры они остаются локализованными в цитозоле и характеризуются выраженной рН-зависимостью спектров возбуждения и флуоресценции. На основании измерений интенсивности флуоресценции образцов при 530 нм, возбуждаемой при 440 (F₄₄₀) и 490 (F₄₉₀) нм, рассчитывали величину F₄₉₀/F₄₄₀ как меру рН_c. Пыльцевые зерна инкубировали в течение 15 мин в среде загрузки, содержащей 0, 3 М сахарозу, 25 мМ MES-Трис (рН 6, 9) и 5 мкМ рН-индикатора, отмывали их от нее и помещали в 1 мл буферной среды того же состава. Измерения флуоресценции образцов проводили на спектрофотометре Hitachi-850 (Япония) в стандартных 1 см-кюветах и без перемешивания суспензии пыльцевых зерен в ходе экспериментов.

Результаты и обсуждение

Пыльцевые зерна петунии содержат большую часть классических фитогормонов (ИУК, АБК, гиббереллины, цитокинины), а их прорастание в условиях *in vitro* сопровождается изменением их эндогенного уровня. Динамика содержания каждого из гормонов, присутствующих в зрелом и прорастающем *in vitro* мужском гаметофите, характеризуется индивидуальной специфичностью. Наиболее резкие изменения протерпевал уровень АБК: очень высокий исходный уровень падал практически до нуля уже через 2 ч культивирования. Содержание гиббереллинов, наоборот, постоянно возрастало на протяжении 6 ч культивирования пыльцевых трубок. Уровни ИУК и цитокининов достигали максимума к концу второго часа их прорастания и падали к четвертому часу до уровня, который далее не менялся.

В ходе дальнейших экспериментов было установлено, что экзогенные фитогормоны влияют на прорастание и рост мужского гаметофита. Прорастающие *in vitro* пыльцевые трубки проявляли различную чувствительность к экзогенным фитогормонам (от 10⁻¹² М до 10⁻³ М). Наиболее заметно стимулировали прорастание пыльцевых зерен АБК и гиббереллин А₃, причем наиболее выраженное действие гормонов наблюдали при их относительно низких концентрациях (10⁻¹² М). Стимуляцию прорастания мужского гаметофита в присутствии ИУК наблюдали только при использовании достаточно низких концентрациях гормона (10⁻¹²- 10⁻¹⁰ М), тогда как ее высокие концентрации ингибировали этот процесс. Синтетический цитокинин 6-БАП, напротив, вызывал только подавление исследуемого процесса, причем характер его действия не зависел от концентрации препарата в среде культивирования. Максимальный стимуляторный эффект на рост пыльцевых трубок оказал гиббереллин А³. В присутствии 10⁻¹² М гиббереллина длина пыльцевых трубок через 6 ч их культивирования возрастала в 2 раза по сравнению с контролем (пыльцевые трубки, растущие при отсутствии гормона в среде культивирования). Меньший эффект оказывала АБК в той же концентрации: в этом случае длина пыльцевых трубок возрастала только в 1.5 раза. ИУК слабо стимулировала рост пыльцевых трубок, в то время как 6-БАП, напротив, существенно подавлял его.

В целом, полученные в данной работе результаты мы рассматриваем как доказательство того, что гормональный статус мужского гаметофита является, наряду с гормональным статусом спорофита, фактором, контролирующим его прорастание и рост. Очевидно, пыльцевое зерно несет полный набор фитогормонов, необходимых для его гидратации и прорастания на рыльце пестика, а далее его рост по проводниковой ткани столбика и завязи проходит под контролем гормонального статуса спорофита. Выявленное в настоящей работе стимулирующее действие некоторых из испытанных экзогенных синтетических аналогов фитогормонов на прорастание и рост пыльцевых трубок может говорить о том, что эндогенного уровня фитогормонов недостаточно для полной активации

данного процесса. Последний, очевидно, включает в себя запуск межклеточных взаимодействий мужского гаметофита со спорофитными тканями пестика, обеспечивающих его последующий рост (в случае совместимого опыления) или ингибирование (в случае самонесовместимого опыления).

Исходя из гипотезы о том, что механизмы трансдукции сигналов могут базироваться на транзиторных сдвигах тех или иных параметров ионного гомеостаза клеток пыльцевого зерна, мы поставили задачу выяснить, способны ли экзогенные фитогормоны вызывать временное нарушение ионного гомеостаза пыльцевых зерен, а именно гомеостатической регуляции их цитоплазматического рН. При этом мы исходили из того, что гормон-индуцированный сдвиг внутриклеточного рН в принципе может быть вовлечен в каскад событий, обуславливающих трансдукцию гормональных сигналов в системе пыльца-пестик как *in vivo*, так и *in vitro*. рН_c гидратированных пыльцевых зерен относительно быстро снижался под действием всех выбранных соединений, а затем постепенно возвращался к своему исходному значению. Прорастающие пыльцевые зерна в присутствии ИУК и АБК претерпевали относительно быстрое защелачивание цитозоля, которое в испытанном временном интервале практически не обращалось со временем. Вместе с тем ГК₃ вызывал закисление цитозоля, то есть эффект, подобный тому, что наблюдался в гидратированных пыльцевых зернах. Гормон-индуцированный щелочной сдвиг рН_c прорастающих пыльцевых зерен полностью подавлялся в присутствии ванадата, тогда как в отсутствие фитогормонов этот ингибитор не влиял на величину рН_c. Ванадат также заметно замедлял кинетику восстановления рН_c гидратированных пыльцевых зерен после гормон-индуцированного закисления цитозоля, приводил к значительному снижению рН_c тех же пыльцевых зерен в контроле и сильно ослаблял в них эффекты всех испытанных фитогормонов. На основании этих результатов предполагается, что физиологическое действие фитогормонов в данной системе включает в себя модуляцию рН_c, то есть временное нарушение гомеостатической регуляции рН цитозоля клеток пыльцевого зерна, которое может играть сигнальную роль в инициации дальнейших клеточных ответных реакций, запускаемых фитогормонами.

В целом полученные в работе результаты позволяют заключить, что внутриклеточный рН_c клеток пыльцевого зерна петунии чувствителен к действию фитогормонов, причем характер их влияния на рН_c существенным образом зависит как от их природы, так и от физиологического состояния этих растительных объектов. Представленные здесь данные дают основание предполагать, что гормон-индуцированный сдвиг рН_c пыльцевых зерен вовлекается в каскад событий, запускающих и обуславливающих процессы прогамной фазы оплодотворения.

Работа поддержана грантом РФФИ (06-04-48870).

Литература

1. *Franklin-Tong V.E.* Signalling and the Modulation of Pollen Tube Growth // *Plant Cell*. -1999. - vol.11.- P. 727-738.
2. *Lord E.M., Russell S.D.* The Mechanism of Pollination and Fertilization in Plant // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* - 2002. - vol.18. - P. 81-105.
3. *Feijo J.A., Malho R., Obermeyer G.* Ion dynamics and its possible role during *in vitro* pollen germination and tube growth // *Protoplasma*. -1995. - vol.187.- P.155-167.
4. *Dearnaley J.D., Levina N.N., Lew R.R., Heath I.B., Göring D.R.* Interrelationships between cytoplasmic Ca²⁺ Peaks, Pollen Hydration and Plasma Membrane Conductance during Compatible and Incompatible Pollination of *Brassica napus* Papillae // *Plant Cell Physiol.* -1997.-vol. 38.- P. 985-999.
5. *Geitmann A., Cresti M.* Ca²⁺ Channels Control the Rapid Expansion in Pulsating Growth of *Petunia hybrida* Pollen Tube // *J. Plant Physiol.* -1998. -vol. 152.- P. 439-447.
6. *Fan L.-M., Wang Y.-F., Wang H., Wu W.-H.* *In Vitro Arabidopsis* Pollen Germination and Characterization of the Inward Potassium Current in *Arabidopsis* Pollen Grain Protoplast // *J. Exp. Bot.* -2001. vol. 52.- P. 1603-1614.
7. *Скоробогатова И.В., Захарова Е.В., Карсункина Н.П., Куранов П.Б., Соркина Г.Л., Кислин Е.Н.* Изменение содержания фитогормонов в проростках ячменя в

онтогенезе и при внесении регуляторов, стимулирующих рост. *Агрехимия*.-1999.-№ 8.-С. 49-53.

8. *Kovaleva L., Zakharova E.* Hormonal Status of the Pollen-Pistil System at the Progamic Phase of Fertilisation after Compatible and Incompatible Pollination in *Petunia hybrida* L. // *Sex Plant Reprod.* -2003. -vol. 16.- P. 191-196.

9. *Ковалева Л.В., Захарова Е.В., Минкина Ю.В., Тимофеева Г.В., Андреев И.М.* Прорастание и рост *in vitro* мужского гаметофита петунии чувствительны к действию экзогенных гормонов и сопровождаются изменением эндогенного уровня фитогормонов // *Физиология растений*.2005. -том .52.- С.584-590.

Резюме

Прорастание мужского гаметофита в условиях *in vitro* сопровождается изменением эндогенного уровня гормонов и чувствительно к действию экзогенных гормонов. Физиологическое действие гормонов включает временное нарушение ионного гомеостаза пыльцевых зерен, а именно гомеостатической регуляции их цитоплазматического рН.

In vitro pollen grain germination is accompanied by changes in the levels of endogenous phytohormones and is sensitive to the treatment with exogenous phytohormones. The mechanisms of signal transduction in this system involve transient change in some parameters of ionic homeostasis in pollen grain cells, such as cytosolic pH.

Проростання чоловічого гаметофита в умовах *in vitro* супроводжується зміною ендогенного рівня гормонів і чутливо до дії екзогенних гормонів. Фізіологічна дія гормонів включає тимчасове порушення іонного гомеостазу пыльцевых зерен, а саме гомеостатичної регуляції їх цитоплазматичного рН.

КОВБАСЕНКО Р.В., ДЯЧЕНКО А.І., ДМИТРИЄВ О.П.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Київ, 03143 вул. акад. Заболотного, 148, e-mail: dmyt@voliacable.com*

ІНДУКЦІЯ СОМАКЛОНАЛЬНОЇ ВАРІАБЕЛЬНОСТІ У РОСЛИН ТОМАТУ

Мікроклональне розмноження рослин через калюсогенез дає унікальну можливість широко використовувати різноманітні селективні агенти для індукції соматклональної варіабельності. Це дозволяє значно прискорити відбір та розмноження необхідних ліній рослин з бажаними ознаками, зокрема стійких до збудників хвороб та шкідників з підвищеним фітоімунним потенціалом.

Хімічний метод захисту рослин у наш час став основним. Рентабельне землеробство без нього в сучасних умовах практично неможливе. Проте широке використання пестицидів забруднює навколишнє середовище. Їхня ефективність нерідко зменшується внаслідок виникнення нових вірулентних рас паразитів [1].

Ніякі пестициди неможливо замінити імунну систему рослин, а в певних випадках, навпаки, здатні її пригнічувати. Іншими словами, імунна система рослин сама потребує надійного захисту. Одним з найбільш перспективних і екологічно безпечних методів захисту рослин є індукування їх природної стійкості. Метод базується не на пригніченні фітопатогенів, що це має місце у випадку використання пестицидів, а на індукуванні імунного потенціалу рослин за тим зразком, як це має місце у природі [2].

Хоча традиційний селекційний процес, який включає гібридологічне схрещування і відбір елітних рослин в поколіннях, залишається основним, але одним з важливих напрямків селекційно-генетичної роботи є широке застосування біотехнологічних методів з використанням культури *in vitro* для створення вихідних форм рослин.

Метою роботи було вивчення можливостей різних регуляторів росту індукувати соматоклональну варіабельність у рослин томату (*Lycopersicon esculentum*).

Матеріали та методи

Використовували ряд сортів томату: Лагідний, Боян, Зорень та інші. Роботу з рослинами в культурі *in vitro* здійснювали за стандартизованими методиками [3, 4, 6, 7, 8]. Одержані рослини вирощували в тепличних та польових умовах за рекомендованими існуючими технологіями [5].

Результати та обговорення

На даний час існує достатня експериментальна інформація про мутагенну активність різних хімічних речовин [12, 13]. Так, Шевелуха з співр. вважають [14], що найбільш часто для цієї мети використовують етилен-метансульфонат і N-етилен-N-нітросечовину в якості мутагенів. Можуть також бути використані N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідин і N-нітрозометилсечовина.

В багатьох лабораторіях світу достатньо ефективно використовують різноманітні хімічні речовини, які проявляють сильну мутагенну активність. В результаті проведених досліджень отримані і успішно використовуються лінії і сорти картоплі, цибулі, томату, баштанних та інших сільськогосподарських культур. При роботі з хімічними мутагенами досить часто спостерігається їх токсична дія на ізольовані клітини і тому, як правило, використовують невисокі дози мутагенів, які, однак, справляють мутагенний ефект.

Для індукції калюсогенезу та стабілізації процесів регенерації з первинних калюсів (сегменти гіпокотилія і меристематичні тканини) нами були апробовані і модифіковані агаризовані живильні середовища Мурасіге і Скуга (МС) з додаванням 4 мг/л кінетину та ІОК. Серед них, для подальшої роботи, використовували найбільш морфогенні калюси.

При вивченні здатності до індукції мутагенезу ми зосередили увагу на п'яти фіторегуляторах, які досить широко використовуються у традиційному рослинництві, проявляють багатофункціональну дію і сприяють підвищенню стійкості до хвороб.

Це англійський препарат культар (діюча речовина – паклобутразол) використовується у вигляді 25 %-ного концентрату емульсії. У виробництві проводять дворазове обприскування яблуневих посадок для стимуляції утворення генеративних органів та підвищення врожайності.

Російський індуктор продуктивності рослин нарцис (діючі речовини – хітозан, бурштинова кислота, α –глутамінова кислота), що надходить на ринок у вигляді 8 %-ного водного розчину. Компоненти препарату проникають в рослинний організм, і перш за все, хітиназа і хітоназа активують роботу кореневої системи та листового асиміляційного апарату. Пролонговане підвищення імунітету до хвороб, несприятливих факторів середовища і регулююча дія (з'являється легко доступний етилен і азот, бурштинова і глутамінова кислоти вмикаються в обмін речовин рослинного організму) на фоні зниження шкідливості патогенів, забезпечує стабільний розвиток рослин протягом всього періоду вегетації, підвищення врожаю та його якості.

Фіторегулятор крезацин (95 %-ний порошок, д.р. триетаноламонієва сіль ортокрезеоцтової кислоти) стабілізує стан мембран і підвищує в них вміст вітамінів А і Е, які гальмують перекисне окислення ліпідів при низьких пошкоджуючи температурах. Він виявляє багатофункціональну дію – прискорює проростання насіння, підвищує висоту рослин, масу надземної частини і коренів, продуктивну кущистість, озерненість колосків, сприяє формуванню більших зернівок, підвищує стійкість рослин до несприятливих факторів середовища та захворювань. Цей регулятор має властивості, які підвищують морозостійкість рослин. При обробці ним посівів огірка відмічається покращення схожості на 20-50% та збільшення кількості жіночих квіток. Крезацин застосовується для обробки томату, винограду, картоплі, огірка, пшениці, ячменю, овса, рису, кукурудзи, тютюну та яблуні.

Німецький препарат пікс (5 %-ний водний розчин, діюча речовина мепікватхлорид) регулярно використовують для обприскування рослин бавовнику в процесі його вегетації з метою суттєвого прискорення дозрівання коробочок.

Російський біостимулятор фуrolан (98,9 %-на рідина, діюча речовина 2- (2-фурил) – 1,3-діоксолан), що використовується для весняного обприскування персика, сливи, черешні, аличі і абрикоса. Впливає на гормональний баланс рослин, змінюючи співвідношення фітормонів – стимуляторів і інгібіторів росту, речовин негормональної природи; активує біосинтез і транспортування метаболітів; підвищує водоутримуючу здатність листків; збільшує вміст лігніну в тканинах рослин, що сприяє підвищенню стійкості до ураження шкочочинними організмами.

Сумісне додавання запропонованих нами препаратів – регуляторів росту, зокрема культуру (0,020 мл/л) і нарцису (0,050 мл/л) до живильного середовища, що індукує процеси калюсогенезу, стимулювало мутаційний процес – утворення нового суцвіття складної китиці. Суцвіття – складна китиця формує більшу кількість плодів, таким чином зростає продуктивність культури. Новий, створений нами, сорт томату Хорів (свід. № 0744) по багатьох господарсько-важливих показниках переважає стандартний сорт Лагідний. Зокрема, загальна урожайність сорту складала понад 800 ц/га, маса товарного плода понад 130 г, а також встановлено вищий вміст сухих речовин, загального цукру і вітаміну С, що вказує на доцільність його широкого використання у виробництві [9]. Крім цього, він досить толерантний до ранньої сухої плямистості і фітофторозу.

При сукупному додаванні фіторегуляторів фуrolану (0,08 мг/л) і піксу (1,5 мг/л), до агаризованого живильного середовища за прописом МС в нашій модифікації, яке індукує процес калюсогенезу і морфогенезу в культурі *in vitro* стимулювало мутаційний процес – формування твердих плодів томату, пристосованих до більш тривалого транспортування та зберігання, а також можливості їх механізованого збирання комбайном. Робоча гіпотеза дослідження базувалася на вивченні можливостей цих двох діючих речовин, або їх можливих метаболітів, індукувати корисні мутації тому, що основне традиційне призначення даних фітостимуляторів – інтенсивна стимуляція процесів росту та дозрівання плодів, де, як нам здавалося, можливість індукції мутагенезу була більш, ніж достатньою. У процесі подальших ретельних відборів ліній в яких селекційно-генетична ознака – тверді плоди, мала домінуючий характер. Порівняння показників створеного нами нового сорту томату Бобрицький (свід. № 08115) по багатьох господарсько-важливим показникам, а особливо по твердості плоду, переважає стандартний сорт Лагідний [8]. Встановлено його досить високу толерантність до ураження фітофторозом і ранньою сухою плямистістю.

Розширюючи ще більше діапазон регуляторів росту для стабілізації ранньостиглості томату в якості селективних агентів використовували: для «поліпшення» можливої негативної дії етилену 0,4 мг/л нітрату срібла, 1,5 мг/л абсцизової кислоти, яка пригнічує ріст клітин, а також є інгібітором широкого спектру дії і робить можливим реалізацію активності інших фітормонів та 0,1 мг/л крезацину. Робоча гіпотеза базувалася на детальному вивченні можливостей „прориву” окремих клітин у невеликих калюсних агрегатах на фоні досить жорсткої депресивної ситуації, яка була викликана досить нестандартним складом живильного середовища. Нами отримані нові ранньостиглі сорти томату. Створений нами, сорт томату Борівський по багатьох господарсько-важливих показниках, зокрема по вмісту каротину, сухих речовин, вітамінів, а головне по ранньостиглості, переважає стандартний сорт Світанок [11]. За рахунок своєї індукованої ранньостиглості сорт встигає віддати досить значну частину свого урожаю, якщо проходить масований розвиток основних шкочочинних організмів.

Суміш фіторегуляторів росту у визначених нами дозах при додаванні до модифікованого нами мінерально-сольового агаризованого середовища за прописом МС при калюсогенезі індукує мутаційний процес генеративних органів рослин томату.

При проведенні наукових досліджень по індукції соматональної варіабельності рослин томату в культурі *in vitro*, необхідно відмітити, що для успішної роботи в цьому напрямку є кілька нюансів: оптимізація живильних середовищ для калюсогенезу і морфогенезу та підбір відповідних індукторів. Запропоновані нами індуктори соматональної варіабельності крезацин, абсцизова кислота, нітрат срібла, пікс, фуrolан, культуар і нарцис у визначеному діапазоні дають унікальну можливість успішно

«конструювати» рослини із суцвіттям складної китиці, стійких до хвороб, придатних для тривалого зберігання і транспортування, а також виділити ранньостиглі форми.

На нашу думку, результати цих досліджень можуть бути використані і на інших культурах для пошуку нових індукторів соматоклональної варіабельності рослин в культурі *in vitro* з метою подальшого одержання перспективних сортів і гібридів з господарсько-важливими ознаками.

Висновки

Фіторегулятори росту культар, нарцис, пікс, фуrolан і кразацин індукують соматоклональну варіабельність рослин томату в культурі *in vitro* та підвищують їх продуктивність та хворобостійкість. Обробка цими регуляторами дає можливість одержувати нові вихідні форми із господарсько-важливими ознаками, толерантними до збудників ранньої сухої плямистості і фітофторозу.

Література

1. Дмитрієв О.П. Фітоімунітет. В Зб. Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть. – 2001. – Т. 1. – С. 38-51.
2. Дмитрієв О.П. Індукування системної стійкості у рослин біогенними елісаторами // Збірник наук. праць Селекційно-генетичного Ін-ту. - 2008. – Одеса СГІ-НЦНС. - С. 256-265.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза. -М.: Наука, 1964. – 272 с.
4. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – 344 с.
5. Довідник по овочівництву і баштанництву. К.: Урожай, 1981. – 293 с.
6. Желтоножська Л.В., Мусіяка В.К., Ковбасенко В.М., Третяк С.В., Ковбасенко К.П. Методичні аспекти створення вихідних форм томата, толерантних до абіотичних факторів // Овочівництво і баштанництво. – 2002. – вип. 47. – с. 109-112.
7. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
8. Ковбасенко В.М. Особливості калюсогенезу помідорів// Овочівництво і баштанництво. – 1995. – вип. 40. – с. 25-26.
9. Ковбасенко Р.В., Ковбасенко К.П., Ковбасенко В.М. Індукція суцвіття складної китиці у томата// Овочівництво і баштанництво. – 2005. – вип. 51. – с. 260-263.
10. Ковбасенко Р.В., Ковбасенко В.М. Індукція твердості плода у томата// Науковий вісник національного аграрного університету. – 2008. – вип. 118. – с. 42-45.
11. Ковбасенко Р.В., Ковбасенко В.М. Індукція раннеспелості у томата// Современные тенденции в селекции и семеноводстве овощных культур. Традиции и перспективы. Материалы 1 Междунар. научно-практич. конференции. М. ВНИИССОК, 2008. – с. 302-304.
12. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 1990. – 296 с.
13. Шевелуха В.С. Рост растений и его регуляция в онтогенезе. М.: Колос, 1992. – 325 с.
14. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М.: Выс. шк., 2003. – 469 с.

Резюме

Експериментально підтверджена можливість індукції соматоклональної варіабельності рослин томата в культурі *in vitro* і отримання нових вихідних форм при використанні в якості селективних агентів фіторегуляторів росту - кразацин, пікс, фуrolан, культар і нарцисс.

Експериментально підтверджена можливість індукції соматоклональної варіабельності рослин томату в культурі *in vitro* і одержання нових вихідних форм при використанні в якості селективних агентів фіторегуляторів росту - кразацин, пікс, фуrolан, культар і нарцисс.

Experimentally confirmed a possibility of somaclonal variability induction of tomato plants *in vitro* and receiving some new initial forms by usage of selective agents of phytohormones - krezacin, piks, furolan, kultarr and narcissus.

КОЛОМІЄЦЬ Ю.В.¹, БУЦЕНКО Л.М.²

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, Україна, 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 15, e-mail: julyja@i.ua

² Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України Україна, Д 03680, Київ, вул. Заболотного, 154, e-mail: plant_path@ukr.net

КУЛЬТИВУВАННЯ ALOE VERA В УМОВАХ IN VITRO ТА ВИВЧЕННЯ ЇЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

Aloe vera широко використовується як в медицині, так і у косметології. У сучасній медицині використовують свіжий або консервований сік алое, а також біостимульований сік, як протизапальний засіб при внутрішніх і зовнішніх інфекціях, як лікувальний засіб при анеміях, туберкульозі, диспепсії, катарі, стоматитах. Сік алое використовують при псоріазі, радіаційному ураженні шкіри, СНІДі.

Біохімічний склад соку листків алое обумовлює широкий спектр його застосування. Алое містить антраценові глікозиди (емодин, алое-емодин, хризофанол, реін). До складу клітинного соку входять вуглеводи – глюкоза, фруктоза, галактоза, сахароза, а також водорозчинні вітаміни – В₁, В₂, С, РР, значна кількість органічних кислот – лимонної, ізолимонної, яблучної, коричної, саліцилової та жирних кислот, всі амінокислоти, крім метіоніну, у зв'язаному стані, а у вільному – відсутні цистеїн, цистин, гліцин та тирозин. З неорганічних елементів у соку алое присутня значна кількість Са, К, Р, Сl [3].

Підвищення інтересу до лікарських засобів на основі біологічно активних сполук природного (рослинного) походження зумовлене зростанням в сучасному світі мутагенів, що є однією з найбільших загроз здоров'ю і життю людини. Саме мутаційні пошкодження у клітинах є причиною багатьох захворювань, в тому числі і онкологічних, кількість яких постійно зростає. Оскільки значна кількість мутагенів є речовинами, без яких складно уявити життя сучасної людини, єдиним шляхом захисту від їхньої шкідливої дії залишається вживання сполук з антимуагенними властивостями. І тут у пригоді людині можуть стати давно відомі лікарські рослини, які містять багато корисних сполук і часто виявляють антимуагенну дію [1, 4].

Зростаючі потреби промисловості в натуральній рослинній сировині для потреб медицини забезпечує біотехнологія. Зокрема, значну частину біологічно активних сполук нині отримують із біомаси культивованих *in vitro* клітин лікарських рослин. Застосовуючи методи вирощування клітин, тканин і органів рослин у контрольованих умовах на штучних живильних середовищах, одержують рослинну біомасу у необмеженій кількості, її можна використовувати як лікарську сировину, бо вона є екологічно чистою, не забруднена хімічними добривами, пестицидами, гербіцидами, важкими металами, радіоактивними ізотопами тощо [2].

Метою нашої роботи було вивчення калюсогенезу та морфогенезу *Aloe vera* в умовах *in vitro* та виявлення антимуагенних властивостей соку із рослин, вирощених *in vitro*.

Для здійснення досліджень мікропагони *Aloe vera* стерилізували розчином 16,5% перекису водню. Простерилізовані мікропагони розрізали на шматочки і висаджували на модифіковані поживні середовища Мурасіге-Скуга (МС) для калюсогенезу МС1: 0,25 мг/л кінетину (Кін) + 0,5 мг/л індолілоцтової кислоти (ІОК), МС2: 4,0 мг/л Кін + 8,0 мг/л ІОК, МС3: 1,0 мг/л 6-бензиламінопурину (6-БАП) + 3,0 мг/л нафтілоцтової кислоти (НОК). Для індукції непрямого морфогенезу було використано три варіанти поживного середовища МС – МС4: 1,0 мг/л 6-БАП + 3,0 мг/л НОК, МС5: 2,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НОК + 0,1 мг/л ІОК, МС6: 0,05 мг/л 6-БАП. Пробірки переносили в світлову кімнату з заданими умовами: температура 25°C, 16-годинний фотоперіод, освітлення 3000 – 4000 лк. Для укорінення пагони висаджували на поживні середовища МС – МС7: 0,4 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л НОК + 2 мг/л індолілмасляної кислоти (ІМК) + 0,5 мг/л аденіну, МС8: 0,02 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л НОК + 0,1 мг/л ІОК. Після вирощування в стерильних умовах одержували сік із

листіків рослин. Мутагенні та антимутагенні властивості досліджували у стандартному напівкількісному тесті Еймса. Як тест-культури використали ауксотрофні за гістидином штами *Salmonella typhimurium* TA100 і *S. typhimurium* TA98. Як модельні мутагени використали біхромат калію (2,0 мг/мл) або N-нітро-N-нітрозогуанідін (0,1-мг/мл).

При культивуванні експлантів на поживних середовищах МС1, МС2 ознак утворення калюсу не виявлено, найкраще формування калюсу на експлантах *Aloe vera* спостерігалось на середовищі МС3, яке доповнене 1,0 мг/л 6-БАП і 3,0 мг/л НОК.

Для індукції непрямого морфогенезу в калюсній тканині *Aloe vera* змінювали концентрацію екзогенних гормонів в поживному середовищі. Калюси висаджували на поживне середовище МС, яке містило БАП, НОК, Кін, ІОК в різних концентраціях. Найкраще формування мікропагонів із морфогенного калюсу спостерігалось на середовищі МС5 з невисоким вмістом 6-БАП (0,05 мг/л), при відсутності ауксинів.

Частота формування морфогенного калюсу на даному середовищі сягала 51 – 58%. Найменша частота утворення морфогенної калюсної маси відмічалася на середовищі МС3, яке містило 3,0 мг/л НОК, 1,0 мг/л 6-БАП. При цьому частота формування не перевищувала 30%.

В процесі культивування на поверхні калюсу утворювалися зелені ділянки клітин, які через декілька тижнів розвивалися в морфологічно нормальні пагони. У калюсних ліній утворення повністю сформованих мікропагонів висотою до 3,5 – 5 см спостерігали на 24 – 31 день (рис. 1 А).



А



Б

Рис. 1. А – морфогенез в калюсній кальтурі *Aloe vera*;
Б – індукція соматичного ембріогенезу *Aloe vera*.

В наших дослідках мікропагони висаджували на свіжі модифіковані поживні середовища МС4, МС5 з додаванням 0,1 мг/л ІОК, 0,5 мг/л НОК, 2,0 – 0,05 мг/л 6-БАП. Поживне середовище для пагоноутворення містило речовину групи цитокинінів, яка сприяє інтенсивному утворенню соматичних ембріодів із клітин мікропагонів. За один цикл вирощування (30 діб) з одного мікропагона розвивалося 5 – 6 рослин-регенерантів (рис. 1 Б), що підтверджує перевагу клонального мікророзмноження перед звичайним розмноженням, оскільки із одержаних пагонів можна отримати необмежену кількість садивного матеріалу, знову розділяючи рослини-регенеранти, що утворилися, і пересаджуючи їх на нове поживне середовище (рис. 2 А).

Надалі рослини-регенеранти пересаджували на середовище для укорінення. Найкращі результати вкорінення *Aloe vera* відмічали на середовищі МС8, яке містить НОК в концентрації 0,5 мг/л. Утворення коренів спостерігали на 10 день культивування, довжина коренів сягала 2 мм, на 20 день культивування – 6 мм, на 35 день культивування сягала до 3 см (рис. 2 Б). Активного укорінення на інших модифікаціях середовища не спостерігали. Найнижчий відсоток укорінення рослин-

регенерантів спостерігався на середовищі МС7, доповненому аденином в концентрації 0,5 мг/л, ІМК – 2 мг/л.

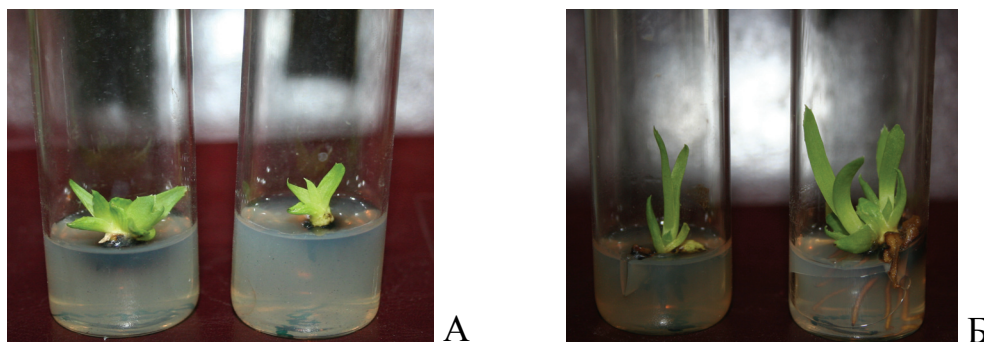


Рис. 2. А – Одержання рослин-регенерантів *Aloe vera*;
Б – укорінення рослин-регенерантів *Aloe vera* на середовищі МС8.

Наступним етапом нашої роботи було вивчення антимуутагенної активності соку *Aloe vera*.

Сік алое зменшує кількість спонтанних мутацій тест-штаму *S. typhimurium* ТА 100 на 33% і не впливає на кількість спонтанних мутацій тест-штаму *S. typhimurium* ТА 98. Сік алое не впливає на мутагенез, індукований біхроматом калію у обох тест-штамів. Так кількість мутацій у *S. typhimurium* ТА 100 за внесення біхромату калію становить $180,0 \pm 27,9$ колоній на чашку, а за внесення соку алое і біхромату калію $176,0 \pm 23,6$.

Сік *Aloe vera* виявив антимуутагенну активність щодо індукованого N-нітро-N-нітрозогуанідіном мутагенезу у тест-штаму *S. typhimurium* ТА 100. Кількість His⁺ ревертантів була $672,0 \pm 20,6$ колоній на чашку, а при додаванні соку алое зменшувалася на 52% до $325,0 \pm 19,8$ колоній His⁺ ревертантів на чашку.

Таким чином, нами запропоновані оптимальні концентрації регуляторів росту для калюсогенезу та морфогенезу. Встановлено, що сік алое *Aloe vera*, вирощеного в умовах *in vitro*, має антимуутагенну дію. Це може розширити сфери використання цього цінного продукту.

Література

1. Бариляк І.Р., Исаева А.В. Антимуутагенные и генопротекторные свойства препаратов растительного происхождения // Цитология и генетика. – Т. 28, №3. – С. 3 – 17.
2. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи: Моногр. / В.А. Кунах; НАН України. Ін-т молекуляр. біології і генетики. – К.: Логос, 2005. – 724 с.
3. Гайдаржи М.М. Сучасний стан та перспективи використання соку листків алое, гастерій та гавортій // Фітотерапія. – 2004. - №1. – С. 47 – 51.
4. Джуренко Н.І., Паламарчук О.П., Ващенко Л.М. Антимуутагенна активність рослинних субстанцій // Фітотерапія. – 2006. - №2. – С. 63 – 67.

Резюме

Досліджено особливості калюсогенезу і регенерації рослин у культурі ізолюваних тканин *Aloe vera*. Показано вплив на ці процеси складу поживного середовища. Сік *Aloe vera* виявив антимуутагенну активність щодо індукованого N-нітро-N-нітрозогуанідіном мутагенезу у тест-штаму *S. typhimurium* ТА 100. Кількість His⁺ ревертантів при додаванні соку алое зменшувалася на 52%.

Исследованы особенности каллюсогенеза и регенерации растений в культуре изолированных тканей *Aloe vera*. Показано влияние на эти процессы состава питательной среды. Сок *Aloe vera* проявил антимуутагенную активность к индуцированному N-нитро-N-нитрозогуанидином мутагенеза у тест-штамма *S. typhimurium* ТА 100. Количество His⁺ ревертантов при добавлении сока алоэ уменьшалось на 52%.

The peculiarities of callusogenesis and plant regeneration in isolated tissue culture of *Aloe vera* have been investigated. The influence of nutrient medium composition on these processes was shown. Juice of *Aloe vera* can reduce the frequency of induced by N-nitro-N-nitrosoguanidine mutations *S. typhimurium* TA 100. Juice of *Aloe vera* reduce the induced mutagenesis *S. typhimurium* TA100 on 52 %.

КОРНЯ Т. М., ИГНАТОВА С. А.

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН

Украина, 65036, Одесса, ул. Овидиопольская дорога 3, e-mail: odonata@mail.ru

МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОТБОРА IN VITRO ТОЛЕРАНТНЫХ К ФИЛЬТАТУ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБА FUSARIUM GRAMINEARUM SCHWABE ОБРАЗЦОВ

Одними из важных критериев селекции при создании качественного зерна пшеницы являются: продуктивность колосьев, устойчивость к полеганию, гербицидам, засухе, низким температурам и, конечно же, к болезням [1]. *Fusarium graminearum* Schwabe – возбудитель фузариоза колоса пшеницы, при котором потери урожая достигают в годы эпифитотий более 50%, при этом зерно становится непригодным для дальнейшего производства продуктов питания, в первую очередь из-за его низкого качества и содержащихся в зерне микотоксинов. Токсины разных штаммов данного гриба не разрушаются при обычной термической обработке в процессе приготовления пищи и способны вызывать тяжелые токсикозы, как у животных, так и у человека [2,3]. *F. graminearum* – представитель несовершенных грибов Deuteromycetes [4]. Патоген широко распространен в почве, способен наносить существенный вред сельскохозяйственным растениям [5]. В Одесском регионе по данным фитопатологов непатогенные и слабопатогенные изоляты фузариевых грибов способны вызывать чрезмерный рост растений, в то время как сильнопатогенные штаммы существенно сокращают количество и качество урожая [6]. Экологически чистым способом борьбы с фузариозом является создание устойчивых сортов. Однако селекция устойчивых к грибным патогенам сортов пшеницы длится около 10 лет. Поэтому для сокращения сроков создания устойчивых форм на некоторых этапах отбора целесообразным является применение методов биотехнологии, а именно – селекции *in vitro* и метода культуры пыльников пшеницы, что основывается на феномене андрогенеза [7,8].

В литературе описаны методы клеточной селекции с применением культуральных фильтратов, что дает возможность получать устойчивые к болезням растения с новыми ценными признаками [9,10]. Перспективным направлением селекции *in vitro* является метод гаплоидии или культуры пыльников [8], позволяющий создавать стабильные формы удвоенных дигаплоидов на селективном фоне патогена, что имеет ряд преимуществ. Однако регенерация растений мягкой пшеницы в культуре пыльников остаётся все еще низкой, поэтому актуальным для повышения эффективности создания толерантных форм пшеницы на селективном фоне является подбор питательных сред и условий культивирования пыльников пшеницы в присутствии селективного фактора.

Культивирование различных эксплантов пшеницы на таком селективном фоне как фильтрат культуральной жидкости (ФКЖ) *F. graminearum* в оптимальной концентрации направлено на получение толерантных к метаболитам гриба регенерантов. Вследствие этого необходимым является подбор концентрации в питательной среде ФКЖ *F. graminearum* для культивирования соматических эксплантов контрастных по полевой устойчивости сортов пшеницы для последующего использования данного уровня селективного фона в лабораторной оценке и отборе в условиях *in vitro* на устойчивость к фузариозу колоса. Ответ растения на действие культурального фильтрата в *in vitro* условиях проявляется в морфогенетических реакциях его эксплантов. Вследствие этого, целью работы было

изучение морфогенеза эксплантов пшеницы разного уровня растительной организации под влиянием ФКЖ *F. graminearum*.

Материал и методика

Материалом для выделения эксплантов служили 3 разных по полевой устойчивости к фузариозу колоса сорта мягкой пшеницы: Обрий (устойчивый), Фантазия одесская (среднеустойчивая) и Одесская полукарликовая (восприимчивый).

Эксплантами служили изолированные пыльники, зрелая пыльца, зрелые и незрелые изолированные зародыши. В качестве селективного агента использовали ФКЖ слабо- (*ab*) и сильнопатогенного (*5b*) штаммов *Fusarium graminearum*.

Приготовление культуральных фильтратов проводили после предварительной реактивации гриба на проросших семенах пшеницы и последующим посевом его мицелия на стандартную среду Чапека по описанной ранее методике [11]. Для культивирования зрелой пыльцы использовали концентрацию 15% ФКЖ. В среду 190-2 для культивирования пыльников ФКЖ добавляли в концентрациях 15% и 30% после автоклавирования питательной среды. В культуре незрелых зародышей использовали 50%- концентрацию ФКЖ. С целью определения природы селективного фактора ФКЖ вносили в питательную среду MS для культивирования зрелых зародышей в объёме 50% до и после автоклавирования питательной среды.

Результаты и их обсуждение

В результате исследований было выявлено ростостимулирующее влияние неавтоклавированных ФКЖ обоих штаммов на длину проростка зрелых зародышей устойчивого сорта Обрий. ФКЖ, которые не обрабатывали термически, стимулировали образование раневого каллуса у исследуемых сортов в культуре изолированных зрелых зародышей. При добавлении ФКЖ *F. graminearum* в первичную индукционную среду MS для культивирования незрелых зародышей отмечено положительное влияние на частоту регенерации зелёных растений только устойчивого сорта (табл. 1).

Таблица 1

Воздействие ФКЖ *F. graminearum* на разные признаки растения мягкой пшеницы в культуре *in vitro*

Сорта мягкой пшеницы	Обрий (устойчивый)		Фантазия одесская (среднеустойчивый)		Одесская полукарликовая (восприимчивый)	
	Навт	Авт	Навт	Авт	Навт	Авт
Варианты ФКЖ						
Исследуемый признак						
Прорастание изолированных зрелых зародышей	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	–	–
Частота образования раневого каллуса в культуре зрелых зародышей	+	Нет влияния	+	Нет влияния	+	Нет влияния
Длина проростка	+	Нет влияния			Нет влияния	Нет влияния
Длина корешка	Нет влияния	Нет влияния			–	–
Регенерация зеленых растений в культуре незрелых зародышей	+	+	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния	Нет влияния
Прорастание пыльцы	Нет влияния		–		–	

Примечание:

Навт – неавтоклавированный ФКЖ;

«-» – достоверное отрицательное влияние ($p < 0,05$)

Авт – автоклавированный ФКЖ;

«+» – достоверное положительное влияние ($p < 0,05$);

ФКЖ двух штаммов *F. graminearum* независимо от термической обработки ингибировали рост главного корешка восприимчивого к фузариозу колоса сорта Одесская полукарликовая. Отрицательное влияние было также отмечено на прорастание зрелых зародышей восприимчивого сорта. ФКЖ двух штаммов подавлял прорастание пыльцевой трубки в культуре *in vitro* зрелой пыльцы. На уровне зрелого пыльцевого зерна были выявлены различия по степени воздействия ФКЖ сильно- и слабопатогенного штаммов у разных по устойчивости к фузариозу колоса сортов. При этом ФКЖ сильнопатогенного штамма в значительной мере подавлял образование пыльцевой трубки у среднеустойчивых сортов и практически полностью ингибировал прорастание пыльцы восприимчивого сорта.

При добавлении в индукционную среду для культивирования пыльников ФКЖ в зависимости от концентрации и от штамма гриба отрицательно влиял на частоту появления новообразований у всех сортов. На этапе регенерации растений из каллусов устойчивого сорта Обрий были получены зелёные растения практически на всех вариантах с ФКЖ; у среднеустойчивого сорта Фантазия одесская – на низких концентрациях с ФКЖ двух штаммов; у сорта Никония – только на контрольной питательной среде и на среде с низкой концентрацией ФКЖ слабопатогенного штамма. Не получено ни одного зелёного растения-регенеранта на селективных средах с ФКЖ у восприимчивого сорта Одесская полукарликовая. ФКЖ двух штаммов положительно влиял на частоту появления регенерационноспособного каллуса у среднеустойчивых и устойчивых сортов и большинства гибридных комбинаций (табл. 2).

Таблица 2

Воздействие неавтоклавированного ФКЖ *F. graminearum* на морфогенез эксплантов мягкой пшеницы в культуре *in vitro* пыльников

	Обрий (устойчивый)	Фантазия одесская (среднеустойчивый)	Одесская полукарликовая (восприимчивый)
Индукция новообразований в культуре пыльников	–	–	–
Процент морфогенного каллуса в культуре пыльников	+	+	–
Регенерация зеленых растений	Регенерация практически на всех вариантах	Регенерация <u>отсутствует</u> на высоких концентрациях ФКЖ	Регенерация <u>отсутствует</u>

Примечание:

«+» – достоверное положительное влияние ($p < 0,05$);

«-» – достоверное отрицательное влияние ($p < 0,05$)

Анализируя полученные данные можно заключить, что положительное влияние неавтоклавированных ФКЖ на уровне образования раневого каллуса, роста проростков в культуре изолированных зародышей, а также повышения морфогенного каллуса в культуре пыльников и изолированных незрелых зародышей связаны с содержанием в ФКЖ неких веществ гормональной природы. Можно сделать предположение о содержании в них гормонов гибберелловой группы. Отрицательное влияние ФКЖ независимо от его термической обработки на параметры роста и прорастания зрелых зародышей и морфогенетический потенциал восприимчивого сорта Одесская полукарликовая указывает на возможное наличие в ФКЖ термостабильных веществ, как, например, фузариевых микотоксинов.

Использование селективного фактора в виде ФКЖ представляет интерес, поскольку он способен положительно влиять на экспланты разных уровней

организации устойчивых к фузариозу колоса форм пшеницы и одновременно подавлять морфогенез восприимчивых образцов. Данное свойство культурального фильтрата может быть использовано при моделировании условий отбора в биотехнологических системах *in vitro* устойчивых к *F. graminearum* форм мягкой пшеницы.

Литература

1. Пшеницы мира / В. Ф. Дорофеев, Р. А. Удачин, Л. В. Семенова и др.; Под ред. акад. В. Ф. Дорофеева; Сост. Р.А. Удачин. – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: ВО Агропромиздат. Ленингр. Отд-ние, 1987. – 560 с.
2. *Доброзракова Т. Л.* Сельскохозяйственная фитопатология / Под ред. д. б. н. М. К. Хохрякова. – Л.: отд. изд-ва «Колос», 1966 – 328 с.
3. Определитель паразитных грибов на плодах и семенах культурных растений / А. Я. Семенов, Л. П. Абрамова, М. К. Хохряков. – Л.: Колос. Ленингр. отд-ние, 1980 – 302 с.: ил.
4. *Билай В. И.* Фузариозы. Изд-е второе дополн., АН УССР Ин-т микробиологии и вирусологии им Д. К. Заболотного. – К.: «Наукова думка», - 1977. - 442 с.
5. *Волощук Г. Д.* Суспензійна культура пшениці *Triticum aestivum* L. та її використання в генетико-селекційних дослідженнях: Автореферат дис. .. канд. біол. наук. 03.00.12/ Інститут фізіології рослин і генетики НАНУ. – К., 2000. - 19 с.
6. *Бабаянц О. В.* Видовой состав и вредоносность микробиоты колосьев озимой пшеницы южной степи Украины // Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей» СГИ-НЦСС. – Одесса, 2007. – С. 42.
7. *Sunderland N.* Anther and pollen culture // Proceed. IV John Innes Sympos. "The plant genome". Norwich, 1980, P. 171-183.
8. *Wolf-Hall C.E., Hanna M.A., Bullerman L.B.* Stability of deoxynivalenol in heat-treated foods // J. Food Prot. – 1999. – V.62. – N 8. – P.962–964.
9. *Bruins M.B.M.* Fusarium Head Blight resistance in wheat. Wageningen, – 1998. – 131 p.
10. *Корня Т. М., Ігнатова С. А.* Вивчення селективних властивостей фільтрату культуральної рідини *Fusarium graminearum* Schwabe в культурі пиляків м'якої пшениці // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2008. – вип. 3(15), С. 99-106
11. *Бавол А. В., Дубровна О. В., Лялько І. І.* Цитогенетичний та молекулярно-генетичний аналіз клітинних ліній м'якої пшениці, стійких до культурального фільтрату *G. graminis var. tritici* // Геном рослин. Українське товариство генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова ПБЦ УААН: Зб. наук. статей. – Одеса, 2008. – С. 45-48

Резюме

Показано, что селектирующим агентом в ФКЖ *F. graminearum* являются вещества, претерпевающие термическую обработку. Отмечено стимулирующее влияние не подвергнувшегося высоким температурам ФКЖ на рост проростка, образование раневого каллуса в культуре зародышей и долю регенерационноспособных новообразований в культуре пыльников мягкой пшеницы.

Показано, що селектуючим фактором в ФКР *F. graminearum* є речовини, що витримують термічну обробку. Відзначено стимулюючий вплив ФКР, що не підлягли впливу високих температур, на довжину паростків, появу раневого калюсу в культурі зародків і відсоток регенераційноспроможних новоутворень в культурі пиляків м'якої пшениці.

Results of the experiments were shown that the inhibition of germination of the isolated mature embryos and repression of the length of main root at the susceptible cultivars did not depend on the thermal processing investigated CLF. Positive influence CLF on frequency of regeneration of green plants from quantity of newformations in comparison to the control that

was observed on different variants CLF depending on the genotype of an investigated material of wheat was noticed.

КРУГЛОВА Н.Н.

Институт биологии Уфимского НЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: Kruglova@anrb.ru

К ПРОБЛЕМЕ УНИФИКАЦИИ ТЕРМИНОЛОГИИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОТЕХНОЛОГИИ АНДРОКЛИННОЙ ГАПЛОИДИИ *IN VITRO*

Современные инновационные биотехнологии растений во многом базируются на данных клеточной биологии и клеточной инженерии *in vitro*. Приоритетное направление в этой области – метод культуры *in vitro* пыльников, приводящий к формированию гаплоидных растений-регенерантов из микроспор/клеток пыльцевого зерна. К настоящему времени в этой области накоплен значительный фактический материал (например, по хозяйственно ценным злакам [Сатарова, 2002; Игнатова, 2004; Белинская, 2007; Бишимбаева, 2007]). Необходима, тем не менее, дальнейшая разработка методологических основ изучения культуры *in vitro* пыльников. Одна из самых важных проблем в этой области – унификация используемой терминологии.

Материал и методы

Цель данной работы – проанализировать терминологию, используемую при культивировании пыльников *in vitro*, на примере яровой мягкой пшеницы. Метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы разработан в лаборатории экспериментальной эмбриологии растений Института биологии Уфимского НЦ РАН в творческом содружестве с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН (г. Санкт-Петербург, зав. лабораторией – член-корр. РАН Т.Б.Батыгина) и с лабораторией селекции яровой пшеницы Селекционного центра по растениеводству Башкирского НИИ СХ РАСХН (г. Уфа, зав.лабораторией – к. с.-х. н. В.И.Никонов) [Круглова, Батыгина, 2002; Круглова с соавт., 2005; Круглова, Сельдиминова, 2008]. За основу был взят метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы в разработке кафедры генетики Саратовского государственного университета (зав. кафедрой – проф. В.С.Тырнов) [Суханов, Тырнов, 1976; Суханов, 1983].

Результаты и обсуждение

Рассмотрим используемую терминологию с позиции эмбриологии растений.

Для обозначения самого феномена образования гаплоидного растения-регенеранта в культуре *in vitro* пыльников используются различные термины: «пыльцевой эмбриогенез», «пыльцевой андрогенез», «микроспориальный эмбриогенез», «андрогенный эмбриогенез», «экспериментальный андрогенез», «гаплоидный андрогенез», «экспериментальная гаплоидия», «экспериментальная андроклиния» и наиболее часто, особенно в западной литературе, – «андрогенез *in vitro*» («androgenesis *in vitro*»). Мы предлагаем активно использовать предложенный С.С.Хохловым [1976] термин «андроклиния» (от греч. *ανδρος* – мужской, *κλίνας* – имеющий склонность) как наиболее верно отражающий суть явления. Применять же распространенный термин «андрогенез *in vitro*» некорректно. Нельзя не согласиться с мнением В.С.Тырнова [1998, 2005] о том, что, согласно существующей терминологии, биолог (как ботаник, так и зоолог) подразумевает под «андрогенезом» («мужским партеногенезом») развитие нового организма из гаметы – спермия. Немаловажно и то, что андрогенез в его классическом значении связан с аллоплазматическим состоянием организма (особь имеет материнскую цитоплазму и отцовское ядро), тогда как при так

называемом андрогенезе *in vitro* новый организм имеет ядро и цитоплазму только одной особи.

Важнейшая проблема в изучаемой области связана с понятием «инициальная клетка андроклинии» – той клетки пыльника, которая в условиях культуры *in vitro* дает начало растению-регенеранту. Это производная клетки спорогенной ткани пыльника, гаплоидной природы (после мейотического деления), находящаяся в критической фазе развития, во время которой клетка морфогенетически компетентна к смене программы развития. Так, оптимальная для индукции андроклинии спорогенная клетка яровой мягкой пшеницы находится в фазе сильновакуолизированной микроспоры [Круглова, 2002; Круглова с соавт., 2005] (согласно периодизации [Круглова, 1999]). В то же время в литературе приводятся данные и о других фазах развития микроспор злаков (в том числе пшеницы), а также клетках пыльцевых зерен злаков, проявивших свойства инициальных клеток андроклинии.

Во многом реализация потенциала инициальных клеток андроклинии определяется их тотипотентностью (термин предложен G. Haberlandt [1909]; понятие разработано в цикле работ Р.Г.Бутенко ([1994 и др.] и Т.Б.Батыгиной [1986 и др.]). Инициальные клетки андроклинии предложено рассматривать и в аспекте проблемы стволовых клеток, поскольку для них характерны свойства стволовости (определенная степень тотипотентности, длительное пребывание в покое (интерфазе) перед переходом к пролиферации и способность к переключению программы развития с гаметофитной на спорофитную, т.е. переключению способа репродукции с полового на бесполой) [Батыгина, Рудский, 2006].

В процессе культивирования реализуются два пути морфогенеза инициальных клеток андроклинии – эмбриоидогенез и каллусогенез, через этап образования эмбриоида и каллуса, соответственно [Круглова с соавт., 2005; и др.]. Следует отметить, что нет единого мнения и в отношении термина, общего для эмбриоидов и каллусов. Например, зачастую их объединяют термином «новообразования», по-видимому, неточным, так как этот термин уже «занят» в медицине. Мы предлагаем использовать объединяющий термин «андроклинные структуры».

Проблема образования эмбриоидов и каллусов в культивируемых пыльниках связана с переключением развития инициальных клеток с обычного для них гаметофитного пути на спорофитный путь развития. Для обозначения клеток пыльника, морфогенетически компетентных к такому переключению, используются такие термины, как «спорофитная пыльца» («sporophytic pollen»), «андрогенная пыльца» («androgenic pollen»), S-пыльца (от англ. small – мелкий), P-пыльца (от англ. premeiotic – премейотический), «андрогенная микроспора» («androgenic microspore»). По-видимому, все эти термины имеют право на существование (в редакции, например, «андроклинная пыльца», «андроклинная микроспора»). Мы предлагаем пользоваться термином «морфогенная микроспора (пыльца)».

У пшеницы именно морфогенная микроспора на начальных этапах культуры *in vitro*, как правило, под действием стрессовых факторов претерпевает равное митотическое деление, аномальное по отношению к неравному делению при формировании пыльцевого зерна. Аномальное равное деление как принципиальный начальный этап морфогенеза микроспоры по спорофитному пути ведет к формированию двуклеточной структуры. В результате многократных митотических делений каждой из клеток образовавшейся двуклеточной структуры формируется многоклеточная структура – группа клеток, располагающихся в пределах одной неповрежденной оболочки инициальной клетки андроклинии. Для обозначения этой группы клеток предложено немало терминов: «эмбриоподобная микроскопическая структура», «индуцированная микроструктура», «многоклеточная пыльцевая единица», «многоклеточная масса», «микроструктура-синцитий», «потенциальная эмбриогенная клеточная масса», «многоклеточный агрегат», «эмбриогенная клеточная масса»,

«многоклеточная андрогенная масса» и, наконец, наиболее употребимый термин - «многоклеточное пыльцевое зерно». На наш взгляд, корректно называть данную группу клеток «многоклеточной структурой». Многоклеточная структура – обязательный этап формирования и эмбриоидов и каллусов при культивировании пыльников *in vitro*.

Эмбриоид (embryoid) – зародышеподобная биполярная структура, образующаяся асексуально; зачаток нового растительного организма [Батыгина, 2000]. Термин предложен I.Vasil, A.C.Hildebrandt [1966] для обозначения зародышеподобных структур, возникающих как *in vivo* («нуцеллярные» и «фолиарные» зародыши), так и *in vitro*. Термин «эмбриоидогенез» соответствует термину «соматический эмбриогенез», предложенному рядом авторов (например, Б.П.Токиным [1969]) для обозначения развития целых организмов из соматических клеток. При исследовании эмбриоидов, образовавшихся в процессе культивирования изолированных пыльников, употребляются термины «андрогенный зародыш» («androgenic embryo»), «глобулярный пыльцевой зародыш» («globular pollen embryo»). На наш взгляд, эти термины неприемлемы. Применяемый же термин «пыльцевой эмбриоид» («pollen embryoid») корректнее. Термин «эмбриоподобная структура» («embryo-like structure») удачен, но не отражает происхождения этой структуры. Мы предлагаем использовать термин «микроспориальный эмбриоид» («microsporial embryoid») по аналогии с понятием «зиготический зародыш».

При каллусогенезе инициальная клетка андроклинии сначала формирует недифференцированный каллус. После переноса на питательную среду, индуцирующую органогенез, в каллусе отмечаются процессы ризогенеза, геммогенеза, гемморизогенеза и эмбриоидогенеза. В культуре *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы только два процесса ведут к желаемому результату – образованию растений-регенерантов – гемморизогенез и эмбриоидогенез [Круглова с соавт., 2005].

Несмотря на достаточную длительную историю изучения каллусогенеза как в условиях *in vivo*, так и в условиях *in vitro*, однозначного определения каллуса не предложено. Так, Т.Б.Батыгина [1986] под каллусом понимает гетерогенную интегрированную структуру (систему), образующуюся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного организма; как правило, каллус формируется из исходно разных клеток генеративных и вегетативных органов; состоит из групп неоднородных клеток, имеющих различные морфогенетические потенции, которые реализуются различными путями (эмбриоидогенез, органогенез, гистогенез). Для характеристики каллуса, возникшего в культуре изолированных пыльников, по-видимому, имеет смысл согласиться с терминами «микроспориальный каллус» («microsporial callus»), «пыльцевой каллус» («pollen callus») в редакции «андроклинный каллус» («androclinic callus»). На наш взгляд, термин «андрогенный каллус» («androgenic callus») не вполне допустим, поскольку, как указывалось выше, необходимо различать понятия «андрогенез *in vitro*» и собственно «андрогенез».

Выводы

Важность унификации терминологии, используемой в любой отрасли науки, очевидна. Безусловно прав L. van der Pijl [1969], полагая, что дифференциация терминов – это не просто игра словами, но совершенно необходимое условие, чтобы разобраться в природе вещей. Перспективный подход, позволяющий решить ряд остродискуссионных терминологических вопросов при разработке биотехнологии андроклинной гаплоидии, - применение данных эмбриологии растений.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (гранты 05-04-97911, 08-04-97045), а также по программе «Ведущие научные школы РФ» (гранты НШ 4834.2006.4, НШ 2096.2008.4, лидер Школы – чл.-корр. РАН Т.Б.Батыгина).

Литература

1. Батыгина Т.Б. Хлебное зерно.– Л. – 1986. – 103 с.
2. Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление растений //

- Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции. Т. 3: Системы репродукции. – СПб. – 2000. – С. 35-39.
3. Батыгина Т.Б., Рудский И.В. Роль ствольных клеток в морфогенезе растений // Доклады Академии наук. – 2006. – Т. 410, № 5. – С. 1-3.
 4. 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.
 5. Бишимбаева Н.К. Цитофизиологические основы биотехнологии длительной регенерации растений в культуре тканей зерновых злаков: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Алматы. – 2007. – 37 с.
 6. Бутенко Р.Г. Клеточные и молекулярные аспекты морфогенеза растений *in vitro* // I Чайлахяновские чтения. – Пушкино. – 1994. – С. 7-26.
 7. Игнатова С.А. Биотехнологические основы получения гаплоидов, отдаленных гибридов и соматических регенерантов зерновых и бобовых культур в различных системах *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Одесса. – 2004. – 48 с.
 8. Круглова Н.Н. Периодизация развития пыльника злаков как методологический аспект изучения андрогенеза *in vitro* // Известия РАН. Серия биол. – 1999. – № 3. – С.275-281.
 9. Круглова Н.Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. – Уфа: Гилем, 2001. – 175с.
 10. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб. – 2002. – 48 с.
 11. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа. – 2002. – 22 с.
 12. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Горбунова В.Ю., Титова Г.Е., Сельдимирова О.А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. – М. – 2005. – 99 с.
 13. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А. Регенерация пшеницы *in vitro* и *ex vitro*. – Уфа. – 2008. – 139 с.
 14. Сатарова Т.Н. Андрогенез и эмбриокультура у кукурузы *in vitro*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Киев. – 2002. – 41 с.
 15. Суханов В.М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1983. – 24 с.
 16. Суханов В.М., Тырнов В.С. Получение гаплоидов *in vitro* из гаметических клеток // Гаплоидия и селекция. – М.: Наука, 1976. – С. 99-110.
 17. Токин Б.П. Бесполое размножение, соматический эмбриогенез и регенерация // Журн. общ. биол. – 1969. – Т. 30, № 1. – С. 15-21.
 18. Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: Научное и прикладное значение. – М. – 1998. – 53 с.
 19. Тырнов В.С. Гаплоидия у растений: терминология и классификация. – Саратов. – 2005. – 41 с.
 20. Хохлов С.С. Общие вопросы гаплоидии // Гаплоидия и селекция. – М. – 1976. – С. 5-14.
 21. Haberlandt G. Physiologische Pflanzenanatomie. – Leipzig. – 1909. – 650 S.
 22. Pijl L. van der. Principles of dispersal in higher plants. – Berlin. – 1969. – 169 p.
 23. Vasil I., Hildebrandt A.C. Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. I. *Cichorium endivia* // Amer. J. Bot. – 1966. – V. 53, № 9. – P. 869-874.

Резюме

С позиции эмбриологии растений проанализирована используемая терминология как методологическая сторона разработки инновационной биотехнологии

андроклинной гаплоидии яровой мягкой пшеницы. Предложены некоторые термины.

By the position of plant embryology the using terminology as the methodological base of elaboration of innovation biotechnology of spring soft wheat androclinal haploidy has been analyzed. The some terms have been proposed.

ЛЬОШИНА Л.Г., БУЛКО О.В., ГАЛКІН А.П.

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України,

Україна, 02660, Київ, вул. Мурманська, 1, e-mail: llioshiba@ukr.net

ОТРИМАННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛУСНОЇ І СУСПЕНЗІЙНОЇ КУЛЬТУРИ БАРВІНКА МАЛОГО *VINCA MINOR L.*

Для лікування багатьох хвороб споконвіку використовуються активні компоненти лікарських рослин. При нестачі лікарської сировини створюють їх синтетичні аналоги. Недоліком синтетичних препаратів порівняно з натуральними є те, що вони можуть викликати небажані побічні ефекти і гірше переносяться організмом. Тому виділення активних компонентів з лікарських рослин є достатньо актуальним завданням. Окрім нативних рослин, для цього можливе використання культури клітин *in vitro*. Перевагою речовин, виділених із культури клітин, є те, що вони екологічно чисті і вирощування їх біомаси не залежить від умов навколишнього середовища.

Для роботи нами обрана лікарська рослина - барвінок малий (*Vinca minor L.*), що є лікарською рослиною, яка продукує ряд речовин, важливих для фармакологічної промисловості. В траві виявлено близько 30 алкалоїдів індолюного ряду (вінін, вінкамін, пубесцин, мінорин і ін.), а також кислоти (урсолова і аскорбінова), вініцилін, кемпферол, дубильні і гіркі речовини, флавоноїди, сапоніни, рутини, каротин, вітамін С, цукор і т.д. Одним з найважливіших алкалоїдів є вінкамін, який первинно знайдено в листях [1]. Вінкамін і його похідні виробляються деякими фармацевтичними компаніями в Європі і Японії у складі препаратів, що поліпшують мозковий кровообіг, мають заспокійливу, гіпотензивну, судинорозширювальну, кровоспинну, протимікробну і в'язучу властивості. Але *V. minor* - багаторічна рослина, яка повільно росте, окрім того, рослина зазвичай розмножується живцями, а не насінням, тому кількість рослин, які можуть бути отримані одночасно, обмежена. Внаслідок цього інтерес до отримання культури клітин досить обґрунтований. Були спроби культивування калусу, який би продукував вінкамін у помітних кількостях [2,3], проте однозначного збільшення виходу вінкаміну в недиференційованій культурі досягнуто не було. Тому подальші експерименти по підвищенню продуктивності клітинних культур барвінку малого актуальні й на сьогоднішній день.

Матеріали і методи

Для введення в культуру *in vitro* фрагменти стебла й листа нарізали шматочками по 1 см, промивали в проточній воді 30 хв, обполіскували 70% етиловим спиртом і занурювали на 5 хв. в 0,1% HgCl₂. Потім відмивали стерильною дистильованою водою й поміщали на безгормональне середовище MS у світловий блок при T 27±2°C і 16-годинному фотоперіоді (2000-2500 люкс). Калусогенез був ініційований з листових експлантів, отриманих з асептичних рослин, на середовищі з додаванням 1мг/л 2,4-Д + 1мг/л кінетину при інкубації в темряві при T26±2°C.

Поверхнєве культивування проводили на середовищі Мурасіге-Скуга (MS) [4] з додаванням 2,4-Д 2,0 мг/л, НОК-0,45 мг/л, ІОК-0,55 мг/л, кінетин – 0,18 мг/л, при 26±1°C і вологості 80%, у темряві.

Суспензійне культивування проводили на качалці Elrap (Польща) у колбах на 250 мл, при швидкості перемішування 120 об/хв. У 100мл живильного середовища MS без Ca^{2+} , з додаванням гормонів як для поверхневого культивування, вносили 2-3 г калусних клітин.

Підрахунок кількості клітин проводили в камері Фукса-Розенталя після мацерації суспензії в 10% розчині хромової кислоти при 60° на протязі 15 хв.

Ріст культури визначали по вазі сирі і сухої біомаси. Суспензію клітин фільтрували через змочений і зважений фільтр, вкладений у лійку Бюхнера під слабким вакуумом. Клітини промивали дистильованою водою, відділяли воду під вакуумом і зважували знову разом з фільтром. Сушу масу визначали аналогічно, але зважували сухий фільтр, а клітини сушили разом з фільтром у термостаті при 60° до постійної маси [5].

Життєздатність клітин визначали, оцінюючи співвідношення кількості життєздатних клітин до загальної кількості (приблизно 500 клітин). Життєздатні культури характеризувались наявністю клітин з ядрами й рухом цитоплазми при фарбуванні препаратів 0,1% водним розчином метиленового синього на протязі 2 хв.

Для визначення мітотичного індексу клітини фіксували у спирті й оцтовій кислоті (3:1) протягом 24 годин. Зразки фарбували 1,5 % орсеїном (приготованому на 45 % оцтовій кислоті). На кожному препараті аналізували по 1000 кліток.

Якісний аналіз на присутність алкалоїдів. 60 мг сухої біомаси екстрагували 1 мл водного розчину 0,1% H_2SO_4 . 6 мкл надосадової рідини наносили на ТШС-пластини із сорбентом Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Німеччина), висушували в струмі теплого повітря. Пластини поміщали в насичену камеру із системою розчинників - хлороформ : ізопропанол : вода : оцтова кислота (20:20:5:5 по об'єму) [6]. В якості стандарту використовували спиртовий розчин вінкаміну. Оцінку якісного складу алкалоїдів проводили при довжині хвилі 365 нм та 283нм.

Статистична і комп'ютерна обробка. Статистичну обробку результатів проводили за керівництвами [7,8]. Комп'ютерну обробку даних проводили за допомогою програми Excel, стандартного пакета програм Microsoft Office XP («Microsoft», США).

Результати і обговорення

Нами запропоновано методику введення в культуру *in vitro*, отримання калусної тканини та суспензійної культури *Vinca minor* L. як джерела сировини для отримання індолних алкалоїдів.

Підбір умов для культивування починали з введення рослини в культуру *in vitro*. Введення в культуру проводилося за Стафером з соавт. [9]. Стерилізовані рослини інкубувались на середовищі MS. Певна проблема була з індукцією ризогенезу. Для утворення коріння було визначено необхідність додавання ІМК (0,2 мг/л) та БАП (0,5 мг/л) з чергуванням росту рослини на безгормональному середовищі. Утворене коріння розташовувалось на поверхні середовища, що змусило нас зменшити концентрацію агарози в середовищі (рис. 1).



Рис. 1. *V. minor* в культурі *in vitro*



Рис. 2. Калус *V. minor*

Наступним був етап калусоутворення. Для індукції калусогенеза в якості експлантів використовували тканини тритижневих асептично вирощуваних рослин барвінку малого. Листя, стебло і коріння розчленовували в стерильних умовах, і експланти поміщали на модифіковане живильне середовище MS [4] з додаванням фітогормонів в різних комбінаціях: 1 мг/л 2,4Д + 1 мг/л кінетина; 1 мг/л НУК + 0,1 мг/л кінетина. Експланти інкубували в термостаті при $T26^{\circ}\text{C}$, в темряві. Утворення калусу спостерігалось на 21 день. Морфологічно калус був середньої щільності, жовто-білого кольору (рис. 2). Більш ефективний калусогенез спостерігався на середовищі, яке містило 1мг/л 2,4Д + 1 мг/л кінетину. Найбільшу здатність до калусоутворення мали експланти з листя верхньої частини рослини, найменшу – стеблеві експланти. Експланти з різних частин проростка формували схожі типи калусів, які склались з двох типів клітин - меристематичних і паренхімних. Основна маса дрібноглобулярного калусу була представлена крупними, сильно вакуолізованими клітинами, покритими зверху шаром меристематичних клітин. Крупноглобулярний калус складався тільки з щільно зчеплених паренхімних клітин. Меншою мірою утворювався калус пухкого типу, що складався з окремих клітинних кластерів, розділених крупними міжклітинниками. На цитологічних препаратах спостерігалися клітини округлої форми з чітко вираженими ядрами. Відсоткове співвідношення меристемних і паренхімних клітин змінювалось на користь останніх на протязі циклу культивування. Максимум мітотичної активності спостерігався на 11 добу культивування.

Глибинне культивування проводили на середовищі, що використовувалось для субкультивування, за відсутності іонів кальцію. Відбір проб суспензійної культури проводили через кожні 5 днів, аналізуючи динаміку накопичення сирої й сухої біомаси, зміну кількості клітин у циклі вирощування й їх життєздатність. Три паралельні субкультивування в стандартних умовах показали мінімальну різницю по кількості клітин і приросту біомаси. За результатами цього аналізу побудовано графік (Рис.3).

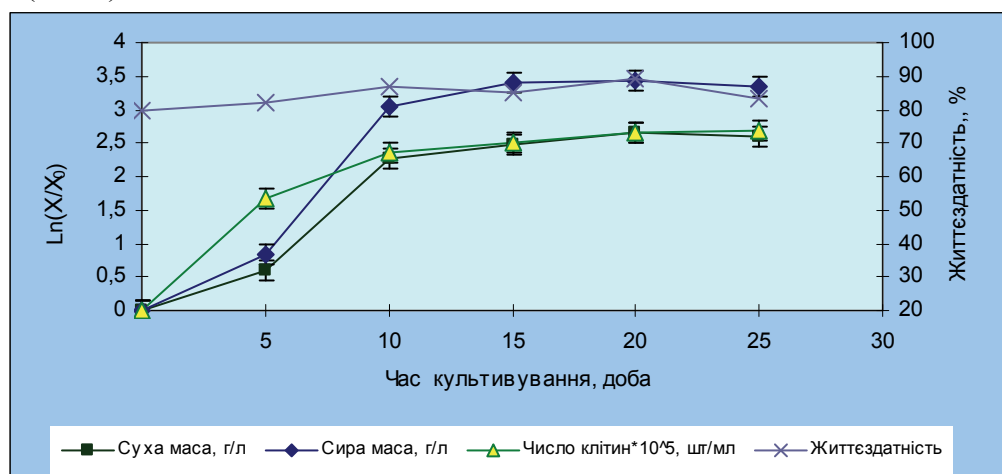


Рис. 3. Криві росту суспензійної культури *V. minor* в напівлогарифмічній системі координат

Вирахувані за допомогою графіку кількісні характеристики росту культури клітин були такими: питома швидкість росту (μ , доба⁻¹) дорівнювала 0,12 для кількості клітин; 0,14 для сирої біомаси і 0,13 для сухої біомаси. Час подвоєння культури клітин (τ , доба), який показує часовий період, на протязі котрого відбувається подвоєння розрахункового показника, становило в середньому 4-5 діб. Життєздатність клітин під час усього періоду культивування трималась в середньому на рівні $84 \pm 0,5$ %. Індекси росту (I) суспензійної культури дорівнювали: по кількості клітин $I = 2,59 \pm 1,3$; по сирій біомасі $I = 3,04 \pm 1,1$; по сухій біомасі $I =$

3,52±0,9. Інтервал розходження по індексу росту між цими показниками показав, що найменше значення І приймає при перерахунку по кількості клітин (2,59), а найбільше – при визначенні І по сухій біомасі (3,52). Але ці розбіжності не суттєві, що свідчить про стабільність отриманої культури.

По агрегованості клітин суспензія була крупноагрегованою, тому що більше половини клітин перебували в агрегатах, що перевищують 20 клітин.

Порівняльне вивчення наявності алкалоїда вінкаміна в інтактній рослині і культурі барвінка малого визначали за допомогою ТШХ, використовуючи у якості контролю очищений препарат вінкаміну. Аналіз отриманих хроматограм в ультрафіолетовому опроміненні показав наявність вінкаміну в калусній і суспензійній культурі, але кількість цього алкалоїду в культурі клітин була суттєво нижче, ніж у інтактної рослини. Тому надалі ми плануємо провести роботу з одержання культури клітин барвінку, яка б виробляла вінкамін у більшій кількості.

У результаті проведеної роботи нами введено в культуру *in vitro* лікарська рослина барвінок малий *Vinca minor* L.. Підібрано середовище для калусогенезу барвінку, отримано стійкий калус і суспензійну культуру цієї рослини і досліджені їх цитоморфологічні і ростові характеристики. Показана спроможність культури клітин синтезувати алкалоїд вінкамін.

Література

1. Ortiscu C., Macoveanu M., Horoba E., Cojocaru M., Poiorac E. The study of the extraction process of vincamine // Rev. Rournaine Chem. - 1985. - vol.30.- P. 807-815.

2. Petiard V., Dernarly Y. Mise en evidence de glucosides et d'alcaloïdes dans les cultures de tissue vegetaux // Ann. Amelior. Plantes.-1972.- vol.22.- P.361-374.

3. Gamier J., Kunesch N., Siou E., Poisson J., Kunesch C., Koch M. Etude des cultures de tissus de *Vinca minor* isolement d'un lignane, le liriioresinoï // B. Phytochemistry.- 1975.-vol.14. -P.385-138.

4. 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.

5. Тутова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е., Коростелев В.В., Орешников А.В., Носов А.М. Длительное аппаратное выращивание суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea* Wall в полупроточном режиме // Биотехнология. – 2006. – №2. – С.28-31.

6. Давыденков В.Н., Тареева Н.В., Кирьянов А.А., Бондаренко Л.Т., Количественное определение стефарина в культуре ткани стефании гладкой // Хим.-фарм. журн.-1988.- № 3 - С.326.

7. Лакин Г.Ф. Биометрия.- М.: Высшая школа, 1990.-352с.

8. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Перт. М.: Мир, 1978.

9. Stapfer R.E., Heuser C.W. In-vitro propagation of periwinkle *Vinca minor* cultivar bowles // Hortscience.-1985.-vol. 20.- P.141-142.

Резюме

Введено в культуру *in vitro* барвінок малий *Vinca minor* L. Отримано й охарактеризовано по ростовим і деяким цитоморфологічним параметрам калусну й суспензійну культури клітин цієї рослини. За допомогою ТШХ встановлено їх здатність синтезувати алкалоїд вінкамін.

Введен в культуру *in vitro* барвінок малий *Vinca minor* L. Получены и охарактеризованы по ростовым и некоторым цитоморфологическим параметрам калусная и суспензионная культура клеток этого растения. С помощью ТСХ показана их способность синтезировать алкалоид винкамин.

The periwinkle *Vinca minor* L. has been entered into culture *in vitro*. A callus and suspension cultures of this plants has been obtained and characterized for its growth and some cytomorphological parameters. Ability of a plant to synthesize alkaloid vincamin has been shown by TLC.

МИТРОФАНОВА И.В., МИТРОФАНОВА О.В., РАБОТЯГОВ В.Д.

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,
Украина, 98648, АР Крым, Ялта, e-mail: in_vitro@ukr.net*

РОЛЬ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В СИСТЕМЕ ПРЯМОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ИССОПА (*HYSSOPUS OFFICINALIS* L.) И КОТОВНИКА (*NEPETA CATARIA* VAR. *CITRIODORA* BECK.) *IN VITRO*

Различные виды родов *Nepeta* L. и *Hyssopus* L., относящиеся к семейству губоцветных (*Lamiaceae*), являются перспективными эфирномасличными, пряно-ароматическими и лекарственными растениями [3, 4]. Котовник кошачий (*Nepeta cataria* L.), или котовник лимонный (*N. cataria* var. *citriodora* Beck.) – многолетнее растение. Эфирное масло котовника лимонного отличается высокой антимикробной активностью и фунгицидным действием по отношению к плесневым грибам, рекомендуется для использования в новых композициях парфюмерных изделий. Иссоп обыкновенный (*Hyssopus officinalis* L.) с мелкими розовыми, темно-синими и белыми цветами также является многолетним растением, достигая высоты 80 см. Эта культура уже давно и широко используется в народной и традиционной медицине различных стран (Индия, Болгария, Германия, Австрия, Франция и т.д.), и как пряно-вкусовое сырье в пищевой промышленности при производстве рыбных продуктов. Эфирное масло иссопа широко применяется в косметической промышленности [3]. Совсем недавно это растение стало популярным в озеленении.

Первое сообщение по культуре тканей иссопа появилась в 1987 году во Франции. Учеными был исследован морфогенетический потенциал пыльников, зародышей и отдельных семядолей иссопа в условиях *in vitro* [8]. Более глубокое изучение морфогенетических способностей вегетативных органов и тканей котовника и иссопа было начато в 90-х годах в отделе биотехнологии Никитского ботанического сада [6, 9, 10]. Учеными НБС-ННЦ совместно со специалистами из Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины был разработан способ полиплоидизации котовника с помощью антимикротрубочковых соединений и получены новые формы [11, 12]. Однако для размножения генетически однородного посадочного материала, эффективного применения мутагенов и генетической трансформации котовника и иссопа необходимо разработать прямую регенерацию этих культур в условиях *in vitro*.

Целью настоящего исследования было выявление основных факторов влияющих на систему прямой регенерации растений иссопа и котовника *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования по культуре органов и тканей котовника *N. cataria* и иссопа *H. officinalis* выполняли на базе отдела биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ. Для прямой регенерации были использованы листовые диски котовника и иссопа размером 1-2 мм, с культивируемых в условиях *in vitro* растений. Исходный растительный материал котовника и иссопа был отобран в коллекционных посадках отдела новых ароматических и лекарственных культур НБС. В исследования были включены две формы иссопа: с синей (80882) и белой (38285) окраской венчика цветка. В качестве базовой культуральной среды использовали питательную среду МС с половинным набором макро- и микросолей, полным составом витаминов, 30 г/л сахарозы, 6 г/л агара Difco («Sigma», США). Эффективность влияния тидиазурона (ТДЗ) в концентрациях 0,5, 1,0, 3,0, 6,0, 9,0

мкМ на индукцию регенерации микропобегов была изучена при размещении сосудов с эксплантами в культуральной комнате с температурой $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 часовым фотопериодом и интенсивностью освещения $0-62,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Контролем служила среда без регуляторов роста при культивировании эксплантов в темноте. Каждый эксперимент был поставлен трижды в 10-кратной повторности.

Результаты и обсуждение

Тидиазурон как индуктор процессов соматического эмбриогенеза и органогенеза в настоящее время является одним из перспективных веществ цитокинового типа действия. Разработка способа прямой регенерации адвентивных микропобегов из листьев и сегментов побегов древесных и кустарниковых растений с применением ТДЗ позволила не только размножать растения, создавать реципиентные системы для генетической трансформации, но и изучать процессы морфогенеза, которые индуцируются непосредственно в клетках самого экспланта [7].

Использование в опытах по регенерации микропобегов иссопа различных концентраций ТДЗ позволило нам выделить среди них оптимальную. Так, у 45% листовых дисков иссопа при добавлении в питательную среду $6,0 \text{ мкМ}$ ТДЗ уже через 4 недели культивирования по периферии экспланта происходила активная индукция образования адвентивных почек и регенерация микропобегов ($15,6 \pm 2,4$ микропобега на листовой эксплант). При низких концентрациях ТДЗ ($0,5$ и $1,0 \text{ мкМ}$) образовывались лишь единичные микропобеги. Повышение концентрации ТДЗ до $9,0 \text{ мкМ}$ стимулировало формирование каллуса и значительно уменьшало побегообразование иссопа. Наряду с этим, было установлено, что увеличение продолжительности культивирования листовых дисков иссопа до 8 недель повышало частоту регенерации, и количество эксплантов, способных регенерировать микропобеги достигало 96%. Кроме того, было показано, что листовые диски иссопа с синей окраской венчика цветка обладали более высокой регенерационной способностью, чем с белой.

В процессе исследования было также изучено влияние количества субкультивирований на способность листовых эксплантов иссопа к адвентивному побегообразованию. Так, листовые диски, взятые с микропобегов, прошедших 3 субкультивирования в условиях *in vitro*, образовывали каллус и не формировали адвентивных почек. Показано, что максимальное количество адвентивных почек и микропобегов регенерировало из листовых эксплантов, отобранных с микропобегов иссопа после 4-5 пассажа. После 6-8 субкультивирования на эксплантах отмечали появление массы оводненных, а в дальнейшем нежизнеспособных микропобегов.

Известно, что ориентация листовых эксплантов к поверхности питательной среды и возраст донорного растения оказывают влияние на частоту регенерации микропобегов [1, 2, 5]. Листовые диски иссопа, помещенные нами на питательную среду, начинали сразу же увеличиваться в размерах, изменяя свою форму и приподнимаясь над средой. Было отмечено, что расположение листовых эксплантов адаксиальной стороной к питательной среде активизировало регенерационные процессы (табл. 1). Такая ориентация эксплантов позволила нам через 8 недель культивирования получить стабильную регенерацию микропобегов у 90% и 45% листовых дисков иссопа с синей и белой окраской венчика цветка соответственно.

Таблица 1

Регенерационный потенциал листовых эксплантов двух форм иссопа при их различной ориентации к питательной среде (через 8 недель культивирования)

Расположение эксплантов к питательной среде	К-во листовых эксплантов формирующих микропобеги, %		К-во микропобегов / листовой диск, шт.	
	форма 80882	форма 38285	форма 80882	форма 38285

Абаксиальное	47 ± 6,0	10 ± 5,0	8,2 ± 1,4	1,5 ± 0,3
Адаксиальное	90 ± 4,0	45 ± 2,0	15,2 ± 1,9	4,7 ± 1,2

Наряду с влиянием ТДЗ, количества пассажиров и ориентации листовых эксплантов по отношению к питательной среде была изучена индуцирующая роль интенсивности освещения на процессы прямой регенерации микропобегов иссопа обыкновенного. Полученные результаты показали, что в отсутствие освещения не происходило образования адвентивных почек на исследуемых эксплантах. Был определен оптимальный показатель интенсивности освещения ($25 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), при котором 90% и 50% листовых дисков иссопа с синей и белой окраской венчика цветка, соответственно, регенерировали адвентивные почки и микропобеги. Частота регенерации и количество микропобегов на эксплант значительно уменьшались при интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Увеличение же интенсивности освещения до $62,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ индуцировало быстрое увеличение размера культивируемого экспланта, однако в этих условиях только низкий процент листовых дисков иссопа был способен к регенерации микропобегов. Чаще всего при такой интенсивности освещения экспланты погибали.

Как и в случае с иссопом максимальное количество листовых эксплантов котовника, способных к регенерации адвентивных почек и микропобегов, отмечали на 8 неделю культивирования. Однако у котовника удалось добиться высокой регенерации микропобегов при повышении концентрации ТДЗ до 9,0 мкМ, в то время как для иссопа оптимальная концентрация составила 6,0 мкМ. Кроме того, отмечено, что через 8 недель среднее количество адвентивных почек на эксплант достигало 12 штук. Этот показатель оказался значительно ниже, чем при культивировании эксплантов иссопа. При низких концентрациях ТДЗ чаще всего отмечали только увеличение размера листовой пластинки котовника. Незначительное образование каллуса по краю высечки листа наблюдали на среде, дополненной 6,0 мкМ ТДЗ.

Кроме того, отмечено, что листовые экспланты, взятые с микропобегов котовника после 3 субкультивирований в условиях *in vitro*, не были способны как к образованию каллуса, так и к адвентивному побегообразованию. 4-5-тые пассажи оказались оптимальными для последующей прямой регенерации микропобегов. Увеличение количества субкультивирований снижало коэффициент размножения и увеличивало процент образования оводненных микропобегов, которые быстро погибали.

При культивировании в условиях *in vitro* листовых эксплантов котовника установлена зависимость частоты регенерации микропобегов от интенсивности освещения. Как видно из результатов, представленных в таблице 2, в темноте не происходило каких-либо изменений с листовыми дисками. По сравнению с листовыми эксплантами иссопа максимальное количество эксплантов котовника было способно к регенерации микропобегов при интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Увеличение интенсивности освещения индуцировало каллусообразование на поверхности листовых дисков. Кроме того, отмечено, что адаксиальное расположение листовых дисков как иссопа, так и котовника на питательной среде увеличивало частоту регенерации до 90% и 70% соответственно.

Таблица 2

Частота регенерации микропобегов из листовых эксплантов котовника и иссопа *in vitro* в зависимости от интенсивности освещения

Интенсивность освещения, $\text{мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$	К-во листовых эксплантов с микропобегами, %	
	Котовник	Иссоп (форма 38285)
0	0,0	0,0
12,5	0,0	35,0 ± 11,0
25	25,0 ± 4,0	50,0 ± 4,3
37,5	70,0 ± 5,0	40,0 ± 7,9
50	45,0 ± 3,5	27,0 ± 3,0

62,5	15,0 ± 2,0	16,0 ± 6,1
------	------------	------------

На протяжении года от одного листового экспланта котовника и иссопа в результате разработанной системы прямой регенерации растений было получено 10000 микропобегов, которые отделяли и укореняли на ½ нормы среды МС, дополненной 2,46 мкМ и 9,80 мкМ ИМК соответственно. Корни длиной 5-6 см формировались в течение 2-2,5 недель. Число укорененных микропобегов котовника и иссопа достигало 72% и 80% соответственно. Однако количество адаптированных растений не превышало 40-50% у обоих исследуемых видов.

Таким образом, установлена зависимость регенерационного процесса у иссопа и котовника от генотипа, концентрации ТДЗ, количества субкультивирований, расположения листовых дисков на питательной среде и интенсивности освещения. Определены оптимальные концентрации ТДЗ для иссоп – 6,0 мкМ, для котовника – 9,0 мкМ, применение которых индуцировали образование микропобегов у 70-90% листовых дисков при адаксиальном расположении на среде. Максимальное количество адвентивных микропобегов регенерировало из листовых дисков исследуемых культур, отобранных с микропобегов после 4-5 пассажей в условиях *in vitro* при интенсивности освещения 25 мкМ м⁻² с⁻¹ (иссоп) и 37,5 мкМ м⁻² с⁻¹ (котловник).

Литература

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
3. Либусь О.К., Работягов В.Д., Кутько С.П., Хлыпенко Л.А. Эфирномасличные и пряно-ароматические растения: Научно-популярное издание. – Херсон: Айлант, 2004. – 272 с.
4. Машанов В.И., Покровский А.А. Пряно-ароматические растения. – Москва: Агропромиздат, 1991. – 287 с.
5. Митрофанова И.В. Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Труды Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95
6. Митрофанова И.В., Работягов В.Д., Аксенов Ю.В. Морфогенез и регенерация растений котовника *in vitro* // Переработка лекарственного сырья и производство фитопрепаратов для медицины и сельского хозяйства: Тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. (5-6 сентября 1996 г., Алматы, Казахстан). – Алматы, 1996. – С. 75.
7. Huetteman C.A., Preece J.E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1993. – Vol. 33, N 2. – P. 105-119.
8. Le C.L. Multiplication *in vitro* de l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L.) // Revue suisse de Vitic. Arboric. Hortic. – 1987. – Vol. 19, N 6. – P. 363-367.
9. Mitrofanova I., Ivanova N. Using of leaf discs for direct regeneration of issope plants // Horticulture and Vegetable Growing: Scientific works Lithuanian Inst. Hort. and Lithuanian Univ. Agr. – 2000. – Vol. 19, N 3, Part 1. – P. 427-433.
10. Mitrofanova I.V., Ivanova N.N., Rabotyagov V.D., Zilbervarg I.R., Shenfish N.R. Special features of the genus *Nepeta*'s plants morphogenesis and regeneration *in vitro* // Problems and perspectives of biotechnology development in ornamental gardening and horticulture: Abstracts Intl. Conf. (25-26 September 1997, Yalta, Ukraine). – Yalta, 1997. – P. 67.
11. Mitrofanova I.V., Zilbervarg I.R., Yemets A.I., Mitrofanova O.V., Blume Ya.B. The effect of dinitroaniline and phosphorothiamidate herbicides on polyploidisation *in vitro* of *Nepeta* plants // Cell Biology International. – 2003. – Vol. 27. – P. 229-231.
12. Zilbervarg I.R., Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Rabotyagov V.D., Blume Ya.B. Using oryzalin and amiprofos-methyl for obtaining issope and nep polyploid forms *in vitro* // Cell Biology International. – 1998. – Vol. 21, N 12. – P. 914-915.

Резюме

Установлены основные абиотические и биотические факторы, влияющие на процесс прямой регенерации *in vitro* эфиромасличных и лекарственных растений. Показана роль генотипа, концентрации ТДЗ, количества субкультивирований, расположения листовых дисков на питательной среде и интенсивности освещения в системе прямой регенерации растений иссопа и котовника.

Встановлено основні абіотичні та біотичні фактори, які впливають на процес прямої регенерації *in vitro* ефіроолійних і лікарських рослин. Показано роль генотипу, концентрації ТДЗ, кількості субкультивувань, розташовування листових дисків на поживному середовищі та інтенсивності освітлення у системі прямої регенерації гісопу та м'яти котячої.

The main abiotic and biotic factors influencing on process of direct regeneration *in vitro* essential oil and medical plants were established. The role of genotype, TDZ concentration, number of subcultivation, placing of leaves disks on culture medium and intensity of illumination in the system of direct regeneration in hyssop and nep plants was demonstrated.

**МИХАЛЬСКАЯ С.И., КОМИСАРЕНКО А.Г., МАЛИНА А.Э.,
БРОННИКОВА Л.И., ТИЩЕНКО Е.Н.**

*Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 0302, Киев, ул. Васильковская 31/17, e.mail:oltyko@gmail.com*

ВЛИЯНИЕ ТИОСУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ *IN VITRO* ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

Для генетического улучшения подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) биотехнологическими методами за последние десятилетия предложено ряд перспективных систем регенерации *in vitro* [1-3]. Вместе с тем реализации морфогенетического потенциала многих сельскохозяйственно-ценных линий и гибридов *H. annuus* свойственна низкая эффективность и вариабельность.

Регенерация *in vitro* подсолнечника может осуществляться путём прямого/непрямого как органогенеза, так и соматического эмбриогенеза [1-5]. При этом отмечается зависимость от типа эксплантата, а также генотипа, условий культивирования и их взаимодействия. Имеются сведения и о генотипическом контроле показателей - количество побегов на общее количество эксплантатов и на регенерирующий эксплантат [6,7]. На индукцию регенерации оказывают влияние регуляторы роста, углеводы, в ряде случаев повышению побегообразования способствуют органические и неорганические компоненты, в частности аминокислоты, гидролизат казеина, KNO₃ [4, 5, 8].

Цель данного исследования – оценка эффективности применения тиосульфата натрия для повышения частоты регенерации *in vitro* из сегмента проростка инбредных линий и гибридов подсолнечника.

Материалы и методы

Объектом исследования служили инбредные линии подсолнечника 96А/3, 16А/3, 70А/3 (селекции Одесского селекционно-генетического Института, УААН).

Зрелые ядра семян стерилизовали последовательно 96% этанолом (2 мин) и 15% раствором хлорамина (30-40 мин), затем трехкратно промывали автоклавированной дистиллированной водой и высаживали на агаризованную питательную среду Мурасиге-Скуга (МС). Культивировали 3-4 дня при температуре 25–26 °С, 16-часовом фотопериоде и освещённости 3-4 клк.

3-4-дневные проростки делили пополам вдоль зародышевой оси, удаляли корешок и апикальную меристему с примордиями листьев. В качестве первичного

эксплантата использовали сегмент проростка, состоящий из $\sim 1/2$ нижней части семядоли с расщеплённой верхней частью гипокотилия размером 1-2 мм. Для индукции регенерации *in vitro* эксплантаты (по 20 штук на чашку Петри) высаживали на модифицированную нами питательную среду МС (МСМ) и среду МСМ дополненную тиосульфатом натрия (МСМТ), в концентрациях 10 - 100 мг/л. рН питательной среды до автоклавирования составлял 5,7 – 5,8. Культивирование проводили при условиях, указанных выше. Укоренение осуществляли на МСМ-среде без фитогормонов.

Частоту побегообразования исследуемых генотипов оценивали как отношение количества регенерантов к общему числу эксплантатов. Для каждого генотипа учитывали результаты 6 - 10-кратных повторностей опыта. При статистической обработке результатов сравнительного исследования применяли критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Одним из важных факторов, определяющих эффективность индукции регенерации *in vitro* подсолнечника, является природа эксплантата, а также стадия развития растений, из которого он вычленяется. Скрининг различных эксплантатов на модифицированной нами среде МСМ показал, что для тестируемых генотипов органогенез *in vitro* надёжно и воспроизводимо осуществлялся при использовании сегмента проростка, состоящего из нижней части семядоли совместно с верхней частью гипокотилия. При этом максимальная частота регенерации, осуществляемой путём прямого органогенеза, наблюдалась для эксплантатов, полученных от 3-4-дневных проростков подсолнечника. Появление первых побегов было чётко различимо уже на 6-7 день культивирования на средах для индукции регенерации МСМ и МСМТ.

Следует отметить, что для индукции побегообразования использовали среды МС, Гамборга, Нича и их модификации, в которых варьировали количественным и качественным составом регуляторов роста, органических и неорганических добавок. Значительный интерес вызвал тиосульфат натрия, наличие которого могло приводить к повышению индукции побегообразования, особенно для генотипов с низким морфогенетическим потенциалом. Так, на средах МСМ и МСМТ для гибрида Злыва частота побегообразования достоверно не отличалась, в то время как для гибридов Заклык, Згода, Зубр, Урсус наблюдалось увеличение этого показателя.

В таблице приведены результаты исследования влияния различных концентраций тиосульфата натрия на индукцию регенерации инбредных линий подсолнечника. Полученные данные свидетельствуют о том, что для всех тестируемых линий происходит повышение частоты регенерации, однако ответная реакция эксплантата на этот фактор питательной среды была неоднозначная. Наблюдаются как количественные различия, так и изменения в динамике реализации морфогенетического потенциала. Так, хотя достоверное увеличение частоты регенерации у инбредных линий имеют место при одной и той же концентрации тиосульфата натрия, равной 20 мг/л, у линии 96А/3 имеется чётко выраженный максимум в диапазоне 10 – 30 мг/л, тогда как у линий 70А/3 и 16А/3 по мере увеличения содержания этого компонента питательной среды вплоть до 100 мг/л достоверных изменений не происходит. В то же время частота побегообразования у линии 96А/3 падает приблизительно в 2 раза. Это означает, что для проявления максимального положительного эффекта действия на реализацию морфогенетического потенциала подсолнечника необходимо и достаточно ~ 20 мг/л тиосульфата натрия. Можно предположить, что это соединение стимулирует пролиферацию клеток гипокотилия, способных к дальнейшей дифференцировке.

В целом, присутствие тиосульфата натрия в питательной среде привело к статистически достоверному повышению частоты побегообразования инбредных линий 96А/3, 70А/3 и 16А/3 приблизительно в 1,3, 1,7 и 2,8 раза, соответственно. Различное влияние тиосульфата натрия на реализацию морфогенетического потенциала

линий 96А/3, 70А/3, 16А/3 свидетельствует о генотипической зависимости индукции побегообразования подсолнечника от этого компонента питательной среды.

Таблица

Частота побегообразования инбредных линий подсолнечника при различных концентрациях тиосульфата натрия

Линии	Частота регенерации, %					
	Концентрация тиосульфата натрия, мг/л					
	0	10	20	30	50	100
96А/3	31,3±2,0	38,7±2,9 (1,24)	41,5±2,3 (1,33)	41,4±2,7 (1,32)	31,3±4,9 (1)	19,8±3,5 (0,63)
70А/3	20,2±4,6	32,5±2,6 (1,61)	33,5±2,0 (1,66)	31,8±2,5 (1,57)	36,1±2,0 (1,79)	36,3±3,5 (1,80)
16А/3	13,9±2,0	30,8±3,6 (2,22)	36,4±2,4 (2,87)	31,6±3,5 (2,27)	39,0±1,2 (2,80)	39,0±1,3 (2,80)

Примечание: в скобках указано значение отношения средних частот регенерации с и без тиосульфата натрия.

При культивировании на средах МСМ и МСМТ индукция регенерации могла осуществляться и путем множественного побегообразования. Однако, если на питательной среде с тиосульфатом натрия для всех генотипов было характерно наличие не менее 2-х побегов на регенерирующий эксплантат (появление 4 – 5 регенерантов было редким событием), то на МСМ этот показатель для инбредные линии 96А/3, 16А/3 и 70А/3 составлял преимущественно 1.

Таким образом, показана эффективность применения тиосульфата натрия для повышения индукции побегообразования из эксплантата - сегмента семядоли с частью гипокоты проростков инбредных линий и гибрида подсолнечника. Предложенный метод регенерации путем прямого органогенеза может быть использован при разработке системы методов генетической трансформации.

Литература

1. Lucas O., Kallerhoff J., Alibert G. Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens* //Molecular Breeding.- 2000. - 6. - P. 479-487.
2. Muller A., Iser M., Hess D. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.), using a non-meristimatic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker // Transgenic Research. – 2001. – 10. – 435-444.
3. Everett N.P., Robenson K.E.P., Mascarenhas D. Genetic engineering of sunflower (*Helianthus annuus* L) // Biotechnology.-1987. – 5, N11. – P.1201-1204.
4. Dong-Ho Shin D.-H., Kim J.S., Yang J., On S.K., Chung G.C., Han K-H. A shoot regeneration protocol effective on diverse genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.) // In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant. – 2000. – 36. – P. 273-278.
5. Alibert G., Aslane-Chanabe C., Burrus M. Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology // Plant Physiol. Biochem. - 1994. – 32. – P.31-44.
6. Deglene L., Lesignes P., Alibert G., Saffari A. Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*) // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1997. – 48. – P. 127-130.
7. Flores Berrious E, Gentzbittel L., Kayyal H., Alibert G., Sarrafi A. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.) // Theor Appl Genet. – 2000. – 101. – P.1299-1306.
8. Espinasse A., Lay C. Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes // Crop Sci – 1989. – 29. - 201-205.

Резюме

С использованием тиосульфата натрия показано увеличение индукции регенерации подсолнечника путём прямого органогенеза из сегмента 3-4-дневных проростков, состоящего из части семядоли с гипокотилем.

Використовуючи тиосульфат натрію, встановлено підвищення індукції регенерації соняшника шляхом прямого органогенезу із сегменту 3-4 денних проростків соняшника, до якого входить частина сім'ядолі з гіпокотилем.

Using thiosulfate Na, the increase of sunflower regeneration induction from segment of seedling 3-4-days after germinating which consist of fragment of cotyledon with hypocotyl by direct organogenesis was shown.

ОВЧАРЕНКО О.О., РУДАС В.А., КУЧУК М.В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
03143, Київ, вул. Заболотного, 148 E-mail: iicb@iicb.kiev.ua

РОЗРОБКА УМОВ ВИДІЛЕННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ РОСЛИН РОДУ PHALAEENOPSIS

Тропічні та субтропічні види родини Orchidaceae є популярним об'єктом у квітникарстві. Широке культивування орхідей обумовлене їх високою декоративністю, довголіттям та тривалим періодом цвітіння. Розмноження орхідей традиційними методами (поділ, живцювання) - тривале, має низький коефіцієнт розмноження, придатне не для всіх видів. Насіннєве розмноження також довгий час становило труднощі через те, що для проростання насіння орхідних з недорозвиненими зародками необхідне створення симбіозу з певними видами грибів, крім того отримані таким чином сіянці часто зацвітають у віці понад 10 років [1]. Метод культури *in vitro* дозволив скоротити час від висіву насіння до цвітіння та масово розмножувати елітні екземпляри [1]. Слід зазначити, що хоча представники родини Orchidaceae досить легко утворюють статеві гібриди, іноді навіть між трьома або чотирма родами, між деякими родами статєва гібридизація неможлива. Тому для подолання статевої несхрещуваності варто було б використати метод соматичної гібридизації. Проте, остання неможлива без розробки методики культивування протопластів. Відомо лише кілька робіт по культурі протопластів родини Orchidaceae [2 - 8].

Одним з цікавих представників цієї родини є рід *Phalaenopsis*, чи не найпопулярніший в культурі завдяки здатності до росту в кімнатних умовах, відносній невибагливості. Статєві гібриди роду *Phalaenopsis* отримані лише з родами *Doritis* (*Doritaenopsis*), *Renanthera* (*Renanthopsis*) та *Vanda* (*Vandaenopsis*) [9], що відкриває широкі можливості для отримання нових гібридів шляхом соматичної гібридизації. Тому метою нашої роботи було розробити методику виділення та культивування протопластів роду *Phalaenopsis*.

Матеріали і методи

В роботі було використано асептичні рослини фаленоплицу (*Phalaenopsis* Blume), отримані з насіння внаслідок схрещування двох різних гібридних форм фаленоплицу, придбаних з колекції Центрального ботанічного саду ім. М. М. Гришка. Запилення та введення насіння в культуру *in vitro* проводили за методикою наведеною в монографії Т.М Черевченко [1]. Насіння висівали на тверде живильне середовище Огс (табл.1). Насіння пророщували при температурі 25°C, освітленості 500 лк, фотоперіоді – 16 год. Надалі, утворені з насіння асептичні протокорми підтримували в культурі *in vitro* пасажуванням на свіже живильне середовище Огс. Для експериментів

використовували протокорми після 3 – 4 тижнів культивування (рахуючи від останньої пересадки).

Для виділення протопластів використовували асептичні протокорми. Їх нарізали на шматочки розміром близько 1 – 2 мм. Рослинний матеріал поміщали у чашки Петрі (90×15 мм) на поверхню ферментного розчину об'ємом 5 мл. Для підбору умов ферментації випробовували чотири різних ферментні суміші, приготованих на 0,4 М сахарозі (табл. 2). Ферментний розчин стерилізували фільтруванням. Ферментація тканин проходила протягом 16-18 годин. Обробка ферментами відбувалась в темряві при температурі 23°C. Очистку протопластів від клітинного дебрису проводили методом флотажі в 0,4 М сахарозі, з подальшим подвійним відмиванням у сольовому середовищі W5 [10]. Для цього отриману після інкубації ферментну суміш з суспензією протопластів фільтрували через нейлонову сітку і переносили по 6 мл у центрифужні пробірки об'ємом 10 мл. На суспензію протопластів обережно нашаровували по 1 мл сольового розчину W5 і центрифугували при 100g 5 хв. Життєздатні протопласти, що збиралися в інтерфазі, обережно збирали пастерівською піпеткою разом з W5 і переносили в чисту пробірку. Далі до них додавали 6 мл W5, ресуспендували і осаджували при 80g 1 хв. Надосадову рідину видаляли, а осад повторно суспендували і центрифугували при тих самих умовах. Кількість виділених протопластів підраховували у камері Горяєва.

Для культивування протопластів фаленопсису з них рослин використовували середовища WSS, KM8p, SW1 [10]. Протопласти ресуспендували у середовищах у концентрації 3×10^5 протопластів у 1 мл середовища.

Таблиця 1

Склад живильних середовищ, використаних при культивуванні протокормів та регенерації з них рослин, мг/л

<i>Компонент</i>	Orc	OrcR
KNO ₃	1900	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	440
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170
NH ₄ Cl	267,5	267,5
Мікросолі	MS	MS
Fe-хелат	MS	MS
Міоїнозит	200	200
PP	1	1
B ₁	10	10
B ₆	1	1
БАП	-	1
НОК	-	0,1
Гліцин	2	2
Гідролізат казеїну	2000	2000
Сахароза	20000	20000
Агар	6000	6000
Гумат натрію	50	50
Пептон	2000	2000
Активоване вугілля	1000	1000
МЕС	500	500
pH	5,7	5,7

Таблиця 2

Склад ферментних сумішей використаних при ферментації протокормів фаленопсису

Фермент	Варіанти ферментних розчинів, концентрація в %			
	1	2	3	4
Cellulase	-	0,5	-	-
Cellulase RS	-	-	2	-
Cellulysin	1	-	-	0,2
Macerase	0,1	0,5	-	-
Macerozyme	-	-	-	0,5
Onozuka	-	-	-	0,5
Pectolyase	-	-	0,1	-

Протопласти культивували в темряві при 25°C протягом 7 діб. Після перших поділів до суспензії протопластів додавали рівний об'єм середовища SW1. В подальшому клітини культивували на розсіяному світлі в умовах термальної. Середовище SW1 використовували і надалі для розведення культури протопластів.

Результати та обговорення

Кількість повідомлень про культуру протопластів фаленопсису обмежена [3, 5 – 8]. Існує 4 повідомлення про отримання колоній з протопластів [5 – 8], із них лише 2 про регенерацію рослин у *Phalaenopsis* [6, 8]. Джерелом протопластів були калусні культури, використання яких має певні недоліки. Нами як джерело для виділення протопластів були використані отримані з насіння асептичні протокорми. Досліджували чотири варіанти ферментних розчинів, які містили целюлази (Cellulase, Cellulase RS, Cellulysin, Onozuka) та пектинази (Macerase, Macerozyme, Pectolyase) різного походження та в різних концентраціях. Сумарна концентрація ферментів змінювалась від 1,0% до 2,1%. Проте, на ефективність виділення протопластів впливала не тільки сумарна концентрація, але й якісний склад. Ефективність ферментації більше залежала від якісного складу, ніж від кількісного. З чотирьох випробуваних ферментів найбільший вихід протопластів давав фермент №1, який містив 1% Cellulysin та 0,1% Macerase, вихід протопластів становив близько $1-1,5 \cdot 10^6$ протопластів з 1 г ферментованих протокормів. Ферментна суміш №3 виявилась зовсім неефективною, оскільки протопласти з ферментованих тканини не виділялись. Суміш мала найвищу сумарну концентрацію ферментів (2,1%). Результат виявився несподіваним, оскільки ця ферментна суміш ефективно використовувалась для виділення протопластів іншої родини однодольних (злаків). Ферментні суміші №2 і №4 дозволяли виділити незначну кількість протопластів, при цьому ферментна суміш №4 (виділялось близько $0,5-0,7 \cdot 10^6$ протопластів/г) була кращою за №2 ($0,2-0,3 \cdot 10^6$ протопластів/г). Можна припустити, що саме присутність Cellulysin була необхідною для успішної ферментації протокормів фаленопсису.

Після виділення протопласти висівали на різні живильні середовища: SW1, KM8p, WSS. Поділи спостерігали виключно на середовищі SW1. На інших двох середовищах протопласти гинули через 4-7 днів. На середовищі SW1 на третій день після висіву спостерігали брунькування клітин, а на сьомий – перші поділи (рис.1). Колонії утворювались через 14 – 21 день. Запропонована нами методика не потребує попереднього створення високорегенераційних калусних ліній як джерела протопластів [6, 8], наявності важкодоступних компонентів середовища, таких як кокосове молоко [6, 7] або заправлення протопластів у альгінат [8].

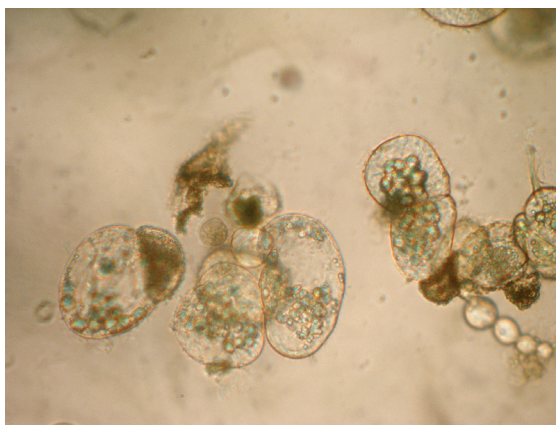


Рис.1. Брунькування та перші поділи протопластів.

Утворені колонії переносили на тверде регенераційне середовище OrcR через 3 місяці. Процес регенерації рослин з отриманих колоній потребує подальшої оптимізації.

Висновки Асептичні протокорми фаленопсису придатні для виділення протопластів за допомогою ферментного розчину (1% Cellulisin та 0,1% Macerase). Успішне утворення колоній отримане на середовищі SW1.

Література

1. Червченко Т.М. Тропические и субтропические орхидеи // К.: Наук. думка. – 1993. – 254 с.
2. Teo C.K.H., Neumann K.H. The culture of protoplasts isolated from *Renantanda Rosalind Cheok* (J). // *Orchid Rev* . - 1978. - vol.86. – P. 156–158
3. Teo C.K.H., Neumann K.H. The isolation and hybridization of protoplasts from orchids. // *Orchid Rev* . - 1978. - vol.86. – P.186–189
4. Price G.R., Earle E.D. Sources of orchid protoplasts for fusion experiments. // *Amer Orchid Soc Bull* . – 1984. – vol. 53. - P. 1035–1043
5. Sajise J., Valmajor H. L., Sagava Y. Some problems in isolation and culture of orchid protoplasts. *Proceedings of the Nagoya International Orchid Show (NIOS), 1990.* – P.84 – 89.
6. Kobayashi S., Kameya T., Ichihashi S. Plant regeneration from protoplasts derived from callus of *Phalaenopsis* // *Plant Tissue Culture Lett.* – 1993. - vol. 10. - P. 267 – 270.
7. Ichihashi S., Shigemura S. *Phalaenopsis* callus and protoplast culture. // *Proceedings of the 17th World Orchid conference, Malaysia, 2002.* – P.257 – 261.
8. Shrestha B. R., Tokuhara K., Mii M. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Phalaenopsis* // *Plant Cell Rep.* – 2007. - vol. 26. - P. 719 – 725.
9. Рельке Ф. Орхидеи. - М.: Лик пресс. – 1998. – 63 с.
10. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. — Киев: Наук.Думка, 1985. – 130 с.

Резюме

Подобран состав раствора для ферментации протокормов фаленопсиса (1% Cellulisin и 0,1% Macerase) и выделены протопласты в количестве достаточном для культивирования. Разработаны условия получения колоний из протопластов на среде SW1.

Підібрано склад розчину для ферментації протокормів фаленопсису (1% Cellulisin та 0,1% Macerase) і виділено протопласти в достатній для культивування кількості. Розроблено умови отримання колоній з протопластів на середовищі SW1.

Enzyme solution containing 1% Cellulisin and 0,1% Macerase was selected for protoplast isolation from protocorm-like bodies of *Phalaenopsis*. Successful colony formation from isolated protoplasts was observed on SW1 medium.

СЕЛДИМИРОВА О.А.

Институт биологии Уфимского НЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 69, e-mail: seldimirova@anrb.ru

ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА МИКРОСПОР В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ПЫЛЬНИКОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

Культура *in vitro* изолированных пыльников – эффективный биотехнологический прием, активно используемый в современных селекционно-генетических программах по созданию новых форм и сортов сельскохозяйственных культур. В основе метода культуры *in vitro* изолированных пыльников лежит феномен андроклинии, суть которого состоит в переключении программы развития морфогенетически компетентной гаплоидной клетки-микроспоры с обычного гаметофитного пути (образование пыльцевого зерна) на иной путь – спорофитный (образование гаплоидного растения) в условиях культуры *in vitro*.

Основное преимущество использования гаплоидов состоит в возможности быстрого получения гомозиготных константных гибридных линий, что, в свою очередь, облегчает оценку фенотипов по качественным и количественным признакам и дает возможность ускорить оценку перспективности полученных гибридов. Это имеет большое значение в биотехнологических исследованиях растений, в том числе яровой мягкой пшеницы – основного хлебного злака.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили сорта (Жница, Московская 35, Экада 78), линии (Фотос, Л 42809, Л 42866, Л 42875, 76/98а) и гибридные комбинации (ГП 15 (Л 42809 x Л 42866), ГП 42 (Л 42875 x 76/98а), ГП 43 (Л 42875 x Экада 78)) яровой мягкой пшеницы. Семена были предоставлены Башкирским НИИСХ РАСХН (г. Уфа).

В работе использованы: метод культуры *in vitro* пыльников яровой мягкой пшеницы с учетом эмбриологических данных [Круглова, Батыгина, 2002], метод сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [Миронов с соавт., 1996], метод приготовления постоянных препаратов растительных образцов, ранее исследованных методом СЭМ, разработанный совместно с лабораторией эмбриологии и репродуктивной биологии Ботанического института им. В.Л.Комарова РАН (г. Санкт-Петербург), метод твердофазного иммуноферментного анализа растительных образцов [Кудоярова с соавт., 1986]. Постоянные препараты просматривали и документировали с применением цифрового микроскопа проходящего света серии Микровизор μ Vizo-100. Статистическую обработку полученных результатов вели с применением программы Excel, учитывая основные статистические параметры.

Результаты и обсуждение

Экспериментально установлено, что в условиях культуры *in vitro* пыльников морфогенез сильновакуолизированных микроспор проходит следующими путями:

1. Формирование эмбриоидов - эмбриоидогенез - состоит в формировании из сильновакуолизированных микроспор зародышеподобных структур. Детальный анализ микроспориальных эмбриоидов в динамике развития *in vitro* показал, что развитие эмбриоидов принципиально сходно с развитием зиготических зародышей донорных растений пшеницы в естественных условиях. Сформированные эмбриоиды имеют все характерные для зародышей пшеницы органы.

2. Формирование полиэмбриоидов – полимерных зародышеподобных структур. Детальный анализ формирования полиэмбриоидов свидетельствует о том, что структурный механизм их образования состоит в равномерном увеличении размеров апикальной части эмбриоида и возникновении на ней множественных, симметрично

расположенных и равноценных меристематических очагов (как правило, 3-5). Впоследствии каждый из меристематических очагов дает начало щитку и апикальной меристеме побега. Как правило, все щитки частично срастаются в основании, тогда как каждая апикальная меристема является самостоятельной и окружена собственным колеоптилем.

3. Формирование морфогенных каллусов, характеризующимися наличием в их составе так называемых меристематических очагов, состоящих из клеток, обладающих морфогенетическими потенциями. В ходе дальнейшего развития меристематические очаги преобразовываются в меристематические зоны, с деятельностью клеток которых связаны процессы эмбриогенеза и органогенеза (геммогенеза – формирования почек, ризогенеза – формирования корней и гемморизогенеза – сопряженного формирования почек и корней).

4. Формирование неморфогенных каллусов, не имеющих в своем составе меристематических клеток. Такие каллусы не способны к регенерации растений, при дальнейших пересадках на питательные среды различного состава, как правило, они некротизируют и поэтому отбраковываются.

В ходе исследований выявлена следующая закономерность: независимо от генотипа индукция путей морфогенеза *in vitro* сильновакуолизированных микроспор при постепенном повышении концентрации экзогенного ауксина 2,4-Д в индукционной питательной среде Potato II всегда характеризуется определенной последовательностью: формирование эмбриоидов – формирование полиэмбриоидов – формирование морфогенного каллуса – формирование неморфогенного каллуса. Установлено, что для индукции одного и того же пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизированных микроспор пыльникам разных генотипов требуются различные концентрации экзогенной 2,4-Д в индукционной питательной среде Potato II.

Согласно данным твердофазного иммуоферментного анализа пыльники разных генотипов различаются по содержанию в них эндогенной ИУК (табл. 1).

Таблица 1

Содержание эндогенной ИУК в пыльниках исследованных генотипов перед инокуляцией на индукционную среду Potato II

Генотип	Содержание эндогенной ИУК (нг/г сухой массы)
I	63.4±12.1
II	71.6±13.3
III	295.8±49.2
IV	395.6±57.2
V	45.4±5.2
VI	105.3±17.8
VII	92.4±15.6
VIII	349.5±43.2
IX	96.7±13.5
X	33.6±4.8
XI	179.8±24.3

Условные обозначения: I – Жница, II – Московская 35, III – Экада 78, IV – Фотос, V – Л 42809, VI – Л 42866, VII – Л 42875, VIII – 76/98а, IX – ГП 15, X – ГП 42, XI – ГП 43.

Согласно критериям, предложенным [Горбунова с соавт., 2001] генотипы можно условно разделить на высокоауксиновые (III, IV, VIII, XI) и низкоауксиновые (I, II, V, VI, VII, IX, X). Для индукции одного и того же пути морфогенеза *in vitro* высокоауксиновым генотипам требуется более низкая концентрация экзогенной 2,4-Д в индукционной питательной среде Potato II, по сравнению с низкоауксиновыми генотипами (табл. 2).

Таблица 2

Влияние концентрации 2,4-Д на частоту индукции путей морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор

Генотип		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	
Частота индукции путей морфогенеза <i>in vitro</i> при концентрации 2,4-Д (мг/л)	0.1	Э	0	0	12.6±2.8	42.2±7.5	0	0	0	35.9±6.3	0	0	52.3±9.6
		ПЭ	0	0	1.8±0.4	7.8±1.3	0	0	0	6.8±1.7	0	0	5.6±1.4
		МК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		НМК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5	Э	18.4±3.5	6.1±0.5	3.2±0.6	5.5±0.9	4.5±1.2	14.5±2.9	10.0±0.9	10.2±2.5	35.3±3.2	4.6±0.4	6.9±0.6
		ПЭ	2.6±0.8	0.6±0.2	11.1±1.9	38.2±8.6	0	4.7±0.8	3.3±0.7	50.0±4.5	4.1±0.8	0.5±0.1	33.3±2.9
		МК	0	0	0	5.7±1.2	0	0	0	3.5±1.0	0	0	3.1±0.9
		НМК	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1.0	Э	0.5±0.1	1.4±0.4	0.4±0.1	0	10.0±0.9	2.9±0.8	2.4±0.7	0	5.6±0.5	1.4±0.4	0
		ПЭ	23.3±4.8	14.1±2.9	2.7±0.3	1.6±0.5	2.1±0.6	25.1±4.3	33.5±8.5	10.7±1.5	30.6±6.1	4.1±0.4	2.4±0.7
		МК	2.1±0.4	5.7±1.4	3.2±0.5	57.4±9.5	0.3±0.1	6.8±1.3	1.9±0.6	36.4±6.3	2.1±0.6	0.7±0.1	42.7±8.3
		НМК	0	0	0	0.5±0.1	0	0	0	5.3±1.3	0	0	7.9±1.9
	1.5	Э	0	0	0	0	3.7±0.8	0	0	0	0.2±0.1	0	0
		ПЭ	2.7±0.7	3.4±0.9	3.9±0.8	0	13.5±7.2	5.6±0.9	9.4±1.6	2.5±0.7	1.3±0.4	0	0
		МК	12.3±2.1	12.7±2.3	19.5±2.7	13.0±1.6	2.6±0.7	42.1±6.2	29.5±2.7	26.1±2.3	17.4±2.9	5.4±1.4	5.8±0.5
		НМК	0.4±0.1	3.2±0.5	4.2±0.8	11.4±2.1	0	3.8±0.9	6.2±1.5	8.3±2.4	3.2±0.6	0.2±0.1	21.2±4.3
	2.0	Э	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ПЭ	0	0	0	0	1.4±0.2	0.4±0.1	0.5±0.1	0	0	0	0
		МК	44.5±7.3	28.1±4.9	11.1±3.9	0.8±0.1	11.5±2.6	13.2±2.6	10.2±1.7	2.4±0.7	41.3±6.0	6.3±0.8	0
		НМК	7.1±1.1	5.7±1.0	5.6±1.6	24.5±4.4	6.1±1.0	19.4±3.7	13.4±2.7	15.8±3.1	5.7±1.0	1.5±0.4	13.2±2.2
	2.5	Э	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ПЭ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		МК	8.6±1.5	2.8±0.5	2.3±0.3	0	5.2±1.3	9.6±1.6	1.1±0.3	0	12.5±2.5	1.8±0.3	0
		НМК	13.8±2.6	12.6±1.9	13.9±1.9	6.2±0.9	12.8±2.1	28.0±5.0	23.4±3.8	7.4±1.6	14.3±2.9	4.2±0.9	3.1±0.7
	3.0	Э	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ПЭ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		МК	1.4±0.3	2.2±0.4	0	0	1.2±0.2	3.5±1.0	0.2±0.1	0	4.5±0.9	0	0
		НМК	29.1±5.8	17.3±2.6	2.1±0.5	0.3±0.1	8.6±1.5	14.3±2.4	6.0±0.5	0	19.3±3.7	0	0

Условные обозначения: Э – формирование эмбриоидов, ПЭ – формирование полиэмбриоидов, МК – формирование морфогенных каллусов, НМК – формирование неморфогенных каллусов. Обозначения генотипов как в табл. 1.

Примечание: частоту индукции путей морфогенеза *in vitro* определяли как количество сформировавшихся структур на 100 пыльников.

Таким образом, установлено, что индукция конкретного пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор определяется балансом эндогенного ауксина ИУК (в пыльниках перед инокуляцией) и экзогенного ауксина 2,4-Д (в индукционной питательной среде Potato II).

Очевидно, что в зависимости от целей конкретной технологии целесообразно индуцировать определенный путь морфогенеза *in vitro*. Так, одноклеточное происхождение эмбриоидов и полиэмбриоидов из микроспор делает возможным сохранение генетической однородности и является основой для биотехнологически оптимального способа клонирования полноценных плодоносящих гибридов яровой мягкой пшеницы с закрепленным гетерозисным эффектом. Кроме того, формирование у полиэмбриоидов множественных апикальных меристем побегов позволяет значительно увеличивать выход гаплоидных растений-регенерантов, что существенно при массовом характере селекционной работы. Получение растений-регенерантов через каллусную культуру (посредством гемморизогенеза, что позволяет избегать процедур многократных пересадок каллусов на среды разного состава) целесообразно при массовом тиражировании гаплоидов, а также для повышения соматоклональной изменчивости, которая является основой для получения новых признаков.

Предварительная оценка содержания эндогенной ИУК в пыльниках перед инокуляцией на индукционную питательную среду Potato II позволяет определить диапазон концентраций экзогенной 2,4-Д, необходимой для индукции желаемого пути морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор.

Выводы

Метод культуры *in vitro* изолированных пыльников – биотехнологический прием, перспективный в современных селекционно-генетических программах по созданию новых форм растений. Разработан методический подход, который на основании данных иммуноферментного анализа по содержанию эндогенной ИУК в пыльниках перед инокуляцией на индукционную питательную среду Potato II позволяет управлять путями морфогенеза *in vitro* сильновакуолизованных микроспор в нужном для исследователя направлении. Это, в свою очередь, оптимизировать биотехнологические исследования, связанные с массовым тиражированием гаплоидов.

Исследование поддержано РФФИ-Поволжье (грант № 08-04-97045), а также программой Президента РФ «Ведущие научные школы РФ» (грант № НШ 2096.2008.4, лидер Школы – чл.-корр. РАН Т.Б.Батыгина).

Литература

1. Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. – Уфа. – 2002. – 22 с.
2. Миронов Н.В., Комиссарчик В.Л., Соколов А.Д. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. – М. – 1996. – 243 с.
3. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиол. раст. – 1986. – Т. 33, № 6. – С.1221-1227.
4. Горбунова В.Ю., Круглова Н.Н., Абрамов С.Н. Индукция андрогенеза *in vitro* у яровой мягкой пшеницы. Баланс эндогенных и экзогенных фитогормонов // Известия РАН. Серия биол. – 2001. – № 1. – С. 31-36.

Резюме

На основании данных твердофазного иммуноферментного анализа разработан методический подход, позволяющий управлять путями морфогенеза сильновакуолизованных микроспор в культуре *in vitro* изолированных пыльников яровой мягкой пшеницы.

Based on the immunoassay data the methodical approach has been developed. This approach allows operating the morphogenesis pathways *in vitro* of high vacuolated microspores in isolated anthers culture of spring soft wheat.

СТРАШНІЮК Н.М.¹, КРАВЕЦЬ Н.Б.¹, КОНВАЛЮК І.І.², МЕЛЬНИК В.М.²

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, Україна, 46027, Тернопіль, вул. М.Кривоноса, 2, e-mail: strashniuk@mail.ru

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150, e-mail: v.m.melnyk@imbg.org.ua

ОРГАНОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ ТКАНИН ВИДІВ РОДУ ТИРЛИЧ (*GENTIANA* L.).

Морфогенез рослин, що веде до регенерації шляхом органогенезу чи соматичного ембріогенезу, залежить від внутрішніх (видова приналежність та особливості генотипу вихідної рослини) та зовнішніх чинників. Фізіологічні, біохімічні, молекулярні процеси, які лежать в основі морфогенезу, вивчені недостатньо, що не дає можливості створити теорію морфогенезу. Детальних досліджень потребують і сигнальні системи, відповідальні за індукцію диференціації, органогенезу та їх зв'язок з регуляцією клітинного циклу. Вважається, що в ініціації органогенезу вирішальна роль належить балансу ендогенних фітогормонів, які кількісно змінюючись, можуть впливати на компетентність клітин до своєї дії, наслідками якої є індукція органогенезу [1, 2].

Зручною моделлю для дослідження фізіологічних, біохімічних та молекулярних особливостей процесів морфогенезу є культура *in vitro* рослин [1, 3]. Окрім фундаментального використання культури клітин, тканин, органів має важливе прикладне значення, особливо для збереження генофонду та відновлення популяцій цінних рідкісних та зникаючих видів. До таких рослин відносяться і досліджувані нами види роду *Gentiana* L., які є припадками об'єктами для введення в культуру *in vitro* та одержання клітинних ліній-продуцентів цінних біологічно активних речовин [4, 5]. У літературі також наявні повідомлення про вдалі спроби регенерації пагонів тирличів, які, проте, стосуються здебільшого азійських видів: *G. macrophylla*, *G. kurroo*, *G. crassicaulis*, *G. tibetica*, *G. scabra*, *G. triflora*, *G. dahurica* [6-12].

Завданням проведеного дослідження було підібрати умови органогенезу з отриманих нами раніше культур тканин кореневого походження деяких видів роду Тирлич (*Gentiana* L.) флори України.

Матеріали і методи

Вихідним матеріалом слугували калюсні культури кореневого походження, отримані від рослин з різних популяцій: *G. lutea* (полонина Рогнеска, хр. Чорногора – на 11 пасажі та г. Трояска, хр. Свидовець - на 10 пасажі), *G. pneumonanthe* (Корюківське лісництво, Чернігівська обл. – на 9 пасажі та с. Вигода, Івано-Франківська обл. – на 9 і 19 пасажах), *G. acaulis* (г. Туркул та г. Ребра, хр. Чорногора – на 8 і 9 пасажах відповідно), *G. cruciata* (с. Креничі, Київська обл. та природний заповідник «Медобори», Тернопільська обл. – на 10 пасажі) та *G. verna* (урочище Гереджівка, смт. Ясиня, Закарпатська обл. – на 10 пасажі), які вирощували на агаризованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) з половинним вмістом макро- та мікросолей, доповненому 0,1 мг/л 6-бензиламінопурину (БАП) і 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксіоцтової кислоти. Тривалість пасажу становила 4 тижні [13, 14].

З метою індукції регенерації як базове використовували середовище МС, доповнене комбінаціями різних концентрацій фітогормонів: 1) тидіазурон (ТДЗ) (1, 5, 10, 20 мг/л) + 1-нафтилоцтова кислота (НОК) (0,01; 0,1; 0,2; 0,5; 1 мг/л); 2) БАП (0,1; 0,2; 0,5 мг/л) + НОК (1,0; 1,5; 2; 3; 4; 5,0 мг/л). Експеримент проводили у 3-х повторностях. Інокулюми кожної із досліджуваних калюсних тканин висаджували у

чашки Петрі по 15-20 штук у кожному. Загальна кількість протестованих інокулюмів у кожному варіанті досліду складала 50-60.

Результати та обговорення

Оптимальним для індукції органогенезу було живильне середовище МС, доповнене 10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК. Через 2 пасажі культивування калюсів *G. pneumonanthe* та *G. cruciata* на цьому середовищі за умови освітлення відбувалося формування осередків регенерації, а під кінець 3-го пасажу (*G. pneumonanthe* та *G. cruciata*, заповідник «Медобори») і 4-го (*G. cruciata*, с. Креничі) – регенерація коренів та пагонів. У інших досліджуваних зразків (за винятком *G. verna*) на цьому середовищі за цей же проміжок часу спостерігали лише позеленіння окремих ділянок калюсу. У випадку *G. lutea* формування осередків регенерації у культурі тканин відбувалося через 4 (пол. Рогнеска) і 5 (г. Трояска) місяців. Виявлені органогенні ділянки залишалися без змін впродовж 3-4-х наступних пасажів. У культурі тканин *G. acaulis* (г. Ребра) на 7-му пасажі вирощування на середовищі МС з 10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК відбувалося формування осередків регенерації, а на 8-му – ризогенез. У калюсі цього виду, отриманому від рослини з іншої популяції (г. Туркул), на 7-8-му пасажах вирощування на такому ж середовищі спостерігалось лише позеленіння усіх інокулюмів, осередки регенерації не формувалися. Культура тканин *G. verna* впродовж 2-х пасажів залишалася без змін, протягом 3-5-го – спостерігали потемніння калюсу, на 6-му – починали формуватися ділянки сірувато-зеленуватого кольору.

На варіантах живильних середовищ з іншими концентраціями ТДЗ і НОК, а також з БАП і НОК, спостерігали наступне: калюс лише проліферував, видимі ознаки регенерації були відсутні (МС з усіма концентраціями БАП і НОК); крім проліферації, відбувалося позеленіння невеликих ділянок, які впродовж подальшого культивування залишалися без змін (з 1 або 5 мг/л ТДЗ і НОК); спостерігали потемніння калюсу та його некроз (20 мг/л ТДЗ і НОК).

Регенераційна здатність залежала від видової приналежності вихідної рослини. У випадку калюсів *G. pneumonanthe* спостерігали регенерацію пагонів і коренів, тоді як у культурі тканин *G. cruciata* та *G. acaulis* – лише коренів. За відсотком ризогенезу та кількістю коренів на експлант найбільшою регенераційною здатністю характеризувалися калюси *G. pneumonanthe* від рослин з обох досліджених популяцій і найменшою – *G. acaulis* (табл.).

Табл. Порівняння ефективності ризогенезу та пагоноутворення у культурі тканин деяких видів *Gentiana*

Вид	Локалітет	Номер пасажу	Ефективність ризогенезу		Ефективність пагоноутворення	
			% регенерації	к-сть кор./експл.	% регенерації	к-сть паг./експл.
<i>G. pneumonanthe</i>	с. Вигода	9	100	21,7±1,7	17,4±2,1	0,2±0,02
		19	81,8±6,5	6,6±0,5	9,1±0,8	0,5±0,04
	Корюківське лісництво	9	100	9,3±0,8	16,7±1,4	0,4±0,04
<i>G. cruciata</i>	3-ник «Медобори»	13	25±1,9	0,38±0,04	–	–
	с. Креничі	14	36,4±3,7	0,63±0,05	–	–
<i>G. acaulis</i>	г. Ребра	17	16,7±1,7	0,17±0,02	–	–

Окрім цього, інтенсивність органогенезу залежала від генотипу вихідної рослини. Зокрема, при порівнянні калюсів *G. pneumonanthe* одного віку (9-ий пасаж) кількість коренів на експлант (при однаковому відсотку ризогенезу) у культурі тканин,

отриманій з рослини вигодської популяції, у 2,3 рази перевищувала цей показник у калюсі від рослини іншої популяції (Корюківське лісництво). Відсоток регенерації пагонів, як і коренів, у цих двох культурах практично не відрізнявся, проте кількість пагонів на експлант у калюсі від рослини корюківської популяції була вдвічі більшою (табл.). Більшою регенераційною здатністю серед досліджених калюсів *G. cruciata* характеризувалася культура тканин від рослини з креницької популяції. Показники ефективності ризогенезу – відсоток регенерації та кількість коренів на експлант, у цій культурі в 1,5 та 1,7 рази відповідно перевищували такі у культурі з іншої популяції (табл.).

Здатність до органогенезу калюсу *G. pneumonanthe* залежала від тривалості його вирощування. Зокрема показано, що із збільшенням тривалості культивування калюсу *G. pneumonanthe* (с. Вигода) з 9 до 19 пасажу показник загальної кількості регенерантів (коренів і пагонів) на експлант зменшується втричі (рис.). Для цього виду ефективність ризогенезу була на порядок (а в одному випадку – на два порядки) вищою за пагоневиий органогенез (табл.).

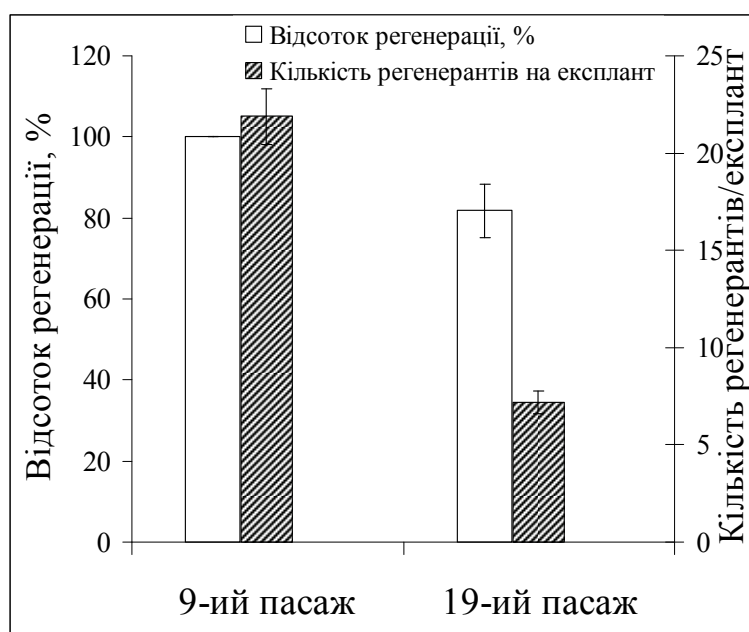


Рис. Залежність органогенезу (коренів і пагонів) від тривалості вирощування калюсу *G. pneumonanthe* (с. Вигода).

Висновки. Серед досліджених видів найбільшу здатність до регенерації виявлено у культурі тканин *G. pneumonanthe*. Оптимальним для індукції органогенезу було живильне середовище МС, доповнене 10 мг/л ТДЗ і 1 мг/л НОК. Інтенсивність органогенезу залежала як від генотипу вихідної рослини, так і від тривалості вирощування калюсів. Ефективність ризогенезу *G. pneumonanthe* була на порядок (а в одному випадку на два порядки) вищою за пагоневиий органогенез.

Література

1. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
2. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. – К.: Наукова думка, 2005. – 270 с.
3. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиол. раст. – 1999. – Т.46, №6. – С. 837-844.

4. Menkovic N., Savikin-Fodulovic K., Momcilovic I., Grubisic D. Quantitative determination of secoiridoid and gamma-pyrone compounds in *Gentiana lutea* cultured *in vitro* // *Planta Med.* – 2000. – Vol. 66, № 1. – P. 96-98.
5. Chueh F.S., Chen C.C., Sagare A.P., Tsay H.S. Quantitative determination of secoiridoid glucosides in *in vitro* propagated plants of *Gentiana davidii* var. *formosana* by high performance liquid chromatography // *Planta Med.* – 2001. – Vol. 67, № 1. – P. 70-73.
6. Jomori H., Takahata Y., Kaizuma N. Plant regeneration from leaf-derived calli of gentians and their protoplast culture // *Acta Hort.* – 1995. – Vol. 392. – P. 81-86.
7. Cao J-P., Liu X., Hao J-G., Zhang X-Q. Tissue culture and plantlet regeneration of *Gentiana macrophylla* // *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica.* – 2005. – Vol. 25 – P. 1101–1106.
8. Fiuk A., Rybczyński J.J. Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants // *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.* – 2008. – Vol. 44, №2. – P. 90 – 99.
9. Meng Y-L., Gao Y-P., Jia J-F. Plant regeneration from protoplasts isolated from callus of *Gentiana crassicaulis* // *Plant Cell Reports.* – 1996. – Vol. 16. – P. 88-91.
10. Chen L., Xu Z. Somatic embryogenesis pathway for plant regeneration in Qinjiao (*Gentiana macrophylla* Pall.) // *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao.* – 2007. – Vol. 40, №4. – P. 267-271.
11. Nakano M., Hosokawa K., Oomiya T., Yamamura S. Plant regeneration from protoplasts of *Gentiana* by embedding protoplasts in gellan gum // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1995. – Vol. 41. – P. 221-227.
12. Голубенко А.В. Морфогенез та особливості вегетативного розмноження видів роду *Gentiana* L. *in vitro*: Дис. ... канд. біол. наук: 03.00.12. – К., 2005. – 193 с.
13. 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.
14. 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.) // «Наукові записки» Тернопільського національного педагогічного університету ім. Володимира Гнатюка. Серія 4: Біологія, №3-4 (26). – 2006. – С. 100-107.

Резюме

Досліджено здатність до органогенезу культури тканин деяких видів роду *Gentiana* L. (*Gentianaceae*). Показано залежність регенерації від різних чинників – складу живильного середовища, генотипу рослини-донора, тривалості вирощування калюсів. Підібрано оптимальне живильне середовище для індукції органогенезу у тирличів.

Исследована способность к органогенезу культуры тканей некоторых видов рода *Gentiana* L. (*Gentianaceae*). Показана зависимость регенерации от разных факторов – состава питательной среды, генотипа растения-донора, длительности выращивания каллусов. Подобрана оптимальная питательная среда для индукции органогенеза в горечавок.

Capability of tissue cultures from some *Gentiana* L. species (*Gentianaceae*) for organogenesis has been studied. Regeneration potential was shown to vary with some stimuli: nutrient medium composition, original plant-donor genotype, duration of callus maintenance. Optimal nutrient medium composition to induce organogenesis in gentians was specified.

ТРЕТЬЯКОВА И.Н., БАРСУКОВА А.В., ИЖБОЛДИНА М.В.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: culture@ksc.krasn.ru

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ХВОЙНЫХ: ИНИЦИАЦИЯ, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, ВЫЗРЕВАНИЕ

К настоящему времени накоплен определенный фактический материал по изучению морфологических, физиологических, цито-гистологических и молекулярных особенностей формирования и развития морфогенных каллусов и соматических зародышей различного происхождения у представителей семейства сосновых (Lelu et al., 1994, 2008; Klimaszewska, Сур, 2002; Белоруссова, Третьякова, 2008 и др.). Получены данные о длительном сохранении пролиферирующей эмбриональной массы хвойных путем криоконсервации (Park, 2002), которую можно использовать в программе MVF (Multi variety forest), широко используемой за рубежом. Однако до сих пор не разработан комплексный цитофизиологический подход и не полностью решены те аспекты фундаментальной проблемы морфогенеза (тотипотентность, детерминация и компетентность, дифференциация и дедифференциация), которые можно решить на примере именно соматического эмбриогенеза как модельной системы. Отсутствуют работы по сравнению цито-гистологического статуса морфогенных (эмбриональной массы) и не морфогенных каллусов различного происхождения во всей динамике их развития, вплоть до вызревания соматических зародышей и растений регенерантов. Далеким от окончательного решения остается вопрос о сходстве и различии морфогенеза полового и соматического зародышей в естественных условиях и в культуре *in vitro*. Недостаточна сравнительная информация по анатомии и морфологии проростков, возникших из половых и соматических зародышей. Недостаточно разработаны способы управления путями соматического эмбриогенеза в контролируемых условиях культуры *in vitro*.

Технология соматического эмбриогенеза остается проблематичной для ряда видов хвойных, в том числе и видов, произрастающих на территории России (Третьякова и др., 2007). Критическим моментом является процесс созревания соматических зародышей, поскольку он влияет на жизнеспособность полученных зародышей, и их способность прорасти и продуцировать нормальные растения-регенеранты.

Цель исследования - разработка биотехнологии получения соматических зародышей у основных лесообразующих хвойных видов Сибири.

Материалы и методы

Объектом исследований служили деревья сосны сибирской (кедр сибирский, *Pinus sibirica* Du Tour) – основного орехоносного вида Сибири, произрастающего в естественном древостое Западного Саяна и на клоновых прививочных плантациях Западно-Саянского Опытного лесного хозяйства, а также лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), произрастающей в естественных насаждениях на территории Республики Хакасия и Тыва, в искусственных насаждениях и клоновых плантациях (Красноярский край). На клонах кедра сибирского и лиственницы сибирской проводятся опыты по контролируемому опылению, с использованием в качестве опылителей пыльцу плюсовых деревьев и уникальные гетерозисных форм с однолетним развитием женской шишки (кедр сибирский), а также деревьев лиственницы сибирской, устойчивых к лиственничной почковой галлице. С указанных выше деревьев производился сбор семян на стадии формирования семядольных зародышей (июль). Семена стерилизовались и из них извлекались зародыши, которые вводились в культуру *in vitro*

Для инициации эмбриональной массы из зиготических зародышей использовались базовые среды ½ MS, MS, (Murashige, Skoog 1962), ½ LV, LV, MSG, (Plant cell...1995)

и МА (неопубликованные данные) с добавлением мезоинозита, L-глутамина, фитогормонов: 2,4-Д и 6-БАП, сахарозы, а также агара или Gelrite. Для пролиферации эмбриональной массы концентрация 6-БАП, 2,4-Д и сахарозы снижалась в 2-4 раза (у разных видов по-разному). Эксперименты по индукции и пролиферации эмбриогенного каллуса проводились в темноте при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Для перехода соматических зародышей к созреванию экспланты культивировались на безгормональных базовых средах с активированным углем в течение 1 нед. Для созревания соматических зародышей в среды добавлялись мезоинозит, L-глутамин, 2,4-Д, АБК, ИМК, сахароза, а также Gelrite. Культивирование проводилось на свету, при 16-ти часовом фотопериоде и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для проведения цитологического анализа использовались давленные препараты. Окраска эксплантов проводилась сафранином с добавлением капли метиленового синего. Просмотр микроскопических образцов осуществлялся на микроскопе МБИ-6. Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Морфологические изменения фиксировались цифровой фотокамерой Fujifilm FinePix S7000 (Япония).

Результаты и обсуждение

Экспериментальным путем было показано, что процесс реализации соматического эмбриогенеза у изучаемых хвойных видов Сибири – процесс многоступенчатый, состоящий из индукции эмбриогенного каллуса (ЭК), пролиферации эмбрионально-суспензорной массы (ЭМС), вызревании соматических зародышей и их прорастания. На всех этапах соматического эмбриогенеза у видов хвойных использовались базовые среды с различными модификациями макро и микроэлементов, витаминов, азотистых соединений и гормонов.

На индукционной среде под действием гормонов 6-БАП и 2,4-Д соматические клетки зиготических зародышей лиственницы сибирской и кедра сибирского на 5-10 сут. культивирования начинали интенсивно растягиваться в длину и превращаться в эмбриональные трубки размером 200-300 мкм. Эмбриональные трубки в результате неравного деления образовывали мелкие эмбриональные клетки диаметром 39-47 мкм. В течении 1 месяца эмбриональные клетки активно делились и образовывали эмбриональные глобулы, которые окружались эмбриональными трубками. Наблюдалось образование эмбрионально-суспензорной массы. Пересадка ЭМС на пролиферирующие среды с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы вызывала интенсивную пролиферацию ЭСМ, в которой шел активный климаж. Через 1 мес. культивирования на этих средах возникали торпедообразные соматические зародыши. При субкультивировании ЭСМ на базовых средах, содержащих АБК и ИМК, соматические зародыши приобретали биполярную структуру: на одном из полюсов формировались примордии семядолей, на другом – зародышевый корешок и хорошо развитый суспензор. При переносе соматических зародышей лиственницы сибирской на базовую безгормональную среду с активированным углем происходило быстрое прорастание соматических зародышей (в течение 7 дней) и образование растений-регенерантов. Формировались чистые эмбриогенные линии.

Наблюдения за динамикой роста ЭК показали, что процессы инициации и пролиферации каллуса у разных генотипов идут с неодинаковой скоростью. Из 17 эксплантов плюсовых деревьев кедра сибирского выделился один индивидуум, у которого объем эмбриогенного каллуса в 2-3 раза превышал объем каллусов остальных плюсовых деревьев (1600мм^3 против $600-900\text{мм}^3$). Наиболее активное образование ЭК шло у клонов в вариантах опыления пыльцой гетерозисного дерева с однолетним формированием женских шишек. Объем ЭК достигал 4460мм^3 за 50 дней культивирования. Динамика роста ЭК и образование соматических зародышей у лиственницы сибирской происходило аналогично кедру сибирскому. Среди 150 генотипов выделились 30 % генотипов у которых шло интенсивное образование

эмбрионного каллуса, у 40 генотипов образование эмбрионного каллуса шло значительно слабее и у 30% генотипов формирование эмбрионного каллуса вообще не наблюдалось. Особенно заслуживает внимание генотип донора лиственницы сибирской, который отличался устойчивостью к повреждению лиственничной почковой галлицей, у которого формирование эмбрионного каллуса шло со значительной скоростью. У данного генотипа наблюдалось активное образование соматических зародышей. На среде вызревания (базовая среда с АБК и ИМК) шло активное формирование семядольных соматических зародышей, формировалась чистая эмбрионная линия, способная продуцировать массовое образование соматических зародышей.

Образование эмбрионного каллуса, его пролиферация и формирование соматических зародышей, а так же их вызревание у лиственницы сибирской занимает 4-6 месяцев, у кедра сибирского 7-10 месяцев. Длительность этого процесса в основном согласуется с другими видами лиственницы и сосны (Lelu et al., 1994, 2008; Klimaszewska. Суг, 2002 и др.). При этом соматические клетки зиготического зародыша становятся на путь развития зиготы. Аналогично зиготическим зародышам, морфогенез соматических зародышей включает последовательное прохождение стадий проэмбрио, кливажа, образование глобулярных и торпедообразных зародышей, после которых осуществляются процессы дифференцировки - формируются апексы побега и корня, гипокотиль и семядоли, наконец, происходит прорастание соматических зародышей в растения – регенеранты. Реализация соматического процесса, требует применения разных химических соединений, в том числе фитогормонов и различных физических предобработок. Поэтому соматический эмбриогенез у хвойных видов можно использовать как модельную систему в эмбриологических исследованиях. С помощью эмбрионных культур можно получать генетически модифицированные растения, подвергать их криоконсервации и создать банк генов улучшенных генотипов.

Не исключено, что развитие соматических зародышей может быть архивировано у всех видов растений, включая и хвойные, для которых характерно наличие полиархеогониальности и полиэмбрионии (Singh, 1978). Возникновение множественных зародышей в одном гаметофите (у сосен до 16), полученных от разных отцов, наличие апомиксиса у сосен свидетельствует о множественном пути реализации их репродуктивного потенциала (Минина, Ларионова, 1979; Третьякова, 1990). Реализация этого потенциала широко проявляется в условиях культуры *in vitro* и, прежде всего, через соматический эмбриогенез.

Выводы

У представителей сибирских видов хвойных путем подбора состава питательных сред были получены ЭК и соматические зародыши. Выявлены генотипы донорских растений лиственницы сибирской и сосны сибирской, способные давать чистые эмбрионные линии, соматические зародыши и растения - регенеранты.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 08-04-00107, интеграционного гранта № 53Б.

Литература

1. Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. - 2008. – Т. 39, № 2. - С. 1-10.
2. Минина Е. Г., Ларионова Н. А. Морфогенез и проявление пола у хвойных. – М.: Наука, 1979. – 216 с.
3. Третьякова И. Н. Эмбриология хвойных: физиологические аспекты. – Новосибирск: Наука, 1990. – 157 с.
4. Третьякова И.Н., Белоруссова А.С., Носкова Н.Е., Савельев С.С., Лукина А.В., Барсукова А.В. Ижболдина М.В., Череповский Ю.А. Перспективы применения

методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов // Хвойные бореальной зоны.-2007. - Т. 24, №2-3. - С.309-318.

5. *Klimaszewska K., Cyr D. R.* Conifer somatic embryogenesis: I. Development // *Dendrobiology*. – 2002. – Vol. 48. – P. 31-39.

6. *Lelu M. A., Bastien C., Klimaszewska K., Charest P.J.* An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control for germination and plantlet development // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 1994. – Vol. 36. – P. 117-127.

7. *Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K.* Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss Organ Cult* – 2008 – Vol. 92 – P. 31–45

8. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, №4. – P. 473-497.

9. *Park Y-S.* Implementation in conifers somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirement and development considerations // *Ann. For. Sci.* – 2002. – Vol. 59. – P. 651-656.

10. *Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips.* – Berlin: Springer-Verlag, 1995. – 358 pp.

11. *Singh H.* Embryology of gymnosperms / Berlin-Stuttgart: Gebrüder Borntraeger, 1978. – 304 p.

Резюме

Инициация соматического эмбриогенеза у лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) проводилась с использованием зиготических зародышей на разных стадиях их развития. Культивирование велось на среде ½ MS, MS, ½ LV, LV и MSG, и MA с гормонами 2,4-Д, 6-БАП, ИМК и АБК в разных концентрациях. Успешность соматического эмбриогенеза обусловлена гормональной регуляцией и связана с генотипом дерева.

Induction of somatic embryogenesis in Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) has been conducted from zygotic embryos. Culturing was made on ½ MS, MS, ½ LV, LV, MSG and MA nutrition media with hormones 2.4-D, 6-BAP, IBA and ABK in different concentrations. The success of somatic embryogenesis is due to hormonal regulation and tree genotypes.

ЯРУЛЛИНА Л.Г., ТРОШИНА Н.Б., СУРИНА О.Б.

Учреждение Российской академии наук Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН

Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, e-mail: phyto@anrb.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОВМЕСТНЫХ КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ

Одной из первоочередных проблем современной биологии является выявление путей формирования устойчивости растений к фитопатогенам. Важный этап в формировании защитного эффекта – резкая и многократная активация локализованных в клеточной стенке и плазмалемме оксидоредуктаз, регулирующих уровень активных форм кислорода [Kawano, 2003]. В последнее время появились данные о влиянии фитогормонов на экспрессию генов оксидоредуктаз. Так экспрессия гена оксалатоксидазы находится под контролем ауксина [Berna, Bernier, 1999], НАДФН-оксидаза активируется АБК [Guan et al., 1997], цитокинины участвуют в регуляции

экспрессии гена пероксидазы [Dong, 1998].

Удобной моделью для изучения механизмов формирования защитных реакций растений к фитопатогенам могут служить совместные культуры растительных клеток с возбудителями болезней. Такая культура у нас была получена с использованием каллусов пшеницы и спор гриба *Tilletia caries*, причем обнаружены различия в степени инфицируемости грибом различных участков каллуса. В задачу данной работы входило изучение влияния экзогенных гормонов на морфологию и устойчивость к возбудителю твердой головки каллусов пшеницы различной устойчивости, обусловленную накоплением перекиси водорода с участием оксалактоксидазы.

Материалы и методы

В качестве эксплантов для получения каллусов использовали незрелые зародыши пшеницы *Triticum aestivum* L. сортов Жница и Заря и пшеницы *T. timopheevii* Zhuk. Зародыши пшеницы изолировали через 12–15 сут после начала цветения растений из сформировавшихся зерновок. Изолированные зародыши высаживали на среду Мурасиге и Скуга (МС) и культивировали при 26 °С в темноте. В опытных вариантах каллусы культивировали в присутствии ИУК и АБК в концентрации 2 мг/л, кинетина в концентрации 0.2 мг/л. На 3 сут от начала 2-ого пассажа часть каллусов инфицировали телиоспорами возбудителя твердой головки *T. caries* (DC.) Tul. О степени устойчивости каллусов к грибу судили по скорости прорастания телиоспор и площади поверхности каллусов, покрытой его мицелием, через 20 сут после инокуляции каллусов.

Результаты и обсуждение

Контрольные каллусы восприимчивого к возбудителю твердой головки сорта Жница характеризовались как слабо обводненные, рыхлые, крупно глобулярные образования, имеющие небольшое количество плотных участков (в среднем 2-3 на каллус) (рис. 1-*а*). Присутствие в среде культивирования фитогормонов по-разному влияло на морфологию каллусов. Так, введение АБК или кинетина в среду культивирования приводило к 2-х кратному увеличению количества плотных участков на фоне сокращения площади рыхлого каллуса (рис. 1-*б*, *в*). Кроме того, присутствие кинетина в среде культивирования в этот срок опыта инициировало появление в каллусах единичных ризоидов. Введение ИУК в среду культивирования приводило к разрыхлению каллусов и инициировало в них ризогенез (рис. 1-*г*). Инфицирование каллусов пшеницы сорта Жница инициировало ризогенез (рис. 1-*а*), что, вероятно, связано со способностью патогена секретировать в растительные ткани ауксины.

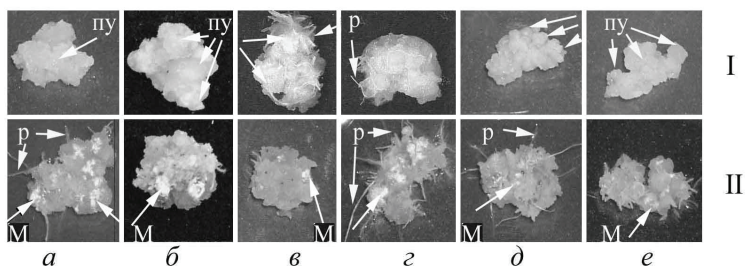


Рис. 1. Влияние фитогормонов на морфологию и устойчивость к возбудителю твердой головки каллусов пшеницы сорта Жница (а-г), Заря (д) и *T. timopheevii* (е) через 20 сут после нанесения спор: I – неинфицированные каллусы; II- инфицированные каллусы; а – контрольная среда; б-г – питательная среда, содержащая фитогормоны АБК (б), кинетин (в) и ИУК (г). Стрелками указаны: М – мицелий гриба; пу – плотные участки; р - ризоиды.

Присутствие фитогормонов в среде культивирования изменяло защитные свойства каллусов. Так, если в контроле споры гриба начинали прорастать через 7 сут после инокуляции, то в варианте опыта с ИУК это происходило уже через 5 сут, а с

АБК и кинетином только через 8 сут. В ходе инфицирования мицелий гриба рос на контрольных каллусах и на каллусах, культивируемых с ИУК, довольно быстро и через 20 сут после инфицирования покрывал примерно 40-50 % поверхности каллусов (рис. 1-Па, з). Введение в питательную среду АБК и кинетина замедляло распространение мицелия в каллусе и к указанному сроку мицелий покрывал только около 20 % поверхности каллусов (рис. 1-Пб, в). Таким образом, внесение ИУК в среду культивирования каллусов пшеницы сорта Жница способствовало росту возбудителя твердой головни, в то время как введение АБК и кинетина, напротив, существенно ограничивало распространение мицелия. Вероятно, повышение устойчивости было обусловлено появлением в каллусах плотных участков, а снижение устойчивости - разрыхлением каллусов.

Наши наблюдения показали, что контрольные каллусы устойчивых форм мягкой пшеницы сорта Заря и образца к-58666 пшеницы Тимофеева представляли собой плотные, глобулярные образования (рис. 1-Пд, е). Инфицирование инициировало в них единичный ризогенез. Обнаружено, что на каллусах пшеницы сорта Заря споры гриба прорастали через 9 сут, на каллусах пшеницы Тимофеева только через 10 сут. Более того, спустя 3 недели после инокуляции мицелий возбудителя твердой головни покрывал только 10 % площади поверхности каллусов устойчивых образцов пшеницы (рис. 1-Пд, е). Совокупность полученных данных показывает, что одним из факторов устойчивости каллусов является их высокая структурированность.

Как известно, H_2O_2 является сигнальной молекулой и участвует в запуске защитных реакций в растениях, в то же время, в нормальных условиях она участвует в процессах морфогенеза. В интактных каллусах высоко устойчивого образца пшеницы *T. timopheevii* содержание перекиси водорода было самым высоким и составляло 32.1 ± 1.8 мкМ/г по сравнению с $15,0 \pm 0.9$ мкМ/г в каллусах пшеницы восприимчивого сорта Жница (рис. 2). При инфицировании в каллусах всех исследуемых видов пшеницы концентрация H_2O_2 повышалась в различной степени. Так, если в инфицированных каллусах пшеницы *T. timopheevii* содержание H_2O_2 увеличивалось на 66%, пшеницы сорта Заря – на 53%, то в каллусах пшеницы сорта Жница только на 26% относительно контроля (рис. 2). Добавление ИУК в среду культивирования каллусов пшеницы сорта Жница приводило к повышению уровня перекиси водорода на 35% (рис. 2). В то же время в варианте с АБК содержание H_2O_2 превышало контрольный вариант на 45%, а с кинетином – на 57% (рис. 2). Таким образом, ограничение роста патогена могло быть обусловлено повышением содержания перекиси водорода в каллусах пшеницы сорта Жница под воздействием фитогормонов.

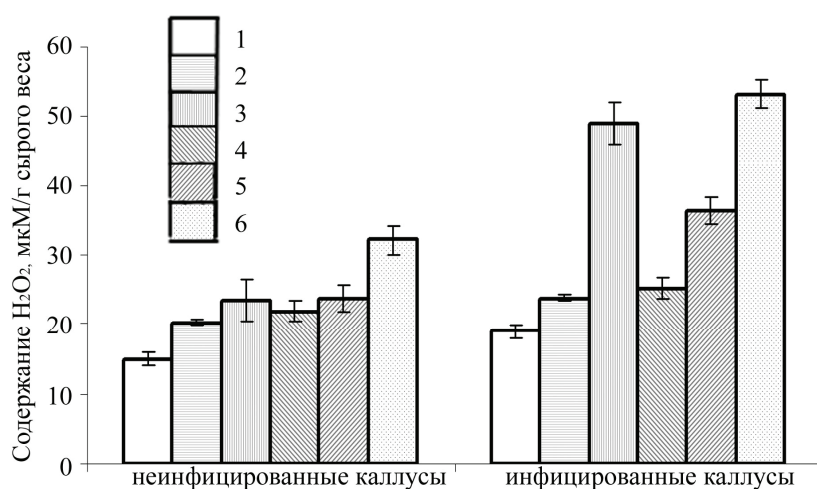


Рис. 2. Содержание H_2O_2 (мкМ/г сырого веса) в каллусах пшеницы при культивировании в присутствии фитогормонов и при инфицировании возбудителем

твердой головни (12 сут после инфицирования). Сорт Жница: 1- контроль, 2- ИУК, 3 – кинетин, 4 – АБК, 5 – сорт Заря, 6 - *T. timopheevii*.

Наблюдаемые изменения в уровне перекиси водорода могли быть связаны с активностью ферментов, локализованных в клеточной стенке, в том числе оксалатоксидазы. Контрольные каллусы устойчивых форм характеризовались более высокой активностью оксалатоксидазы в ионно-связанной с клеточной стенкой фракции фермента по сравнению с каллусами восприимчивой пшеницы (табл. 1).

Таблица 1.

Влияние фитогормонов на активность оксалатоксидазы в ионно-связанной фракции (ед/г сырой массы) в каллусах пшеницы при инфицировании возбудителем твердой головни *T. caries* (12 сут после инфицирования)

1. Варианты	2. Контроль	3. Инфицирование
4. сорт Жница		
5. контроль	6. 0.98±0.06	7. 0.63±0.04
8. ИУК	9. 0.79±0.04	10. 0.58±0.03
11. Кинетин	12. 1.32±0.08	13. 1.21±0.07
14. АБК	15. 1.14±0.05	16. 0.93±0.05
17. сорт Заря		
18. контроль	19. 1.09±0.05	20. 1.64±0.09
21. <i>T. timopheevii</i>		
22. контроль	23. 1.36±0.09	24. 2.34±1.8

Любопытно, что при инфицировании в каллусах восприимчивой пшеницы наблюдалось снижение активности оксалатоксидазы в области клеточной стенки, в то время как, в каллусах устойчивых формах этот показатель значительно возрастал (табл. 1). Введение АБК и кинетина в среду культивирования каллусов восприимчивой пшеницы сорта Жница приводило к индукции активности оксалатоксидазы (табл. 1). Так, в каллусах пшеницы под воздействием кинетина активность оксалатоксидазы повышалась в 2 раза относительно контроля. Стимулирующий эффект АБК на активность оксалатоксидазы был ниже (табл. 1).

Выводы

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют, что введение в среду культивирования каллусов пшеницы АБК и кинетина инициировало в них образование плотных непоражаемых грибом участков, введение ИУК – к разрыхлению каллусов и увеличивало число ризоидов. Появление плотных участков, усиление ризогенеза под влиянием гормонов было сопряжено с повышением уровня перекиси водорода в каллусах. Можно предположить, что метаболические пути, приводящие к накоплению этого соединения, различаются. Так, если в случае с АБК и кинетина повышение концентрации перекиси водорода было обусловлено индукцией активности оксалатоксидазы в области клеточной стенки, то при воздействии ИУК более высокий уровень H_2O_2 , вероятно, связан с ингибированием под ее воздействием пероксидазы. В первом случае, это способствовало повышению устойчивости каллусов пшеницы к возбудителю твердой головни, а во втором, приводило к снижению их защитных свойств. Полученные на совместной культуре результаты дают основание считать, что фитогормоны участвуют в формировании устойчивости растительных клеток к возбудителю твердой головни за счет регулирующего воздействия на активность ферментов про/антиоксидантной системы.

Литература

1. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. // Plant Cell Rep. -2003. - vol. 21. - P. 829-837.
2. Berna A., Bernier F. Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein // Plant Mol. Biol. – 1997. - vol. 33. - P. 417–429.
3. Guan L., Scandalios J.C. Developmentally related responses of maize catalase gene to salicylic acid // Proc Natl. Acad. Sci. USA. -1995. - vol. 92. - P. 5930-5954.
3. Dong X. Finding the missing pieces in the puzzle of plant disease resistance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1998. - vol. - 92. - P. 7137- 7186.

Резюме

На совместных культурах каллусов пшеницы *Triticum aestivum* L. и *T. timopheevii* с возбудителем твердой головни *Tilletia caries* Tul. исследовано влияние фитогормонов на содержание перекиси водорода, активность оксалатоксидазы и устойчивость клеток к инфицированию. Обнаружено, что АБК и кинетин подавляли развитие патогена, повышали активность оксалатоксидазы и уровень перекиси водорода в каллусах.

The influence of phytohormones on resistance of wheat (*Triticum aestivum* L, *T. timopheevii*) calluses to bunt agent *Tilletia caries* Tul. was studied. It revealed that ABA and kinetin on calluses induced of oxalateoxidase activity, increased of hydrogen peroxide level, decreased of fungi teliospores germination, induced occurrence of not infected with pathogen dense sites.

БИОТЕХНОЛОГІЇ У МЕДИЦИНІ ТА СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ

БЕЛОКУРОВА В.Б., КИЩЕНКО Е.М., ЛИСТВАН Е.В., КУЧУК Н.В.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, Киев-143, ул. Акад. Заболотного, 148, E-mail: iicb@iicb.kiev.ua

КУЛЬТУРА *IN VITRO* И ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ КОРНЕЙ *PSORALEA DRUPACEA* BUNGE (LEGUMINOSAE)

Фармакологически активные соединения составляют значительную часть вторичных метаболитов растений. Список лекарственных растений, которые находятся под угрозой исчезновения, по разным оценкам насчитывает от 4 тысяч до 10 тысяч видов. В связи с этим всё более важной становится роль исследований, связанных с использованием методов биотехнологии для возобновляемого культивирования таких видов и получения фармакологических соединений на основе культур *in vitro*. *Psoralea drupacea* Bunge (Leguminosae) является представителем лекарственных растений флоры Средней Азии и Казахстана, продуцентом ряда биологически активных соединений - бакучиола, псоралена и изопсоралена, друпацина [1, 2]. Активные соединения *P.drupacea* синтезируются также другими видами рода *Psoralea*, в частности, *P.corylifolia* [3]. В настоящее время ведётся разработка биотехнологических методов получения ценных вторичных метаболитов ряда видов *Psoralea* [4-9], среди которых нет, однако, *P.drupacea*. Целью нашей работы было создание различных типов асептических культур *P.drupacea*, в том числе трансгенных, для изучения возможности их использования для получения фармакологически активных соединений.

Материалы и методы

Инициация и поддержание различных типов асептических культур *P.drupacea*. В работе использовали семена *P.drupacea* из банка зародышевой плазмы растений мировой флоры, созданного в ИКБГИ НАНУ. Поверхностную стерилизацию семян для введения в культуру *in vitro* проводили согласно ранее описанному методу [10]. Семена предварительно инкубировали в концентрированной серной кислоте в течение 30 мин. После тщательной отмывки в стерильной дистиллированной воде семена переносили на безгормональную среду Мурасиге-Скуга с вдвое уменьшенным содержанием макросолей и сахарозы (среда MS/2) и культивировали при 25°C и 16-часовом фотопериоде. Сформировавшиеся проростки культивировали на безгормональных средах с различными комбинациями минеральных компонентов (MS, MS/2, среда Гамборга B₅, среда Шенка-Хильдебрандта SH). Субкультивирование проводили путём переноса частей междоузлий, содержащих верхушечные или пазушные почки, на свежую среду. Интервал субкультивирования составлял 2-3 месяца. Для увеличения коэффициента размножения растений *in vitro* использовали цитокинины (БАП, кинетин) в различных концентрациях. Четыре прописи питательных сред с различными комбинациями регуляторов роста [10] сравнивали в отношении их эффективности для индукции и культивирования каллусных линий.

Генетическая трансформация с помощью *Agrobacterium rhizogenes* и получение культуры трансгенных корней. В исследованиях по генетической трансформации *P.drupacea* использовали агропиновый штамм *Agrobacterium rhizogenes* A4. Бактериальные культуры выращивали в жидкой среде LB на шейкере при 150 rpm при температуре 28°C в темноте в течение суток. Бактериальную суспензию центрифугировали при 6000 g в течение 10 мин, ресуспендировали в жидкой среде MS с вдвое уменьшенной концентрацией солей и далее использовали в экспериментах по кокультивированию с эксплантами *P.drupacea* (листья и междоузлия асептически культивируемых растений через 1-1,5 месяца после их субкультивирования на свежую среду). Экспланты нарезали на фрагменты величиной около 1 см, помещали в бактериальную суспензию на 20 мин и далее выдерживали на агаризованной безгормональной среде MS при 22°C в течение 48 часов в темноте. После этого

экспланты отмывали в стерильной дистиллированной воде, подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили на агаризованную среду MS, содержащую 500 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий. Культивировали при 26°C и 16-часовом фотопериоде до формирования корней. В качестве контроля использовали листовые экспланты *P. drupacea*, которые культивировали на безгормональной среде MS в тех же условиях. Индуцированные корневые культуры выращивали с интервалом субкультивирования 2 недели, постепенно снижая концентрацию цефотаксима в питательной среде.

ПЦР-анализ культур индуцированных корней. Геномную ДНК выделяли согласно [11]. ПЦР проводили в амплификаторе Mastercycler® personal (Eppendorf). Реакционная смесь, суммарный объём которой составлял 20 мкл на пробу, содержала 50 нг ДНК, солевой буфер (10 mM трис-HCl, pH 9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% Тритон X-100), по 200 мкМ каждого из праймеров, по 200 мкМ дезоксинуклеотидтрифосфатов и 1 единицу Taq ДНК-полимеразы (Fermentas). Реакцию начинали с денатурации при 94°C (3 мин); далее следовало 34 цикла: денатурация - при 94°C (30 с), отжиг - при 65°C (30 с) и синтез – при 72°C (45 с); а затем синтез при 72°C (3 мин). Для идентификации гена *rolB* использовали праймеры 5'ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCTTCCACGA3' и 5'TTAGGCTTCTTTCTTCAGGTTTACTGCAGC3'. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия в трис-боратной буферной системе.

Результаты и обсуждение

Индукция и поддержание асептических культур *P. drupacea*. Семена растений рода *Psoralea* покрыты жёсткой защитной оболочкой. В ряде публикаций отмечены трудности их проращивания [10], что является препятствием успешного введения этих видов в асептическую культуру. Для индукции прорастания семян *P. drupacea* применяли обработку концентрированной серной кислотой. Используемые в экспериментах семена, прошедшие такую обработку, проросли и сформировали проростки в течение 3-4 недель (Рис. 1. А). Эффективность прорастания составила 95%. Необработанные семена не проросли в течение этого времени; позже стратифицировать их также удалось с помощью серной кислоты.

Полученные проростки культивировали на безгормональных средах разного состава при 25°C и 16-часовом фотопериоде (Рис. 1, Б). Оказалось, что способность к укоренению и темпы роста побегов *P. drupacea* в определённой степени зависели от минерального состава культуральных сред (MS, MS/2, B₅, SH). Оптимальными оказались среды SH и MS/2, тем не менее, частота укоренения побегов на них также была невысокой. Использование цитокининов в составе питательной среды позволило значительно повысить коэффициент размножения растений *P. drupacea* путём индукции множественных побегов. Добавление БАП в концентрации 0,2 мг/л стимулировало развитие побегов из пазушных почек, а дальнейшее повышение концентрации БАП до 1 мг/л существенно не увеличивало число формирующихся побегов, но значительно тормозило их рост (Рис. 1, В).

Каллусные культуры *P. drupacea* были индуцированы из эксплантов листьев с применением всех четырёх прописей культуральных сред, которые используются нами для поддержания коллекции клеточных культур растений различных таксономических групп. В то же время на средах разного состава морфология и темпы роста каллуса значительно различались. Формирование рыхлого каллуса интенсивно-зелёного цвета и максимальные темпы роста (удвоение биомассы в течение 10-14 дней) наблюдались на среде К (1 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л БАП).

Agrobacterium-опосредованная генетическая трансформация и получение культуры трансгенных корней. Генетическая трансформация эксплантов растений с использованием *A. rhizogenes* индуцирует формирование культур трансгенных корней, которые рассматриваются как эффективная биологическая система получения

вторичных метаболитов. Целью нашей работы было разработать эффективный и воспроизводимый метод генетической трансформации *P.drupacea* с помощью *A.rhizogenes*. Генетическую трансформацию проводили с использованием модифицированного метода листовых дисков так, как описано выше. Формирование корней начиналось на эксплантах листьев в течение 3-5 недель после агробактериальной инфекции (Рис. 1, Г). В контрольных эксплантах корни не формировались. Не удалось индуцировать трансгенные корни в эксплантах междоузлий, что подчёркивает значение правильного выбора экспланта для успеха эксперимента. В каждом листовом экспланте после кокультивирования формировалось до 10 центров индукции корней. Корни, сформировавшиеся в разных частях одного и того же экспланта, культивировали как индивидуальные клоны. Темпы роста и характер латерального ветвления индуцированных корневых культур были различными. Некоторые из них в течение 1-2 недель прекращали рост и погибали, в то время как другие росли быстро. Большинство индуцированных клонов формировали каллус на частях корней, находящихся непосредственно в толще питательной среды, в отличие от воздушных ответвлений корней (Рис. 1, Д). Снижение вдвое концентрации макрокомпонентов и сахарозы в питательной среде позволяло уменьшить интенсивность каллусообразования корнями.

В целом получен 21 клон быстро растущих культур корней *P.drupacea*. Формирование и рост корневых культур на безгормональной среде (в отличие от контрольных экспериментов) и отсутствие у них геотропизма являются косвенными доказательствами их трансгенной природы. Кроме того, наличие гена *rolB* в ДНК индуцированных корней было подтверждено с помощью ПЦР-анализа (Рис. 1,Е).

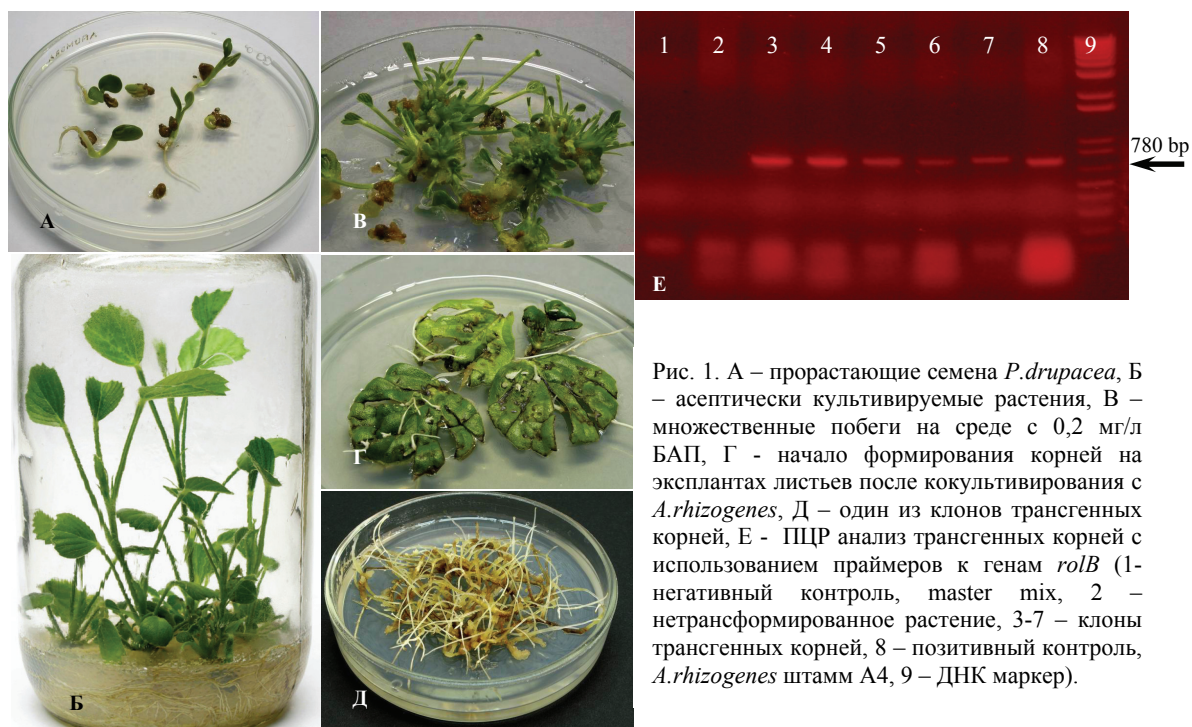


Рис. 1. А – прорастающие семена *P.drupacea*, Б – асептически культивируемые растения, В – множественные побеги на среде с 0,2 мг/л БАП, Г - начало формирования корней на эксплантах листьев после кокультивирования с *A.rhizogenes*, Д – один из клонов трансгенных корней, Е - ПЦР анализ трансгенных корней с использованием праймеров к генам *rolB* (1- негативный контроль, master mix, 2 – нетрансформированное растение, 3-7 – клоны трансгенных корней, 8 – позитивный контроль, *A.rhizogenes* штамм А4, 9 – ДНК маркер).

Выводы

Основные трудности работы с *P.drupacea* в культуре *in vitro* возникают на стадии прорастивания семян и при укоренении размножаемых побегов. Обработка семян серной кислотой является эффективным способом стратификации, а подбор оптимального минерального состава среды и концентрации сахарозы дают возможность повысить число укоренённых побегов. Модифицированный метод

листовых дисков может с успехом применяться для индукции культур трансгенных корней *P. drupacea*.

Работа выполнялась в рамках проекта "Створення та застосування клітинних культур-продуцентів для отримання антимікробних та антигрибкових речовин рослинного походження" в рамках комплексної програми НАН України "Новітні медико-біологічні проблеми та навколишнє середовище людини".

Література

1. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. За ред. А.М. Гродзинського. – Київ, Головна редакція Української Радянської Енциклопедії. - 1990.

2. Смирнов В.В. Эколого-таксономические и биотехнологические аспекты исследования бактерий и высших растений – продуцентов биологически активных веществ. // Микробиологічний журнал – 1998. – vol. 60, № 5. - с. 3–18.

3. Mar W, Je KH, Seo EK Cytotoxic constituents of *Psoralea corylifolia*. // Arch Pharm Res. – 2001. – v. 24, № 3. – p. 211-213.

4. Nguyen C., Bourgaud F., Forlot P., Guckert A. Establishment of hairy root cultures of *Psoralea* species. // Plant Cell Reports. – 1992. – v.11. – p. 424-427.

5. Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. *Psoralea* species: in vitro culture and production of furanocoumarins and other secondary metabolites // In: Bajaj Y.P.S. (Ed.) "Biotech. in agriculture and forestry". Medicinal and aromatic plants". – 1995. – v. 33. - p. 388-411.

6. Bouque V., Bourgaud F., Nguyen C., Guckert A. Production of daidzein by callus cultures of *Psoralea* species and comparison with plants. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1998. – v. 53, № 1. – p. 35-40.

7. Rout G.R., Das P. Studies of *in vitro* somatic embryogenesis of *Psoralea corylifolia* L. – an endangered medicinal plant // Gartenbauwissenschaft. – 2001. – v.4. – p. 202-206.

8. Sahrawat A.K., Chand S. Continuous somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl segments of *Psoralea corylifolia* Linn., an endangered and medicinally important Fabaceae plant // Current Science. – 2001. - v. 1. – p. 1328-1331.

9. Abhyankar G., Reddy V.D., Giri C.C., Rao K.V., Lakshmi V.V.S., Prabhakar S., Vairamani M., Thippeswamy B.S., Bhattacharya P.S. Amplified fragment length polymorphism and metabolomic profiles of hairy roots of *Psoralea corylifolia* L. // Phytochemistry. – 2005. – v. 66, № 20. – p. 2441-2457.

10. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сукура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Н.В.Кучук "Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры" // Цитология и генетика. – 2005. – v. 14. – p. 41-51.

11. Cheung, W.Y., Hubert, N. and Landry, B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analysis. // PCR Meths. Applics. – 1993. – v. 3. – p. 69-70.

Резюме

Для фармакологічно цінного виду рослин *Psoralea drupacea* Bunge (Leguminosae) розроблені методи введення в культуру *in vitro*, вирощування асептичних рослин та їх клонального розмноження, індукції калусних культур. Методом генетичної трансформації з допомогою *A.rhizogenes* індукуються клони трансгенних коренів. Отримані культури вивчаються як можливе джерело біологічно активних сполук.

Для фармакологічно цінного виду рослин *Psoralea drupacea* Bunge (Leguminosae) розроблено методи введення в культуру *in vitro*, вирощування асептичних рослин та їх клонального розмноження, індукції калусних культур. Методом генетичної трансформації за допомогою *A.rhizogenes* індукуються клони трансгенних коренів. Отримані культури вивчаються як можливе джерело біологічно активних сполук.

Methods of introduction into aseptic culture, *in vitro* cultivation and clonal propagation of shoots and methods of callus culture have been elaborated for medicinal plant species

Psoralea drupacea Bunge (Leguminosae). Hairy roots have been induced in leaf explants using *A.rhizogenes*-mediated genetic transformation. All these types of aseptic cultures are studied as a possible source of biologically active compounds.

БЕРДИЧЕВЕЦ И.Н., ГОРДУКОВА М.А., ШИМШИЛАШВИЛИ Х.Р., СИНДАРОВСКАЯ Я.Р.¹, ШЕЛУДЬКО Ю.В.¹, ФАДЕЕВ В.С., ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.

*Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Россия, 119991, Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: i_berdichevets@hotmail.ru;*

*¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: sindarovskaya@ukr.net*

ДИЗАЙН СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ И УСЛОВИЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ОТБОРА И АНАЛИЗА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Важным этапом в процессе создания трансгенных растений является эффективный отбор первичных трансформантов, содержащих в геноме вставку целевого гена, а также последующий анализ наследования трансгена в ряду поколений. Простым и экономичным методом для этого является полимеразная цепная реакция. Однако для того, чтобы проанализировать трансформанты необходимо решить ряд задач и провести несколько полимеразных цепных реакций, условия для каждой из которых необходимо подбирать индивидуально, что в конечном итоге занимает достаточно много времени. В связи с этим оптимизация условий ПЦР для эффективного отбора и анализа трансгенных растений является актуальной задачей.

Известно, что встройка трансгена в геном растения-реципиента довольно редкое событие. Поэтому для трансформации используются вектора с маркерными генами, экспрессия которых обеспечивает толерантность трансформантов к селективному давлению. Присутствие селективного агента в среде культивирования повышает эффективность отбора предположительных трансформантов и значительно сокращает объем работы. Наибольшее распространение получили маркерные гены, обеспечивающие устойчивость к таким селективным агентам как антибиотики или гербициды, например *nptII* ген, обеспечивающий резистентность к антибиотику канамицину, или ген *bar*, обеспечивающий устойчивость к фосфинотрицину – действующему началу гербицида с коммерческим названием «Баста». Однако, следует отметить, что для ряда видов растений селекционное давление негативно сказывается на процессах каллусо- и морфогенеза, поэтому зачастую приходится либо использовать меньшие концентрации селективного агента, либо вообще на ранних этапах не использовать селективный агент [1]. Это может приводить к отбору ложных трансформантов, способных расти на селективных средах. ПЦР с праймерами, комплементарными последовательностям селективных генов, позволяет провести анализ растений-регенерантов и исключить ложные трансформанты из эксперимента уже на начальных стадиях их появления.

В настоящее время одним из наиболее часто используемых методов трансформации растений является перенос генов с помощью агробактерий. Известно, что агробактерии способны сохраняться в сосудистой системе растений в течение нескольких поколений. Присутствие агробактерий в растительных образцах также может привести к ложноположительным результатам – могут быть отобраны ложные трансформанты растений. Поэтому для того, чтобы доказать, что амплификация последовательностей исследуемых генов проходит с геномной ДНК, а не с

экспрессионного вектора и/или геномной ДНК агробактерий, необходимо провести амплификацию образцов с праймерами, подобранных либо к хромосомным генам агробактерий, либо к генам, присутствующим в векторной конструкции вне области Т-ДНК.

Известно, что на результат ПЦР может влиять качество препарата ДНК. Поэтому ряд авторов рекомендуют в качестве внутреннего контроля проводить амплификацию генов домашнего хозяйства (house-keeping genes) [2].

В работах по созданию трансгенных растений часто используют репортерные гены. В частности в нашей лаборатории используется технология переноса в растения гибридных генов: в экспрессионном векторе целевой ген имеет транскрипционно-трансляционное слияние с репортерным геном [3]. ПЦР с праймерами к репортерному гену позволяет провести анализ первичных трансформантов и с высокой степенью вероятности предполагать, что отобранные будут содержать и целевые гены. Поскольку известно, что в результате переноса Т-ДНК при агробактериальной трансформации может проходить интеграция не полной последовательности Т-ДНК, весьма важно оценивать не только наличие репортерного или селективного генов, но и последовательности целевого гена.

В связи со всем вышеуказанным целью наших исследований - разработка метода мультиплексной ПЦР, который позволил бы за один цикл амплификации определять в геномной ДНК растений последовательности нескольких генов.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали коллекцию первичных трансформантов табака, арабидопсиса, картофеля, томатов, салата и свеклы.

Выделение ДНК. Образцы геномной ДНК выделяли из листьев с помощью СТАВ метода.

Мультиплексная ПЦР. Праймеры для ПЦР подбирали с помощью программы VectorNTI Suite 9.

Результаты и обсуждение

Для разработки метода мультиплексной ПЦР были выбраны следующие гены: селективный ген, гены домашнего хозяйства исследуемых видов трансгенных растений из коллекции лаборатории, гены вирулентности *Agrobacterium tumefaciens* используемого штамма, репортерный ген, ряд целевых генов и регуляторных элементов. Праймеры к исследуемым последовательностям были подобраны таким образом, чтобы условия их амплификации были сходными, а амплифицированные фрагменты можно было эффективно разделять в агарозном геле (рисунок 1).

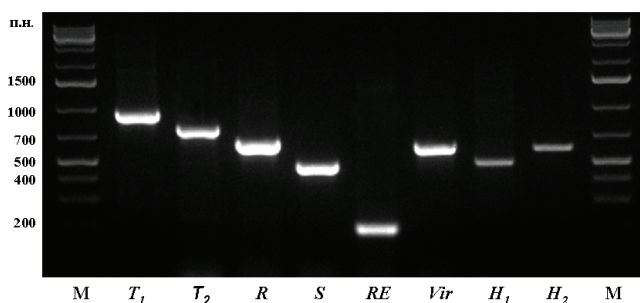


Рисунок 1. Результаты амплификации генов и регуляторных элементов, использованных для разработки метода мультиплексной ПЦР. М – маркер молекулярного веса, T₁, T₂ - целевые гены, R - репортерный ген, S - селективный ген, RE - один из используемых регуляторных элементов, VirE - ген вирулентности *Agrobacterium tumefaciens*, H₁, H₂ - гены домашнего хозяйства.

Проведение ПЦР в достаточно широком диапазоне условий амплификации с

использованием праймеров к выбранным генам позволило нам подобрать одинаковые условия реакции для каждого исследуемого гена, при которых происходит амплификация только целевой последовательности.

Первоначально подобранные условия проведения ПЦР были апробированы с использованием разной комбинации двух пар праймеров к исследуемым генам (рис 2 а). Как видно из полученных результатов в образце геномной ДНК только одной линии трансгенных растений (линия Т1) выявлены последовательности как гена селективного маркера, так и целевого гена. Отметим, что в образце геномной ДНК контрольного растения, амплификаты последовательностей селективного и целевого гена не выявлены. Для того, чтобы показать, что отсутствие последовательности целевого гена в образце геномной ДНК первичного трансформанта линии Т2 не является результатом плохого качества препарата геномной ДНК была проведена мультиплексная ПЦР с использованием трех пар праймеров, в том числе и с праймерами к гену домашнего хозяйства (рис. 2 б). Как видно из представленных данных, в случае линии Т2 амплификация последовательности гена домашнего хозяйства и гена селективного маркера проходит успешно, однако продукт целевого гена отсутствует (рис. 2 б). При этом, с геномной ДНК первичного трансформанта Т1 амплифицируются последовательности всех исследуемых генов. Полученные результаты показывают, что уже на стадии триплексной ПЦР можно эффективно исключать из эксперимента растения, не содержащие вставку целевого гена.

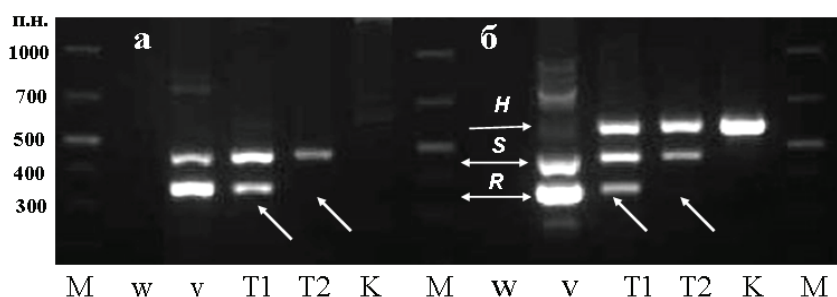


Рисунок 2. Результаты мультиплексной ПЦР геномной ДНК растений табака. Н - ген домашнего хозяйства, S - селективный ген, R - репортерный ген. М – маркер молекулярного веса, w – отрицательный контроль (вместо проб ДНК использован буфер), v – экспрессионный вектор, Т1, Т2 – две независимые линии первичных трансформантов, К – контрольное растение.

Далее, были подобраны оптимальные соотношения каждого из праймеров системы и условия мультиплексной ПЦР, при которых происходит амплификация всех целевых последовательностей с одинаковой эффективностью (рисунок 3).

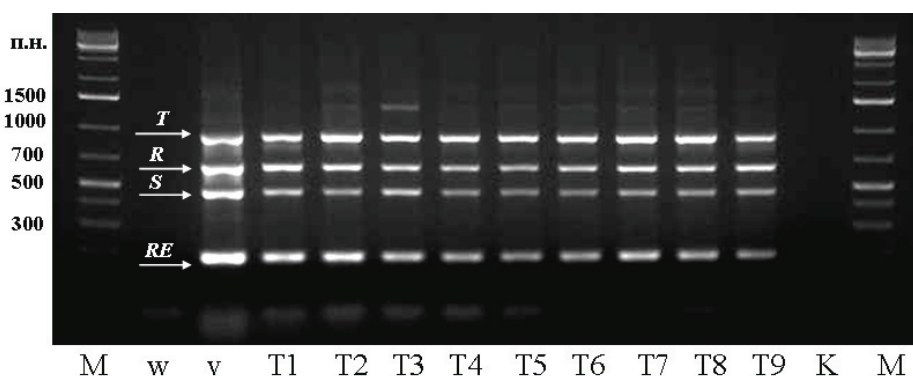


Рисунок 3. Результаты мультиплексной ПЦР геномной ДНК растений картофеля. Т - целевой ген, R - репортерный ген, S - селективный ген, RE - один из исследуемых регуляторных элементов. М – маркер молекулярного веса, w –

отрицательный контроль, v – экспрессионный вектор, T1-T9 – независимые линии первичных трансформантов, K – контрольное растение.

Данный подход успешно апробирован на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на коллекции трансформантов сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат).

Выводы

Таким образом, нами разработан подход, позволяющий за одним раунд ПЦР проводить скрининг первичных трансформантов и выявлять наличие последовательностей целевых генов, селективного гена, репортерного гена, ряда регуляторных элементов, а также оценивать качество препарата, выделенной геномной ДНК, и отсутствие контаминации агробактериями первичных трансформантов растений.

Литература

1. T. Orlikowska. Regeneration of adventitious shoots in process of genetic transformation // In: Altman A, Ziv M, Izhar S (eds). Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century. - 1999 - Kluwer, Dordrecht. – P. 185–188.
2. Mannerlof M., Tenning P. Screening of transgenic plants by multiplex PCR // Plant Mol. Biol. Rep. – 1997. – vol. 15. – P. 38–45.
3. Piruzian E.S., Goldenkova I.V., Mysiychuk K.A., Kobets N.S., Arman I.P., Bobrysheva I.V., Chekhuta I.F., Glazkova D. A reporter system for prokaryotic and eukaryotic cells based on the thermostable lichenase from *Clostridium thermocellum* // Mol. Genet. Genomics. – 2002. – vol. 266. - P. 778-786.

Резюме

Разработана система праймеров, их оптимальные соотношения и условия мультиплексной ПЦР для эффективного отбора и дальнейшего анализа трансгенных растений. Система успешно апробирована на модельных объектах (трансгенные растения табака и арабидопсиса) и на трансформантах сельскохозяйственно-важных культур (картофель, томаты, свекла, салат).

Set of specific primers and multiplex PCR conditions have been developed for effective selection and analysis of transgenic plants. This methodology was approved on collection of model plants (transgenic tobacco and Arabidopsis) and some transgenic crops (potato, tomato, beet and lettuce).

БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПІРІДОНОВА К.В., КУНАХ В.А.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Акад. Заболотного, 150, м. Київ, 03680, Україна, e-mail: kunakh@imbg.org.ua

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ *UNGERNIA VICTORIS*

Унгернія Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko, *Amaryllidaceae*) – ендемічна рослина Таджикистану та Узбекистану, препарати ізохінолінових алкалоїдів та біологічно активних полісахаридів якої застосовують для лікування широкого спектру захворювань м'язової, травної та дихальної систем [1]. Активна експлуатація природних ресурсів цього рідкісного виду створює небезпеку скорочення його чисельності та зменшення генетичного різноманіття. Це зумовлює актуальність розробки шляхів прискореного розмноження та збереження генофонду виду. На сьогодні розроблено умови мікроклонального розмноження *U. victoris* як шляхом прямої регенерації із фрагментів лусок цибулин, так і шляхом індукції регенерації із

калюсних тканин, що тривалий час вирощували *in vitro*. Підбрано умови мультиплікації та вирощування *in vitro* отриманих мікроцибулин-регенерантів. Розрахунково розроблений спосіб мікроклонального розмноження дозволяє отримати за 1 рік до 1 млн. мікроцибулин й інтенсифікувати їх розвиток: за 1,5-2 роки вирощування *in vitro* цибулини досягають стадії розвитку 5-7 річних рослин у природі [2].

З огляду на явище соматклональної мінливості в культурі рослинних тканин [3], з метою перевірки можливості застосування розроблених методик для збереження генофонду виду було проведено оцінку генетичної ідентичності рослин, отриманих шляхом прямої та непрямой регенерації. Дослідження проводили з використанням RAPD-аналізу.

Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження були рослина *U. victoris* та чотири регенеранти, одержані від неї шляхом прямої регенерації із фрагментів лусок цибулини, а також група калюсних ліній *U. victoris*, отриманих від однієї рослини на різних живильних середовищах віком близько 9 років (№ 2, № 3, № 5, № 6, № 7, № 9а) (див. схему отримання ліній у склад живильних середовищ в [2,4]) і чотири цибулинки, що були отримані шляхом непрямой регенерації від лінії № 3 після 6-7 років культивування. Всі рослини-регенеранти були отримані на середовищі 5С3Н, після отримання їх вирощували в культурі *in vitro* ще протягом близько двох років.

Виділення ДНК та полімеразну ланцюгову реакцію з довільними праймерами (RAPD-ПЛР) проводили за описаними раніше методиками [5]. В аналізі враховували чітко розрізнявані, відтворювані в трьох дослідах амплікони. Для кількісної оцінки RAPD-поліморфізму дані представляли у вигляді бінарної матриці, у якій наявність або відсутність, а також значні відмінності за інтенсивністю (більш, ніж в 4-5 разів), ампліконів однакового розміру позначали відповідно як стан "1" або "0". На підставі отриманої матриці з використанням комп'ютерної програми POPGENE 1.32 були визначені генетичні відстані за методом Нея [6].

Результати та обговорення

Для оцінки генетичної ідентичності рослинного матеріалу *U. victoris*, отриманого з використанням культури тканин, проводили аналіз двох груп рослин-регенерантів, а саме, отриманих шляхом прямої та непрямой регенерації. У першому випадку оцінювали відмінності між регенерованими рослинами та рослиною-донором експлантів, у другому, де для регенерації використовували тривало-культивовані калюсні лінії, регенеранти порівнювали з лінією, від якої вони походять. Крім того, для більш повної характеристики соматклональної мінливості провели дослідження гетерогенності рослин-регенерантів у кожній з груп, а також тривалокультивованих калюсних ліній спільного походження.

У молекулярно-генетичному аналізі використали 24 десятичленних довільних праймери. Загалом для першої групи об'єктів врахували 244 амплікони, а для другої групи споріднених клітинних ліній та регенерантів, отриманих від однієї із них, було враховано 240 RAPD-фрагментів. Кількість ампліфікованих фрагментів залежно від праймера коливалася від 4 до 17 (у середньому 10 фрагментів на праймер), їхні розміри варіювали в межах 280 – 1990 п.н.

У двох із чотирьох досліджених «прямих» регенерантів при порівнянні з материнською рослиною спостерігали генетичні відмінності, що полягали у значному збільшенні інтенсивності флуоресценції двох фрагментів (0,82 % від загальної кількості ампліконів). RAPD-спектри інших двох регенерантів мали ідентичні спектри з рослиною-донором експлантів.

У групі клітинних ліній варіабельними були 9 ампліконів (3,75 %). Більшість із них (сім фрагментів), мали кількісну мінливість, а саме значні відмінності за

інтенсивністю (рис. 1), решта (два фрагменти), характеризувалися якісною мінливістю – були присутні у RAPD-спектрах окремих калюсних ліній.

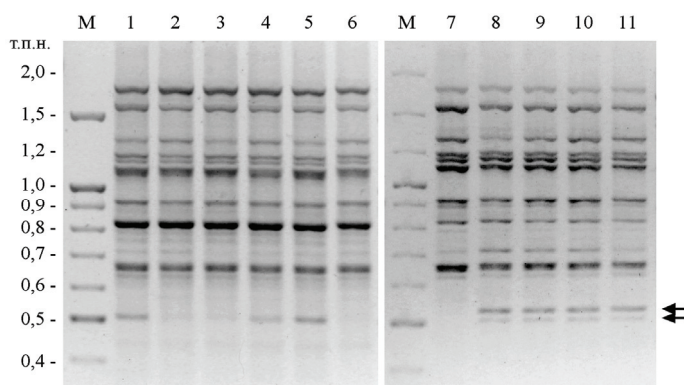


Рис. 1. Генетичний поліморфізм тривалокультивованих калюсних культур та рослин-регенерантів *U. victoris*.

RAPD-профілі, отримані з праймером A11: 1 – 6 – калюсні лінії № 2, № 3, № 5, № 6, № 7 та № 9, відповідно; 7 – лінія № 3; 8 – 11 – регенеранти, отримані від лінії № 3. М – маркер молекулярної маси. Стрілками позначено поліморфні амплікони.

Від вихідної клітинної лінії № 3 групу регенерантів відрізняли 7 ампліконів (2,92 %), з них 4 фрагменти з якісною мінливістю, і 3 – з кількісною (рис. 1). Між рослинами-регенерантами також виявлено відмінності, які полягали в якісному та кількісному поліморфізмі RAPD-профілів за трьома ампліконами (1,25 %). У всіх регенерантів, отриманих з тривало культивованої калюсної культури, відмічено появу амплікону (~530 п.н., праймер A11), який не спостерігали в спектрах досліджених калюсних ліній (рис. 1). Така однотипна зміна спектрів ампліфікації може бути зумовлена як існуванням у геномі *U. victoris* ділянок із підвищеною схильністю до мінливості, так і закономірними змінами в геномі, що, очевидно, відбуваються в процесі диференціювання клітин під час регенерації.

За результатами RAPD-аналізу були розраховані генетичні відстані за Неєм [6]. Відмінності рослин, отриманих шляхом прямої регенерації, від вихідної рослини склали від 0 до 0,82 % (в середньому 0,4 %), відстані між окремими регенерантами становили від 0 до 0,82 % (в середньому 0,5 %). Відмінності рослин, отриманих шляхом непрямой регенерації, від вихідної культури тканин склали від 2,11 до 2,96 % (в середньому 2,53 %), а генетичні дистанції між регенерантами цієї групи – від 0 до 1,26 % (в середньому 0,70 %). Значення генетичних відстаней між калюсними лініями варіювали в діапазоні від 0,84 до 2,96 % (в середньому 1,74 %). Для порівняння слід відмітити, що значення генетичних відстаней за Неєм між рослинами із природної популяції становили від 29,6 до 47 % (в середньому 39,8 %) [5].

Аналіз наведених вище числових даних (рис. 2) свідчить про те, що умови прямої регенерації забезпечують ефективну відтворюваність геному – рослини-регенеранти характеризуються високим ступенем подібності до вихідної рослини. Тривале культивування калюсних тканин призводить до збільшення соматональних відмінностей, які виявляються при порівнянні як окремих калюсних ліній між собою, так і рослин, отриманих шляхом непрямой регенерації, з вихідною культурою тканин. Разом з тим, генетичні відстані між окремими «непрямими» регенерантами виявилися в 2-3 рази нижчими за відмінності від вихідної культури і за міжлінійний поліморфізм. Це дозволяє припустити, що в регенерації беруть участь клітини з найменш зміненим геномом.

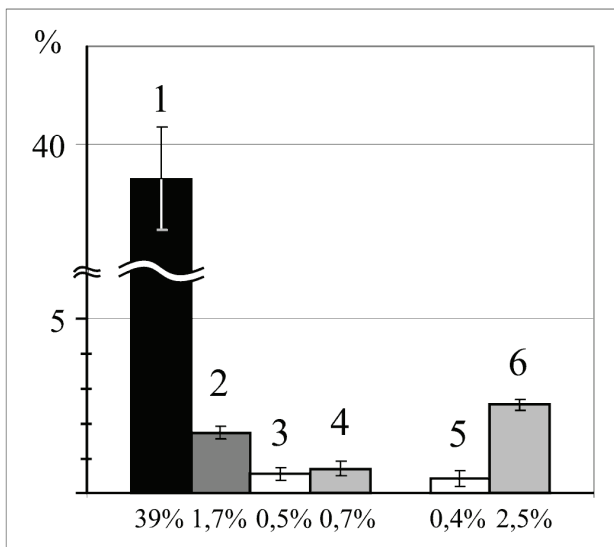


Рис. 2. Рівень внутрішньовидового поліморфізму і соматоклональної мінливості *U. victoris* за даними RAPD-аналізу.

Поліморфізм всередині груп об'єктів: 1 – рослини з природної популяції; 2 – клітинні лінії; 3 – рослини, отримані шляхом прямої регенерації; 4 – рослини, отримані шляхом непрямой регенерації.

Відмінності від вихідного геному: 5 – рослини, отримані шляхом прямої регенерації; 6 – рослини, отримані шляхом непрямой регенерації.

Висновки

Результати дослідження мінливості рослин-регенерантів *U. victoris* свідчать про відносно високу стабільність геному виду за прямої регенерації *in vitro* та регенерації із тривалокультивованих калюсних тканин. Розроблені методики мікроклонального розмноження забезпечують генетичну подібність отриманих рослин до вихідного матеріалу і можуть бути застосовані для прискореного розмноження виду з метою збереження його генофонду. При цьому, у разі необхідності одержання найбільш генетично однорідних рослин, слід надавати перевагу прямій регенерації із тканин експланта. Разом з тим і калюсні тканини, навіть при тривалому культивуванні в підібраних умовах, мають низький рівень генетичної мінливості та зберігають здатність до регенерації, і можуть бути використані для відтворення рослин *U. victoris*.

Література

1. Хамидходжаев С.А. Лекарственные растения рода унгерния в Средней Азии. – Ташкент: «Фан», 1982. – 148 с.
2. Кунах В.А., Можилевська Л.П., Бублик О.М., Колоніна І.В., Музика В.І. Мікроклональне розмноження унгернії Віктора (*Ungernia victoris* Vved. ex Artjushenko) // Біотехнологія. – 2008. – Т. 1, № 4. – С. 57-63.
3. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal Variation - a Novel Source of Variability From Cell Cultures for Plant Improvement // Theor. Appl. Genet. – 1981. – vol. 60, № 4. – P. 197-214.
4. Бублик О. М., Андрєєв І. О., Спірідонова К. В., Можилевська Л. П., 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.
5. Бублик О. М., Андрєєв І. О., Спірідонова К. В., Музика В. І., Колоніна І. В., Кунах В. А. Генетична гетерогенність рідкісного ендемічного виду *Ungernia victoris* (*Amaryllidaceae*): RAPD-аналіз // Укр. бот. журнал. – 2008. – Т. 65, № 3. – С. 445-452.
6. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. – 1978. – vol. 89. – P. 583-590.

Резюме

Проведено перевірку можливості застосування розроблених раніше методик мікроклонального розмноження *U. victoris* для збереження генофонду цієї рідкісної лікарської рослини. Результати RAPD-аналізу свідчать про високу стабільність геному виду за умов прямої регенерації та регенерації із тривалокультивованих калюсних тканин.

Проведена проверка возможности применения разработанных ранее методик микрклонального размножения *U. victoris* для сохранения генофонда этого редкого лекарственного растения. Результаты RAPD-анализа свидетельствуют о высокой стабильности генома вида при прямой регенерации и регенерации из длительно-культивируемых каллусных тканей.

This study tests an opportunity for application of developed earlier *U. victoris* micro-propagation techniques for protection of this rare medicinal plant genetic resources. The RAPD-analysis results suggest the high genetic stability of the species under conditions of direct regeneration and regeneration from long-term cultured callus.

ВОЛЫНКИН В.А., ЗЛЕНКО В.А., ПОЛУЛЯХ А.А., ЛИХОВСКОЙ В.В.

Национальный институт винограда и вина «Магарач» УААН

Украина, 98600, АР Крым, г. Ялта, ул. Курова, 31, e-mail: select_magarach@ukr.net

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛЛОПОЛИПЛОИДИИ И КУЛЬТУРЫ ЗАРОДЫШЕЙ *IN VITRO* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ У ВИНОГРАДА (СЕМЕЙСТВО *VITACEAE*)

Эволюция у представителей родов семейства *Vitaceae* происходила на разных континентах под воздействием специфических биотических и абиотических факторов, влияющих на процесс естественного отбора. Так у дикорастущего винограда Европы *Vitis vinifera ssp. silvestris* Gmel., и у окультуренных сортов, относящихся к *Vitis vinifera ssp. sativa* L., не сформировались признаки устойчивости к филлоксере, возбудителю милдью, поскольку эти патогены впервые появились в Европе только в XIX веке. Они были завезены с американского континента, на котором на протяжении длительного времени проходила их сопряженная эволюция с формами винограда, происходящими также с американского континента.

Сохранение виноградарства в Европе на основе селекции осуществлялось в двух радикальных кардинально отличающихся направлениях: 1) создание филлоксероустойчивых подвоев (привитая культура винограда) и 2) выведение устойчивых с высокой продуктивностью и высоким качеством урожая сортов путем скрещивания американских видов с сортами *V. vinifera*. Однако если виды подрода *Euvtis* легко скрещиваются между собой, то получить гибриды между видом *V. vinifera* (подрод *Euvtis*, 38 хромосом) с видом *V. rotundifolia* Michaux (подрод *Muscadinia*, 40 хромосом) удалось с большим трудом [11]. Фертильности таких гибридных семян удалось достичь лишь только после их полиплоидизации (аллотетраплоидии) [12].

В 1922-1924 гг. Г.Д. Карпеченко экспериментально доказал возможность получения фертильных межродовых гибридов редьки и капусты методом аллоплоидии (аллотетраплоидии) [4,5]. Но получение межродовых гибридов, применяя методы аллополиплоидии и культуры *in vitro* изолированных из семян зародышей, даже у культур растений, роды которых представлены широким спектром полиплоидных рядов, связано с большими трудностями из-за несовместимости различных родов, принадлежащих к одному семейству растений на генетическом (генетически нестабильных) и физиолого-биохимическом уровнях [6,8]. Также генетически нестабильными являются межродовые соматические гибриды, полученные в результате слияния протопластов в культуре *in vitro* [2].

Межродовые гибриды у семейства *Vitaceae* пока не получены. Создание же межродовых гибридов у винограда (хотя бы с частичным присутствием генов различных родов из-за возможной элиминации хромосом одного из них) позволит

получить качественно новые устойчивые к биотическим и абиотическим факторам среды генотипы, урожай которых может иметь новое направление использования, в частности в фармакологической и парфюмерной промышленности.

Материалы и методы

Целью исследований являлось создание гибридов между сортами *V. vinifera* (род *Vitis*, $2n = 38$ хромосом) и видами других родов (*Ampelopsis* и *Parthenocissus*, $2n = 40$ хромосом) семейства *Vitaceae*: *Ampelopsis acutifolia* Lavalee, *Ampelopsis cordata* Michaux, *Ampelopsis serjaniefolia* Regel, *Parthenocissus inserta* Fritch и *Parthenocissus quinquefolia* Planch.

Применялся традиционный путь преодоления генетической несовместимости при межродовой гибридизации (разного количества диплоидного набора хромосом у исходных форм), заключающийся в методе аллополиплоидии – использовании для скрещивания полиплоидных родительских форм. Наличие парных хромосом каждого рода у гибридных семян необходимо для конъюгации между хромосомами в процессе прохождения мейоза и образования гамет, что может обеспечить фертильность гибридных семян [7]. Для достижения этой цели проводились эксперименты параллельно по двум направлениям.

Результаты и обсуждение

Первое направление исследований заключалось в том, чтобы воздействуя раствором колхицина на распускающиеся почки с зачаточными соцветиями последующим методом инцухта получить тетраплоидные семена, а затем и сеянцы у сортов вида *V. vinifera* и у видов родов *Ampelopsis* и *Parthenocissus*. В дальнейшем на 3 – 5 годы, после вступления этих полиплоидных (тетраплоидных) семян в плодоношение, провести между ними межродовую гибридизацию с дальнейшим культивированием изолированных зародышей на ранних стадиях развития и выращиванием из них семян – межродовых гибридов.

С другой стороны, по данным Ш.Г. Топалэ [9] среди сортов *V. vinifera* найден тетраплоидный сорт Шасла Гро Куляр белая и сорта, у которых встречаются полиплоидные клетки при определенных погодных условиях (диплоидно-тетраплоидные цитохимеры): Пикпуль черный, Хартти про Ливье, Баян ширей, Шабаш крупноягодный, Шабаш, Рислинг рейнский, Мускат Александрийский и Яхеи (с женским типом цветка). Для получения полиплоидов путем обработки распускающихся почек колхицином использовались эти сорта – диплоидно-тетраплоидные цитохимеры прогнозируя возможность образования полиплоидных клеток, которые у них будут более жизнеспособные и у этих сортов большая вероятность образования диплоидных гамет в результате мейоза.

Для определения соответствующих сроков и концентраций применения колхицина были проведены в 2006-2008 годах обработки почек в фазе распускания. Для обработки применялись концентрации колхицина в растворе H_2O : 0,12; 0,25, и 0,5 %. Изменения побегов и листьев наблюдались только в варианте обработки 0,5% раствором колхицина. Побеги имели утолщенную форму с короткими междоузлиями. Листья очень сильно отличались от контроля и имели гофрированную форму, с интенсивной темно-зеленой окраской. На два узла выше соцветия наблюдалось разветвление побегов. После разветвления развивались побеги обычной толщины и длины междоузлий, свойственной сорту. Таким образом, полученные побеги до ветвления, в результате обработки раствором колхицина в концентрации 0,5 %, соответствовали по вышеизложенным морфологическим признакам полиплоидным формам. Раздвоенные побеги по морфологическим признакам, по всей вероятности, являлись диплоидными [1].

Для получения полиплоидных семян почки растений родов *Ampelopsis* и *Parthenocissus*, а также инцухта миксоплоидных сортов *V. vinifera* весной на стадии распускания были обработаны 0,5 % раствором колхицина в воде с добавкой 0,5 мг/л

6-бензиламинопурина (БАП). После инцухта соцветий у этих генотипов осенью были получены семена, которые различаются по форме и размерам у каждого генотипа (возможно в результате полиплоидизации). Всего получено семян: *Ampelopsis acotifolia* (1846 шт.), *Ampelopsis cordata* (2245 шт.), *Ampelopsis serjaniefolia* (1723 шт.), *Parthenocissus inserta* (1162 шт.) и *Parthenocissus quinquefolia* (701 шт.); у тетраплоида *Шасла Гро Куляр белая* (313 шт), и у миксоплоидных сортов рода *Vitis* вид *V. vinifera*: Харты про Ливье (1061 шт.), Пикпуль черный (1276 шт.), Шабаш крупноягодный (432 шт.), Шабаш (1244 шт.), Рислинг рейнский (123 шт.) и Мускат Александрийский (70 шт.). Эти семена будут высеяны и среди сеянцев, как по морфологическим признакам, так и методом цитогенетического анализа будут выделены полиплоидные сеянцы. В последующем, через 3 – 5 лет после вступления тетраплоидных сеянцев в пору плодоношения будет проводиться межродовая гибридизация между тетраплоидными сеянцами (род *Vitis* с родами *Ampelopsis* и *Parthenocissus*).

Другое направление наших исследований также с применением методов аллотетраплоидии и культуры *in vitro* незрелых зародышей, выделенных из незрелых семян, направлено на ускорение межродовой гибридизации. Исследовались следующие генотипы винограда: 1) естественный тетраплоидный сорт Шасла Гро Куляр белая (обоеполюй, проводилась кастрация цветков); 2) миксоплоидный сорт Яхеи (женский тип цветка); 3) миксоплоидные сорта Харты про Ливье и Пикпуль черный (обоеполюе, проводилась кастрация цветков). Эти генотипы были обработаны колхицином на стадии распускания почек с находящимися в них зачаточными соцветиями для полиплоидизации яйцеклеток. Соцветия этих сортов – относящихся к роду *Vitis* были опылены пылью видов *Ampelopsis acotifolia* и *Parthenocissus inserta* взятой от соцветий, развившихся на побегах, которые в свою очередь развились из почек, обработанных колхицином на стадии распускания.

Так как в семенах, полученных в результате межродовой гибридизации, наблюдается гибель зародышей из-за физиолого-биохимической несовместимости различных родов, в нашем эксперименте семена собирались на ранних стадиях после оплодотворения. Собранные на 40 день после гибридизации незрелые ягоды хранились в холодильнике в течение 8-12 недель при -2°C . Затем из ягод выделялись семена, которые стерилизовались 10 % «Доместас» в течение 12 – 15 мин., затем 96 % спиртом 10 - 20 сек. и промывались 4 – 5 раза стерильной водой. Семена в чашках Петри в ламинарном боксе разрезались поперек и носики семян (части семян, в которых находились зародыши) были высажены в 3 варианта жидкой среды, различающихся между собой содержанием регуляторов роста: 1) 0,2 мг/л БАП для развития из глобулярных зародышей сердцевидных; 2) 0,1 мг/л β -индолилуксусной кислоты (ИУК) и 30 мг/л гумата Na для превращения сердцевидных зародышей в торпедовидные; 3) 0,2 мг/л гибберелловой кислоты (GA_3) и 0,2 мг/л БАП для развития проростков с зелеными семядолями и гипокотильями из торпедовидных зародышей. Основа жидкой среды состояла из среды для размножения растений [3] 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 [10], 20 мг/л мезоинозита, 0,5 мг/л никотиновой кислоты и 10 г/л сахарозы, но с повышенным содержанием витаминов тиамин и пиридоксин (по 5 мг/л); pH каждого варианта среды перед автоклавированием (1 атм, 25 мин) было доведено NaOH до 5,6.

При разрезании семян перед посадкой на 3 варианта жидких сред были выявлены специфические сорто-биологические особенности. У сорта Яхеи при межродовой гибридизации образуются пустые семена (без зародышей и эндосперма); у сортов Шасла Гро Куляр белая и Харты про Ливье – как пустые семена, так и с эндоспермом, но проростки не развивались, а у сорта Пикпуль черный почти все семена были с эндоспермом, но при этом редко происходило развитие проростков и редко образовывались у них побеги. В результате скрещивания сорта Пикпуль черный с

Ampelopsis acitifolia из 69 частей семян с эндоспермом после 40 дней культивирования на 3-х вариантах жидких сред выросло только 20 проростков (30 %). При этом 17 из них были зелеными, у трех из которых развились побеги (21 %). Три проростка были с белыми семядолями и гипокотильями (15 % альбиносов от всех развившихся проростков). Из 72 частей семян с эндоспермом скрещивания Пикпуль черный с *Parthenocissus inserta* выросло меньше как проростков (2 зеленых и 1 белый проросток), так и побегов из них (1 побег).

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. Следует заключить, что в дальнейшем необходимо собирать и высаживать семена на более ранних этапах их развития (10, 15 и 20 дней после гибридизации). 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 тиамин и 0,2 мг/л пиридоксин), добавкой 30 мг/л гомата 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. 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.

Выводы

Окончательный вывод о том, что полученные растения являются межродовыми гибридами, или оплодотворение произошло в результате случайного попадания пыльцы сортов рода *Vitis*, или произошла частичная или полная элиминация хромосом одного из родов, можно будет сделать после молекулярно-генетического и цитогенетического анализов исходных материнских форм и растений, развившихся из гибридных семян в культуре зародышей *in vitro*.

Литература

1. *Волынкин В.А., Зленко В.А., Лиховской В.В.* Селекция винограда на бессемянность, крупногодность и раннеспелость на полиплоидном уровне// Труды НИВиВ «Магарач». - 2009.- т. XXXIX.- С.5-10
2. *Глеба Ю.Ю., Сытник К.М.* Клеточная инженерия растений. – Киев.- 1984.- 160с.
3. *Зленко В.А.* Диагностика хозяйственноценных признаков и клональное микроразмножение винограда *in vitro*. – Автореф. дис. канд. с.- х. наук, Ялта.- 1991.- 22с.
4. *Карпеченко Г.Д.* Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. x *Brassica oleraceae* L.// Тр. По прикл. ботанике, генетике и селекции.- 1927.- т.17, №3.- С.393-398.
5. *Карпеченко Г.Д.* Теория отдаленной гибридизации. – М.–Л.- 1935.- 64с.
6. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – Київ.- 2005.- 724с.
7. *Лобашев М.Е.* Генетика. – Ленинград.- 1967.- 751с.
8. *Першина Л.А., Шумный В.К.* Проблемы использования методов *in vitro* при отдаленной гибридизации злаков// Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – Москва.- 1991.- С.102 -114.
9. *Топалэ Ш.Г.* Полиплоидия у винограда. Систематика, кариология, цитогенетика. – Кишинев.- 1983.- 215с.
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. *Patel G.I., Olmo H.P.* Cytogenetics of *Vitis*: I. The hybrid *V. vinifera* x *V. rotundifolia*// *Amer. J. Bot.*- 1955. vol. 42.- P. 36-42.

12. Patel G.I., Olmo H.P. Induction of polyploidy in sterile F₁ hybrid of *Vitis vinifera* L. and *Vitis rotundifolia* Michx.// Phyton (B.A.)/- 1956/- vol. 7, № 2.- P.12-15.

Резюме

Используя метод аллополиплоидии и культуры зародышей *in vitro*, у винограда после межродовой гибридизации получены растения, но для установления истинности их межродового происхождения необходимы дополнительные молекулярно-генетический и цитогенетический анализы.

Використовуючи метод аллополіплоїдії і культури зародків *in vitro*, у винограду після міжродової гібридизації отримані рослини, але для встановлення істинності їх міжродового походження необхідні додаткові молекулярно-генетичний і цитогенетичний аналізи.

Plants were achieved from intergeneric hybridization in grapevine by use of the method of allopolyploidy and *in vitro* embryo culture. Nevertheless, their intergeneric origin needs to be confirmed by additional molecular genetic and cytogenetic analyses.

ЗЮЗІОН А.Б., КОВТУН С.І., ЩЕРБАК О.В., ПОРХУН М.Г.

Институт розведення і генетики тварин УААН

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,

e-mail: kovtun_si@gala.net

ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ *IN VITRO* ЯК СПОСІБ ОЦІНКИ ЗАПЛІДНЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ БУГАЇВ

Найпоширенішим методом визначення фертильності самців сільськогосподарських тварин є оцінка запліднювальної здатності сперматозоїдів за результатами штучного осіменіння корів і телиць [1, 2]. Вивчення лише фізіологічних параметрів сперми плідників не забезпечує повноцінної оцінки запліднювальної здатності сперматозоїдів сільськогосподарських тварин. Завершальна оцінка здатності сперматозоїдів до запліднення можлива на підставі результатів штучного осіменіння, що вимагає великих витрат і тривалості в часі [3, 4, 5].

Нині застосовуються сучасні автоматизовані аналізатори якості сперми сільськогосподарських тварин багатьох фірм, які визначають протягом 1 хв. основні параметри – загальну концентрацію гамет, їх рухливість, концентрацію рухливих сперматозоїдів, концентрацію з прямолінійно-поступальним рухом, середню швидкість сперматозоїдів, розрахунок кратності розбавлення для підготовки доз («Гамета-Агро», www.gameta.ru). Також аналізатори автоматично розраховують кількість гамет із нормальної морфологією, число нерухомих клітин і ін. («SFA – 500», www.biola.ru, www.labmetod.ru). Рекламуючи автоматизовані аналізатори якості сперми, виробники наголошують на мінімальних вимогах до знань оператора, який працює з ними. Необхідно поєднувати для детального розуміння закономірностей ефективної оцінки запліднювальної здатності сперми плідників загальнобіологічні знання закономірностей ембріонального розвитку тварин і їх відтворювальної здатності [6, 7].

До найбільш поширених методів оцінки якості сперми відносяться візуальна оцінка морфології, рухливості, концентрації і виживання сперматозоїдів, виявлення кількості живих та нежиттєздатних (мертвих, з коливальним рухом) спермій після забарвлення сперми розчином еозина. Недоліком багатьох методів є суб'єктивність при вимірюваннях. У зв'язку з цим виникла необхідність пошуку нових ефективних методів дослідження показників сперми [8, 9].

Для визначення запліднювальної здатності в умовах *in vitro* використовують методи гетерологічного і гомологічного запліднення. При гетерологічному заплідненні використовують оцити золотистого хом'яка [10, 11], що також не дає повної оцінки

запліднювальної здатності гамет бугаїв. Цей тест можна використовувати тільки при оцінці проходження сперматозоїдами процесу капацитації і акросомної реакції. Правильність структури хроматину сперматозоїдів є ознакою, на яку слід звертати увагу при оцінці фертильності плідників. Високий відсоток сперматозоїдів із пошкодженим хроматином негативно впливає на запліднювальну здатність, хоча інші показники можуть знаходитися на високому рівні.

Повнішу оцінку запліднювальної здатності сперматозоїдів дає моделювання процесів взаємодії гамет в умовах *in vitro* при гомологічному заплідненні. Цей метод передбачає використання ооцитів ссавців, які дозріли поза організмом. Таким чином можна встановити не тільки рівень пенетрації сперматозоїдами прозорої оболонки ооцитів, але і рівень формування чоловічого пронуклеусу, запліднення яйцеклітин, розвитку ембріонів до доімплантаційних стадій [12].

Враховуючи перспективність вищесказаного ми оцінили запліднювальну здатність сперматозоїдів бугаїв-плідників за результатами формування ембріонів поза організмом. В дослідженнях використано кріоконсервовані сперматозоїди бугаїв голштинської породи (Трипле 244, Гомер 200, Делец 185). Гамети бугаїв зберігаються у Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин УААН відповідно з 1988, 1992 та 1984 року.

Матеріали і методи

Для одержання ооцит-кумулюсних комплексів на бойні відбирали яєчники від гінекологічно здорових корів та телиць. Видалення комплексів із фолікулів здійснювали шляхом розсічення їх скальпелем. Гамети культивували *in vitro* протягом 24 годин у середовищі для дозрівання – ТС 199 на розчині Ерла (Sigma), яке доповнювали 20 % еструсної сироватки крові корів власного приготування, 0,068 мг/мл канаміцину сульфату, 0,11 мг/мл пірувату натрію і 0,1 мг/мл глутаміну і $3 - 5 \times 10^6$ клітин гранулози на мл, які вилучали із неатретичних фолікулів.

Дозрілі *in vitro* яйцеклітини корів осіменяли кріоконсервованими еякульованими сперматозоїдами бугаїв-плідників. Капацитовані поза організмом сперматозоїди бугаїв та ооцити корів спільно інкубували в середовищі TALP-IVF з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну (Sigma), 10 мкМ гіпотаурину (Sigma) та 1 мкМ епінефрину (Sigma) протягом 18 год. з концентрацією рухливих сперматозоїдів $1,5 - 2,0 \times 10^6$ сперматозоїдів/мл та температурі 38,5°C і 5 % CO₂ в атмосфері повітря і pH 7,8. Ембріони великої рогатої худоби культивували в середовищі 199 на розчині Ерла з 10 % фетальної сироватки теляти.

Рівень дозрівання ооцитів *in vitro*, запліднення та аналіз стану хроматину ядер ембріонів виявляли шляхом оцінки сухоповітряних препаратів, які готували за допомогою модифікованого методу А. Тарковського (Tarkowski A.K., 1966). Препарати фарбували з використанням 2%-го розчину барвника Гімза і аналізували їх під світловим мікроскопом Carl Zeiss із фотовиводом «Axiostar Plus».

Результати та обговорення

Вивчено вплив тривалості зберігання кріоконсервованих у рідкому азоті сперматозоїдів бугаїв-плідників на їх запліднювальну здатність в умовах *in vitro*. За результатами морфологічного аналізу встановлено, що рівень формування ембріонів із використанням для осіменіння яйцеклітин корів поза організмом еякульованих гамет трьох плідників є досить високим і цей рівень для бугая Гомер 200 перевищував 50 % (табл. 1). Встановлено, що найнижчу запліднювальну здатність проявили сперматозоїди бугая Трипле 244 і показник дроблення ембріонів *in vitro* був суттєво нижчим, порівняно із гаметами бугая Гомер 200.

Таблиця 1

Рівень формування *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби

Гамети бугая-плідника	Кількість осіменених ооцитів, шт.	Рівень дроблення ембріонів <i>in vitro</i> , n (%)
-----------------------	-----------------------------------	--

Трипле 244	59	19 ^a (32,2 ± 6,08)
Гомер 200	49	26 ^b (53,1 ± 7,13)
Делец 185	74	32 ^a (43,2 ± 5,76)

a:b – $p < 0,05$, критерій χ^2 . Різні суперскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

Результати морфологічного аналізу з одержання ембріонів *in vitro* з метою перевірки запліднювальної здатності сперматозоїдів бугаїв необхідно доповнювати цитогенетичним аналізом яйцеклітин, з яких не відбулося формування зародків. Тобто після 24 годин культивування передбачуваних зигот поза організмом певний відсоток запліднених яйцеклітин не долає блоку дроблення для переходу до розвитку ембріонів. Але показник формування у запліднених яйцеклітинах пронуклеусів підвищує достовірність оцінки запліднювальної здатності гамет самця.

Нами встановлено на основі цитогенетичного аналізу нероздроблених яйцеклітин, що суттєво вищу запліднювальну здатність проявляють сперматозоїди бугая Гомер 200, порівняно із плідником Трипле 244 (табл. 2). З використанням гамет бугая Делец 185 виявлено дещо знижений відсоток заплідненості яйцеклітин (68,3 %) хоча суттєвої різниці не виявлено, порівняно із Гомером 200, але цей показник суттєво перевищував бугая Трипле 244 ($p < 0,01$).

Таблиця 2

Цитогенетичний аналіз рівня запліднювальної здатності сперматозоїдів плідників

Гамети бугая-плідника	Кількість проаналізованих ооцитів, шт.	Рівень дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> , n (%)	Рівень запліднення ооцитів <i>in vitro</i> , n (%)
Трипле 244	59	47 ^a (79,7 ± 5,24)	23 ^b (39,0 ± 6,35)
Гомер 200	38	35 ^a (92,1 ± 4,38)	27 ^c (71,1 ± 7,35)
Делец 185	41	39 ^a (95,1 ± 3,37)	28 ^c (68,3 ± 7,27)

b:c – $p < 0,01$, критерій χ^2 .

Умови дозрівання ооцитів корів поза організмом підібрані нами так, щоб забезпечити відсутність різниці у рівні досягнення ними стадії метафази II мейозу. Це дозволяє вірогідно оцінити рівень запліднювальної здатності сперматозоїдів плідників за результатами формування ембріонів *in vitro*.

Висновки

Таким чином, одержання та культивування *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби можна успішно застосовувати для перевірки запліднювальної здатності сперматозоїдів плідників. За рівнем заплідненості ооцитів корів поза організмом, розвитком зародків необхідно перевіряти якість гамет бугаїв-плідників, сперма яких зберігається тривалий час у замороженому вигляді.

Література

1. Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных / [Ожин В.Ф., Родин И.И., Румянцев Н.В. и др.]. – М. : – 1961. – С. 5–24.
2. *Наук В. А.* Длительное сохранение спермы животных в глубокомороженном состоянии / В. А. Наук, Н. Н. Ротт // Сперматогенез и его регуляция. – М. : Наука, 1983. – С. 161–193.
3. *Ефименко М. Я.* Оценка фертильности быков методом оплодотворения *in vitro* / М. Я. Ефименко, С. И. Ковтун, Н. Я. Мелешко [и др.] // Научное наследие П.Н. Кулешова и современное развитие зоотехнической науки и практики животноводства : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф. – М., 2006. – С. 152–155.
4. *Зубець М. В.* Сучасний стан та перспективи генетично – селекційного і біотехнологічного моніторингу в тваринництві України / М. В. Зубець, В. П. Буркат,

- М. Я. Єфіменко [та ін.] // Вісн. Сумського нац. аграр. ун-ту. – 2002. – Вип. 6. – С. 3–12.
5. Сураєва Н. М. Оптимальные приемы капацитации спермы быков для оплодотворения яйцеклеток / Н. М. Сураєва, А. З. Кесян, М. И. Прокофьев // Вестник акад. с.-х. наук. – 1993. – № 4. – С. 49–50.
 6. Prather R. S. Nuclear transplanted as a method for cloning embryos / R. S. Prather // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. – 1990. – № 195, 1. – P. 7–12.
 7. Production of chimaeric mice derived from embryonic stem cells with the neomycin phosphotransferase gene introduced by electroporation / T. Tokunaga, T. Furasawa, M. Okazaki [et al.] // J. Reprod. Devel. – 1992. – № 38, 5. – P. 27–32.
 8. Trish B. Modification of the zona – free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility / B. Trish, P. Kent // Gamete Res. – 1989. – № 22, 4. – P. 385–397.
 9. Харенко М. І. Біотехнологія розмноження свиней / М. І. Харенко, М. В. Черненко. – К. : „Ветінформ”, 1996. – 216 с.
 10. Assesment of bull sperm fertilizing ability / H. Rodriguez–Martinez, B. Larsson, B. R. Zhang [et al.] // Reprod. Dom. Anim. – 1996. – № 31. – P. 515–517.
 11. Кузнєцов В.С. Біотехнологія у тваринництві // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть / ред. кол. : В. В. Моргун (гол. ред.) [та ін.]. – К. : Логос, 2001. – Т. 4. – С. 31–57.
 12. Penetration by bull spermatozoa into the zone pellucida of dead bovine oocytes recovered from frozen – thawed ovaries / H. Tatemoto, T. Horiuchi, T. Maeda [et al.] // Theriogenology. – 1994. – № 42. – P. 465–474.

Резюме

Обсуждается эффективность использования метода получения *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота для достоверной оценки оплодотворяющей способности гамет быков-производителей, сперма коротых используется для сохранения генофонда

It is discussed effects of using method production bovine embryo *in vitro* for reliable evaluation of impregnating ability bull spermatozoa, which semen gene poll preservation

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090. Новосибирск, пр. аврентьева, 10

Université Libre de Bruxelles, Bd. du Triomphe, CP242, Bruxelles, 1050, Belgique

e-mail: jsk@ngs.ru

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В связи с антропогенным воздействием возрастает загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами, в число которых входят ртуть, кадмий, свинец, цинк, медь и некоторые другие. Благодаря наличию механизмов устойчивости, действующих на разных уровнях организации, некоторые виды растений способны расти и развиваться без серьезных нарушений физиологических процессов в присутствии довольно высоких концентраций металлов в окружающей среде. В настоящее время идентифицировано свыше 450 видов растений в 34 семействах (0,2 % составляют покрытосемянные растения), способных накапливать такие металлы как цинк, никель, марганец, медь, кобальт, кадмий (Verbruggen, 2009). При этом большинство из них аккумулируют именно никель. В частности, существуют такие гипераккумуляторы

тяжелых металлов как арабидорсис *Arabidopsis halleri* и ярутка *Thlaspi caerulescens*, принадлежащих к родам *Brassicaceae*. *Thlaspi caerulescens* является уникальным видом, поскольку никакому другому виду растений не свойственна устойчивость к кадмию, который является одним из самых токсичных в ряду тяжелых металлов.

Важную роль в детоксикации некоторых тяжелых металлов (особенно меди) играют такие белки как металлотионеины, которые обладают высокой гомологией к аналогичным белкам у животных. Однако есть и существенные различия в расположении остатков цистеина. Установлено, что они имеют низкую молекулярную массу (до 10 кД), высокое содержание цистеина (около 30%), их синтез индуцируется ионами Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Pb. Такие элементы, как Ca, Al, Na, Mg, не индуцируют образования металлотионеинов.

У растений идентифицировано по крайней мере четыре типа МТ, отличающихся по числу и положению доменов, обогащенных цистеином. Данная работа связана с изучением роли МТ третьей группы. Цель работы — детальное исследование роли металлотионеинов (МТ), в частности AtMT3 и TcMT3, обнаруженных у арабидопсиса и ярутки. Поскольку на данный момент не обнаружено растений нокаутов по гену МТ3, то в ходе работы планируется получить и проанализировать генетически модифицированные растения, у которых экспрессия гена, отвечающего за синтез металлотионеинов, снижена.

Материалы и методы

В работе использовали ГМ растения табака *Nicotiana plumbaginifolia*, арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens*

1. Для переноса ДНК использовали вектора *pGiBIN-19*, *pK7GWIWG2D(II)*. Методами Gateway клонирования созданы конструкции, в результате экспрессии которых должно произойти снижение экспрессии гена МТ3 (RNAi стратегия).

2. Методика трансформации корневых и листовых эксплантов арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens*

Среды для получения регенерантов из корневых эксплантов

CIM1: среда MS с добавлением 1 мг/л 2,4-D, 0.5 мг/л кинетина, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара. (Hanikenne, 2008)

CIM2: среда MS с добавлением 0,5 мг/л 2,4-D, 0.05 мг/л кинетина, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара. (Valvekens, 1988)

SIM1: среда MS с добавлением 1,0 мг/л БАП, 0.5 мг/л НУК, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара.

SIM2: среда MS с добавлением 5 мг/л 2-iP, 0.1 мг/л ИУК, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара.

Экспланты за неделю до трансформации помещаются на среды CIM и оставляются в темноте. После трансформации экспланты переносят на среды SIM, содержащие антибиотики, подавляющие рост агробактерии. Антибиотики, являющиеся селективирующими и предназначенные для отбора трансформантов, добавляются через 2-3 недели после трансформации, чтобы уменьшить их отрицательное воздействие на процесс регенерации.

Среды для получения регенерантов из листовых эксплантов

среда MS с добавлением 1 мг/л 2,4-D, 0.05 мг/л БАП, 100 мг/л инозитола. 10 мг/л тиамин гидрохлорида, 1 мг/л никотиновой кислоты, 30 г/л сахарозы, 7 г/л агара. (Vera-Estrella, 2009)

3. Анализ ГМ растений табака, экспрессирующих ген МТ3.

Устойчивость к воздействию тяжелых металлов исследовалась при выращивании в течение двух недель растений в возрасте 2 месяцев в гидропонной культуре на среде Hoegland с добавлением 10μM CdSO₄. Раствор менялся через неделю. Оценка проведена по результатам изменения массы (сухого веса и биомассы).

Оценка скорости накопления кадмия растениями была проведена при использовании ¹⁰⁹Cd.

Результаты

Трансгенные растения табака, несущие ген МТЗ, показали повышенную устойчивость к такому токсическому воздействию, как присутствие ионов кадмия. По сравнению с контрольными растениями, у ГМ растений отмечены более низкая скорость накопления кадмия. Темпы роста также были выше. Последующие эксперименты по исследованию растений, было решено проводить, используя стратегию замолкания целевого гена.

Корневые экспланты арабидопсиса *Arabidopsis halleri* и ярутки *Thlaspi caerulescens* помещали для прекультивирования на неделю на среды СИМ I и СИМ II. После чего экспланты кокультивировали с агробактерией в течение 4-5 дней, а затем переносили на среду СИМ I и СИМ II, соответственно. Для подавления роста агробактерии добавляли натриевую соль тикарциллина, которая, как показали эксперименты, не подавляет процесс регенерации, в отличие от цефотаксима.

Обнаружено, что на среде СИМ I (рис. 1б) процесс каллусообразования и регенерации идет лучше, чем на СИМ II (рис. 1а).

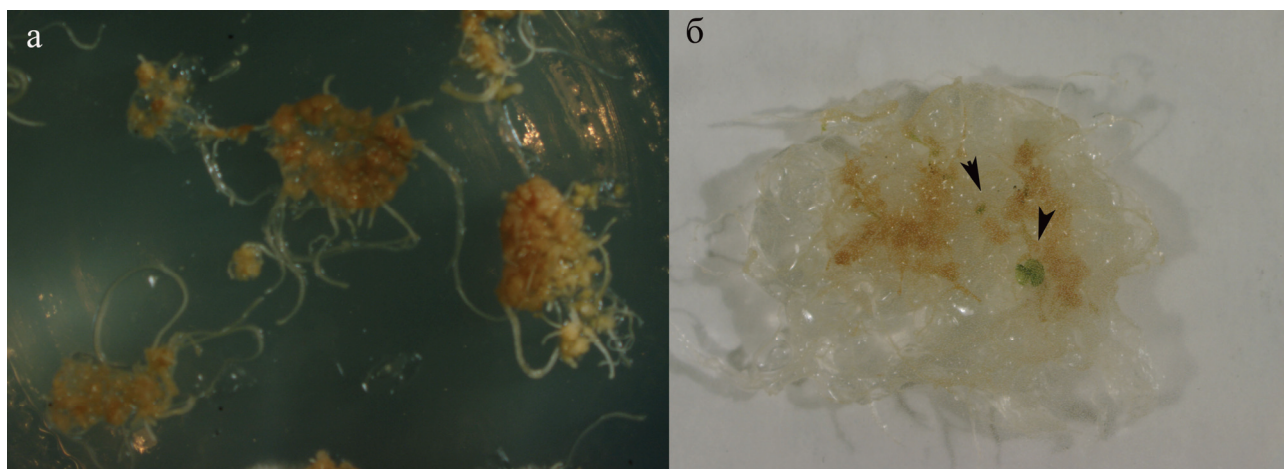


Рис. 1. Каллусообразование и регенерация растений арабидопсиса *A. Halleri*. Стрелками указаны регенеранты.

Также было отмечено, что растения *Thlaspi caerulescens*, произрастающие в различных регионах, имеют разные типы каллусов: растения, выращенные из семян, собранных в регионе Праюн (Франция), формируют более плотный каллус белого цвета, из которого редко формируются растения регенеранты. В то время как экспланты, полученные от растений, произраставших в районе St. Felix (Франция) образуют более рыхлый эмбриогенный каллус зеленого цвета (рис. 2б).

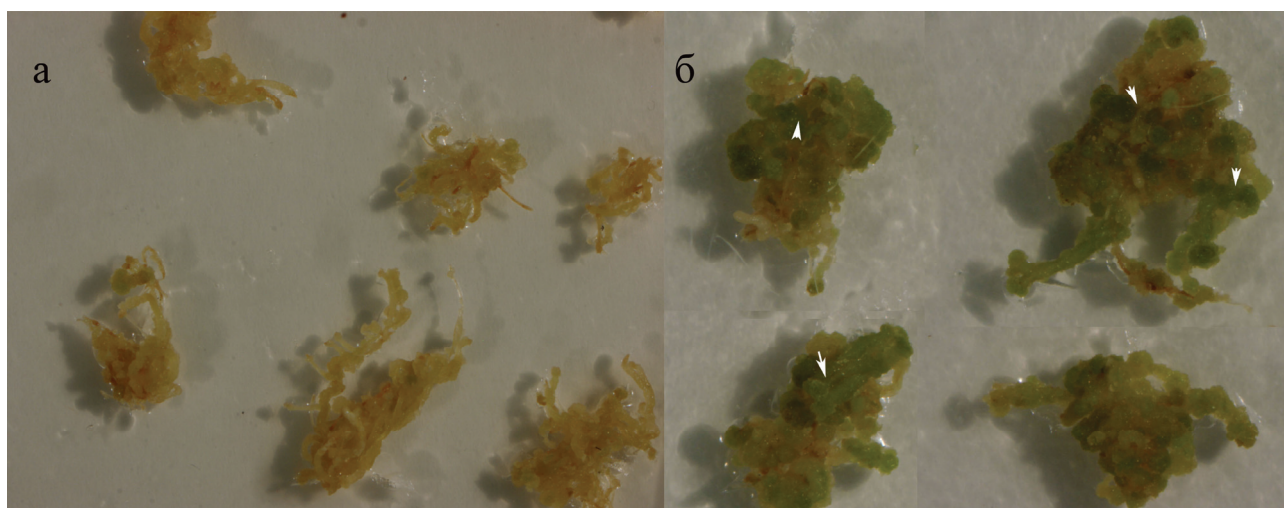


Рис. 2. Каллусообразование и регенерация растений ярутки *Thlaspi caerulescens*,

произрастающих в регионах Prayon (а) и St.Felix (б).

Попытки получить регенеранты из листовых эксплантов были до сих пор неудачны. Большая часть эксплантов гибнет в течение первых двух недель. Каллусы, которые формируются у оставшихся эксплантов, не способны к дальнейшему росту и развитию.

В ближайшее время планируется детальное изучение растений регенерантов, у которых снижена экспрессия целевого гена МТЗ.

ПЕРСПЕКТИВЫ

Изучение процессов, регулирующих концентрации тяжелых металлов у растений, важно не только для понимания фундаментальных явлений, но и для практического применения. Например, увеличив накопление токсичных металлов в наземной части растений, можно очищать почвы. А также можно создавать растения, способные расти на загрязненных почвах.

Литература

1. Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Kroymann J, Weigel D, Krämer U. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4 // Nature. 2008. V. 15. P.391-405
2. Valvekens D, Montagu MV, Lijsebettens MV. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana root explants by using kanamycin selection. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1988. V. 85(15). P. 5536-5540.
3. Vera-Estrella R. , Miranda-Vergara M. C., Barkla B. J.. Zinc tolerance and accumulation in stable cell suspension cultures and in vitro regenerated plants of the emerging model plant *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae) // Planta. 2009. V. 229. P. 977–986
4. Verbruggen N., Hermans C. and Schat H.. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants // *New Phytologist* (2009) V. 181. P.759–776

**КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ТРАЧУК Л.А.,
ЖУЧЕНКО А.А.***

ГНУ ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН,

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д.42, e-mail: recombination@iab.ac.ru

*Российская академия сельскохозяйственных наук,

Россия, 117218, г. Москва, ГСП-7, г. Москва, ул. Кржижановского, дом 15, корпус 2.,

e-mail: plant@pochta.ru

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН *NLS-recA-licBM3*

Рекомбинация – фундаментальный процесс, который наравне с репликацией и репарацией, необходим для метаболизма ДНК у про- и эукариот. В клетках существуют несколько ферментативных систем обеспечивающих различные пути рекомбинации ДНК. Одним из них является гомологичная генетическая рекомбинация (ГР), механизм функционирования которой основан на репарации двунитевых разрывов ДНК с использованием в качестве матрицы гомологичной молекулы ДНК. У прокариот и в соматических клетках эукариот ГР необходима для нормальной репликации и перезапуска поврежденных репликативных вилок (Сох, 2001).

В мейозе у эукариот ферменты ГР, интегрированные в структуры синаптонемного комплекса в виде рекомбинационных узелков, необходимы для правильной сегрегации хромосом и создания новых гаплотипов (Grelon et al., 2001; Богданов, Коломиец, 2007). Наряду с кроссинговером мейотическая рекомбинация

обеспечивается «перетасовкой» отдельных хромосом. Кроссинговер и «перетасовка» хромосом – главные генераторы образования преобладающей части адаптивно значимых генотипов в расщепляющихся поколениях у высших эукариот (Жученко, 2001). Практически все сорта сельскохозяйственных растений и породы животных, а также значительная часть полезных штаммов микроорганизмов созданы с использованием мейотической рекомбинации.

Однако известно, что в профазе I мейоза распределение кроссоверных событий между гомологичными хромосомами неслучайно и носит неравномерный характер, сохраняя недоступные для кроссинговера зоны. Между тем включение в кроссоверный обмен выше названных «молчащих» участков может повысить эффективность селекционных методов за счет изменения частоты рекомбинации между сцепленными генами. Последнее обстоятельство особенно важно при интрогрессивной гибридизации, ставящей своей целью перенос генов хозяйственно-ценных признаков из генома дикорастущих видов в геном культурных растений.

В нашей лаборатории для изучения и индукции частоты мейотической рекомбинации в растительных клетках было предложено использовать стратегию, заключающуюся в создании трансгенных растений конститутивно экспрессирующих гены, белковые продукты которых участвуют в рекомбинации. В качестве модельного гена было предложено использовать *recA* из *Escherichia coli* (Комахин и др., 2005; Комахин и др., 2007). Основанием для этого послужило то, что бактериальный белок RecA на 40-60 % гомологичен эукариотическим рекомбиназам Rad51, но в отличие от них универсален, т.е. способен выполнять разные и даже уникальные функции без участия белков-паралогов и с большей эффективностью (Ланцов, 2007). Для определения экспрессии гена *recA* в качестве репортера использовалась термостабильная лихеназа *licBM3*, поскольку ранее показано, что в составе гибридного белка RecA-LicBM3 белок RecA может связываться с однострелевой ДНК и защищать ее от действия нуклеазы S1, а лихеназа сохраняет термостабильность и активность (Комахин и др., 2005). Для направления белкового продукта RecA-LicBM3 в ядро растительной клетки использован сигнал ядерной локализации NLS (Комахин и др., 2007). Для трансформации растений создан агробактериальный штамм, содержащий растительный экспрессионный вектор, в котором ген *NLS-recA-licBM3* находится под контролем сильного конститутивного промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (Комахин и др., 2007).

Основной целью данной работы было получение и изучение первичных трансформантов и гибридов F₁ томата, экспрессирующих ген *NLS-recA-licBM3*.

Материалы и методы

Вектор pBI *NLS-recA-licBM3*, содержащий ген *NLS-recA-licBM3* под контролем промотора 35S ВМЦК и агробактериальный штамм для трансформации растений, созданы нами ранее (Комахин и др., 2007).

Трансформацию растений томата сорта Марглоб проводили согласно опубликованным ранее данным (Sung Hun Park et al., 2003; Корнеева и др., 2005).

Репортерная система на основе термостабильной лихеназы из *Clostridium thermocellum* предоставлена профессором Э.С. Пирузян (ИОГен РАН). Определение активности лихеназы с помощью метода энзимограмм и чашечного теста проводилось согласно опубликованным ранее данным (Комахин и др., 2005).

Молекулярно-биологический анализ проводили с использованием полимеразной цепной реакции и разработанных нами праймеров на ген *virE2* (GeneID:1224338) и на область *NLS-recA* гибридного гена *NLS-recA-licBM3*. Температура отжига праймеров («Синтол», Россия) 58°C, количество циклов 35. Для определения размеров продуктов ПЦР использован маркер GeneRuler™ 1000 п.н.+ ДНК-маркер («Fermentas», Литва).

Результаты и обсуждение

Первой задачей данной работы было проведение агробактериальной трансформации растений томата, получение каллуса и регенерантов, устойчивых к селективному агенту – канамицину. В качестве экплантов использовали семядоли 10-14 дневных проростков томата. Кокультивацию растительных экплантов с агробактериями, содержащими растительный экспрессионный вектор с геном *NLS-recA-licBM3*, проводили газонным методом при 20°C в темноте. Для элиминации агробактерии после кокультивации использовали тиментин в концентрации 150-300 мг/л. Получение каллуса, регенерацию побегов и их селекцию на канамицине проводили согласно опубликованным ранее работам (Sung Hun Park et al., 2003; Корнеева и др., 2005). В результате было получено 35 независимых регенерантов томата, устойчивых к канамицину в концентрации 100 мг/л.

Отбор регенерантов с помощью только селективного агента не гарантирует, что все полученные растения будут содержать целевой ген. Поэтому с помощью ПЦР был проведен молекулярно-биологический анализ ДНК, выделенной из регенерантов. Первоначально с помощью праймеров на агробактериальный ген *virE2* установлено отсутствие агробактериальной ДНК в образцах, поскольку агробактерии могут быть источником контаминации при анализе генома регенерантов растений на наличие целевого гена (рис. 1А).

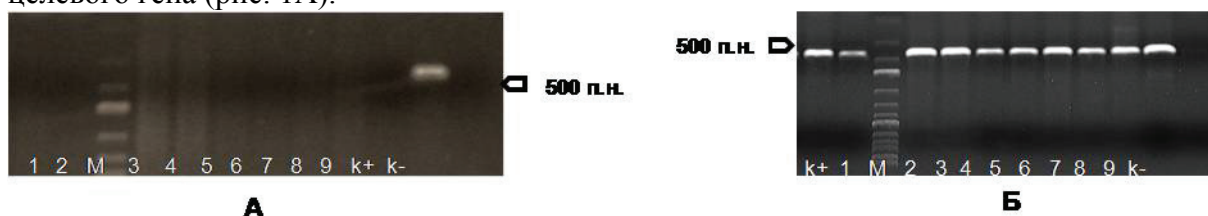


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с использованием ДНК, выделенной из регенерантов растений томата популяции *NLS-recA-licBM3* (1-9). А – реакция с праймерами на ген *virE2* (к+ – ДНК из *A. tumefaciens*, к- вода); Б – реакция на ген *NLS-recA* (к+ – рВI *NLS-recA-licBM3*). М – маркер.

Затем с помощью ПЦР было показано наличие в геноме регенерантов томата гибридных участков *NLS-recA* целевого гена *NLS-recA-licBM3* (рис. 1 Б).

Однако необходимо, чтобы трансген не только содержался в геноме растений, но и экспресировался. Ранее для отбора бактериальных трансформантов, экспрессирующих ген *NLS-recA-licBM3*, были использованы методы чашечного теста и энзимограмм (Комахин и др., 2007). Этот же подход мы применили и для тестирования регенерантов томата. Активность термостабильной лихеназы – просветленные пятна вокруг лунок - была выявлена у всех регенерантов (рис. 2).

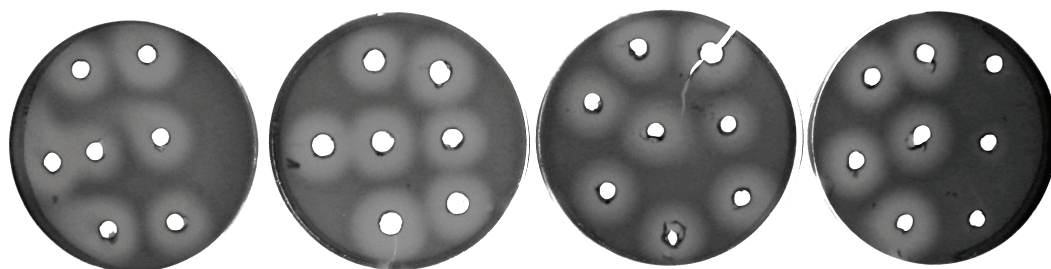


Рис. 2. Чашечный тест некоторых трансформантов томата популяции *NLS-recA-licBM3*; три правых лунки – отрицательный контроль (нетрансгенное растение).

Активность лихеназы в листьях регенерантов только косвенно свидетельствует о биосинтезе в них белка *NLS-RecA-LicBM3*, поскольку метод чашечного теста не позволяет идентифицировать гибридные белки в совокупности растительных. Поэтому белковые экстракты из регенерантов томата были также проанализированы методом энзимограмм (рис. 3).

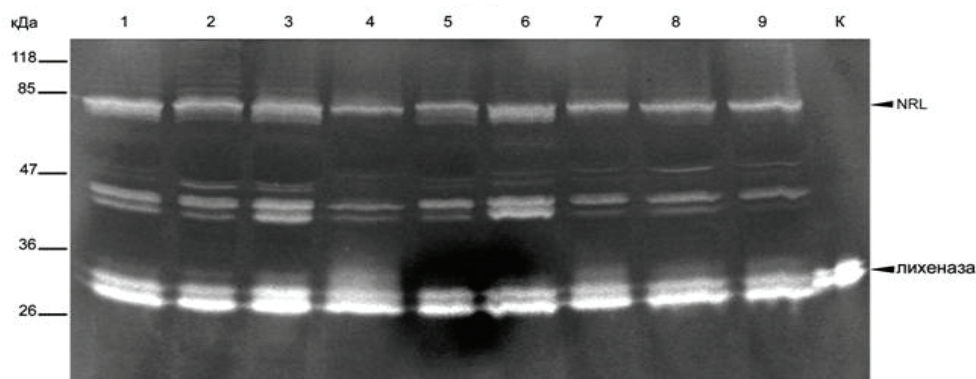


Рис. 3. Энзимограмма водорастворимой фракции белков из листьев некоторых регенерантов томата. NRL - гибридный белок NLS-RecA-LicBM3; К – лихеназа LicBM3; 1-9 – регенеранты томата популяции *NLS-recA-licBM3*.

Как видно из представленных результатов в клетках регенерантов происходит образование гибридных белковых продуктов с молекулярной массой, соответствующей теоретически рассчитанной - 67 кДа (рис. 3). Полосы с более низкой молекулярной массой, чем у полноразмерных рекомбинантных белков, обнаруженные методом энзимограмм, очевидно, являются результатом ограниченного протеолиза.

Таким образом, получены первичные трансформанты растений томата, содержащие и экспрессирующие целевой ген *NLS-recA-licBM3*, которые по маркерным признакам, форме и окраске листа не отличались от исходного сорта Марглоб. Отобранные растения были адаптированы и высажены в почву в условиях защищенного грунта для изучения и получения гибридов.

За время вегетации растения томата популяции *NLS-recA-licBM3* формировали меньшее количество более длинных междоузлий и в целом, имели более короткий стебель, зацветали и завязывали плоды на 15-25 дней раньше контроля. При анализе фертильности пыльцы установлено, что среднее ее значение в популяциях первичных трансформантов томата 81.42 ± 8.0 %. С помощью дисперсионного анализа показано, что различия в фертильности пыльцы у разных растений неслучайны, и скорее всего, являются следствием интеграция Т-ДНК в различные области генома, или же возможно действием соматоклональной либо модификационной изменчивости. В любом случае уровень фертильности пыльцы был достаточным для проведения скрещиваний и получения гибридов F_1 .

Большинство семян гибридов F_1 проросли и были высажены в почву. С помощью чашечного теста установлено, что у некоторых гибридов F_1 в белковых экстрактах тестируется лихеназная активность.

В настоящее время продолжают исследования по изучению мейотического деления в пыльниках бутонов гибридов F_1 и получение гибридов F_2 для сравнительного изучения частоты мейотического кроссинговера (rf).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-13596-офи_ц.

Литература

1. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом. – Москва.- 2007.-358с.
2. Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы).- Москва.- 2001.- Т. 1.- 779с.
3. Комахин Р.А., Абдеева И.А., Салехи Джузани Г.Р., Голденкова И.В., Жученко А.А. Термостабильная лихеназа как трансляционный репортер // Генетика.- 2005.- Т. 41, № 1. С. 31-39.

4. 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.-Т 3.- С.25-32.
5. Корнеева И.В., Парашина Е.В., Лебедев В.Г., Харченко П.Н., Долгов С.В. Получение трансформированных растений томата (*Lycopersicon esculentum* Mill.).- Москва.- 2005.- 13.
6. Ланцов В.А. Гомологическая ДНК-трансфераза RecA: функциональные активности и поиск гомологии рекомбинирующими ДНК // Молекулярная биология.-2007. – Т. 41, №3.-С.467-477.
7. Cox M.M. Historical overview: Searching for replication help in all of the rec places // Proc Natl Acad Sci USA.- 2001.- vol. 98, №15.- P. 8173–8180.
8. Grelon M., Vezon D., Gendrot G., Pelletier G. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants // EMBO J.- 2001.- vol. 20, №3.- P.589-600.
9. 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.- vol. 160, № 10.- P.1253-1257.

Резюме

Для изучения мейотической рекомбинации получены трансгенные растения томата сорта Марглоб и гибриды F₁, экспрессирующие ген *NLS-recA-licBM3*. В настоящее время проводятся исследование мейоза у растений F₁ и получение гибридов F₂ для изучения rf и распределения участков кроссинговера.

For studying of meiotic recombination we have constructed transgenic tomato plants and hybrid F₁ which are expressing gene *NLS-recA-licBM3*. At present are conducted research meiosis at plants F₁ and creation of hybrids F₂ for studying rf and distribution sites of crossing over.

МАЙДАНЮК Д.Н.^{1,2}, АНДРЕЕВ И.О.¹, СПИРИДОНОВА Е.В.¹, КУНАХ В.А.¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Академика Заболотного 150, г.Киев, 03680, Украина; e-mail: i.o.andreev@imbg.org.ua

²Луганский национальный аграрный университет, г. Луганск, 91008, Украина

RAPD-ФРАГМЕНТ, ВАРИАБЕЛЬНЫЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ КУКУРУЗЫ

Культура тканей высших растений является уникальной искусственно созданной биологической системой, которую применяют в разнообразных фундаментальных исследованиях и в биотехнологических разработках. В ряде работ [1-3] сообщается о высоком уровне геномной изменчивости, сопровождающей культивирование тканей кукурузы *in vitro*. Поскольку традиционным источником эксплантов для получения каллусных культур кукурузы являются незрелые зародыши, то возникает вопрос, в какой мере эти результаты отражают изменения генома индуцированные культивированием в условиях *in vitro*, а в какой – обусловлены генетической гетерогенностью исходного материала. В данном исследовании мы применили подход, который исключает влияние последнего фактора, а именно, в качестве эксплантов использовали ткани проростков, что позволило провести сравнительный анализ ДНК индивидуальных растений и полученных от них каллусных культур.

Материалы и методы

В работе использовали инбредные линии кукурузы Black Mexican Sweet (BMS) (семена предоставлены Maize Genetics Cooperative Stock Center, г. Урбана, США), ВИР-27 (Селекционно-генетическим институтом УААН, г. Одесса) и ЧК-218 (Институтом физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев). В качестве эксплантов использовали апикальные части 1-2-дневных проростков длиной 2-5 мм. Для

выделения ДНК использовали ткани проростков и каллусных культур возрастом от 4 до 12 месяцев. Состав питательных сред, условия культивирования, методика выделения ДНК, условия проведения ПЦР и электрофоретического фракционирования продуктов амплификации описаны в [4]. ПЦР повторяли дважды. Блот-гибридизацию проводили по [5]. Полиморфный ампликон выделяли из геля при помощи набора «DNA extraction kit» (Fermentas) и метили [α - 32 P]-dCTP (GE Healthcare) методом рассеянной затравки [5]. Полиморфный ампликон клонировали в плазмиде pUC19, нуклеотидную последовательность определяли на генетическом анализаторе ABI Prism 3730.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ геномной изменчивости каллусных тканей линии BMS. Анализ ДНК интактных растений и полученных от них каллусных тканей возрастом 4, 7, 12 месяцев проводили при помощи RAPD-ПЦР с использованием 40 десятинуклеотидных праймеров (табл. 1). При проведении ПЦР с каждым из праймеров были получены четкие ампликоны, количество которых в спектрах варьировало от 3 до 14.

Всего было учтено 275 RAPD-ампликонов, среди которых полиморфными оказались только два (0,73%). Оба они выявлены в спектре продуктов ПЦР каллусных тканей, полученных с праймером А-01 (рис. 1, верхняя панель). Так, ампликон длиной около 390 п.н. отсутствовал в спектре растения №1, появлялся в четырехмесячном каллусе и не обнаруживался при увеличении длительности пассирования. Аналогичный ампликон наблюдали в RAPD-спектре растения №2, при этом он отсутствовал в спектрах каллусов этого растения. Второй ампликон размером ~1300 п.н. также характеризовался количественной вариабельностью в каллусах обоих растений.

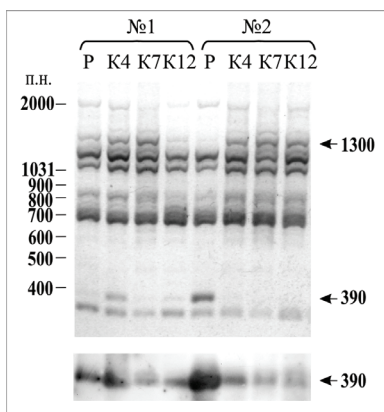
Таблица 1.

Праймеры, использованные для RAPD-анализа

Название праймера	Последовательность (5'-3')	Название праймера	Последовательность (5'-3')	Название праймера	Последовательность (5'-3')
А-01*	CAGGCCCTTC	А-17*	GACCGCTTGT	В-08	GTCCACACGG
А-02*	TGCCGAGCTG	А-18*	AGGTGACCGT	В-10	CTGCTGGGAC
А-03*	AGTCAGCCAC	А-19	CAAACGTCGG	В-18	CCACAGCAGT
А-04*	AATCGGGCTG	А-20*	GTTGCGATCC	Г-01	CCTGTTAGCC
А-05*	AGGGGTCTTG	Аg-01	AGGTCACTGA	М-06	CTGGGCAACT
А-07*	GAAACGGGTG	АН-29	TGGTGACTGA	М-07	CCGTGACTCA
А-08*	GTGACGTAGG	АН-30	TGGTCACTGT	М-14	AGGGTCGTTT
А-09*	GGGTAACGCC	В-01*	GTTTCGCTCC	ОРА-02	TGCCGAGCTG
А-10*	GTGATCGCAG	В-02*	TGATCCCTGG	QR-01	CGGTCACTGT
А-11*	CAATCGCCGT	В-04*	GGACTGGAGT	QR-05	CGGCCCCGGC
А-12*	ATCGCACACT	В-05*	TGCGCCCTTC	340	GAGAGGCACC
А-13	CAGCACCCAC	В-06	TGCTCTGCCC	450	CGGAGAGCCC
А-14*	TCTGTGCTGG	В-07	GGTGACGCAG	474	AGGCGGGAAC
А-16*	AGCCAGCGAA				

Примечание: * – Праймеры, использованные в анализе линий ВІР-27 и ЧК-218

Фрагмент длиной ~390 п.н., полученный путем амплификации из ДНК растения №2, гибридизовали с RAPD-продуктами интактных растений и их каллусных тканей, полученных с праймером А-01. Результаты гибридизации показали наличие последовательностей, гомологичных данному фрагменту, у всех объектов (рис. 1, нижняя панель).



Анализ геномной изменчивости каллусных тканей линий ВИР-27 и ЧК-218.

Методом RAPD-анализа исследовали шестимесячные каллусные ткани, полученные от 8 индивидуальных растений линий ВИР-27 и 7 – ЧК-218 (см. список использованных праймеров в табл.1). Как и в случае линии BMS, каллусные ткани обеих линий характеризовались низкой геномной изменчивостью. Снова полиморфные продукты амплификации были обнаружены лишь в спектре праймера А-01. Полиморфизм заключался в увеличении интенсивности ампликона длиной около 390 п.н., которое наблюдали в культивируемых тканях трех растений линии ВИР-27 (рис. 2). Во всех растениях обеих линий, в каллусах остальных пяти растений линии ВИР-27, а также в культивируемых тканях линии ЧК-218 данный фрагмент выявлялся в незначительном количестве. Полиморфный ампликон был выделен из спектра ПЦР-продуктов ДНК культивируемых тканей одного из растений линии ВИР-27, клонирован и секвенирован. В результате было установлено, что длина фрагмента составляет 397 п.н. Нуклеотидная последовательность данного ампликона представлена на рис. 3.

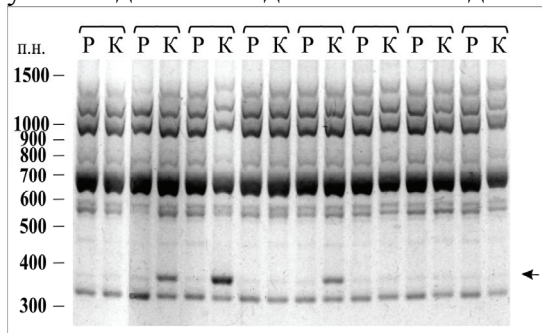


Рис. 2. Генетический полиморфизм растений кукурузы линии ВИР-27 и полученных от них каллусных культур. RAPD-спектры, полученные с праймером А-01: Р – растения-доноры эксплантов, К – каллусные ткани возрастом 6 месяцев. Полиморфный фрагмент размером около 390 п.н. обозначен стрелкой.

Содержание GC-оснований в последовательности составляет 43,3 %, на обеих цепях фрагмента обнаружены открытые рамки считывания, кодирующие полипептиды длиной не более 40 аминокислотных остатков. Поиск в базе данных GenBank среди геномных последовательностей кукурузы и других видов не выявил последовательностей, обладающих значительным сходством с данным фрагментом.

1	AGGCCSTTCC	TCAAAACAAG	AGCGTAGGCA	TCCGATGCAA	AGGGAATAATC	CTCAGCTACA	CCSTTAGATA	GAACCTGTGT	AATACCAACG	AAAGGAATAC
	TCCGGGAAGG	AGTTTGTTC	TCCGATCCCGT	AGGCTACGTT	TCCSTTTTAG	GAGTCCGATGT	GGGAATCTAT	CTTGAGCACA	TTATGGTTGC	TTTCCSTTATG
101	СТТАСАСГАГ	ТАТААААААА	САГСССАААА	ААГСААТААА	СТГАСССАСА	ГАГТГАГТТТ	АААСАГССГА	ТААГССГАСТ	АСАТТГСТАС	СТГААААААА
	ГААТГТГСТС	АТАТТТСТСГ	ГТССГГТТТТ	ТТССГТАТТТ	ГАСТГГГТГТ	СТСАСТСААА	ТТТГТСССГТ	АТТССГССГА	ТГАААААААА	ГАСТТТТТТТ
201	АГСТТАСГСТ	ААТГАААААА	ААГСААТААА	ТААААААААА	СТСТССТСТ	ТГСТАААААА	АААААААААА	ТААААААААА	ТААААААААА	ТААААААААА
	ТССГААТССГА	ТТАААААААА	ТТССГТАТТТ	АТТТГГТТТТ	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА
301	АГАТГААААА	ГТТССААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА
	ТТАААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА	АААААААААА

Рис. 3 Нуклеотидная последовательность варибельного ампликона размером около 390 п.н. из ДНК каллуса кукурузы линии ВИР-27, полученного с праймером А-01.

В данной работе проведен молекулярно-генетический анализ растений и культивируемых тканей трех инбредных линий кукурузы: Black Mexican Sweet C456, культивируемой в Северной Америке, а также линий отечественной селекции ВИР-27 и ЧК-218. Последняя была получена из линии ВИР-27 путем обработки семян стрептомицином и обладает более высокими агрономическими показателями по

сравнению с исходной [6]. Полученные нами результаты свидетельствуют о низком уровне изменчивости генома всех изученных линий кукурузы в культуре тканей. Выявлено лишь два полиморфных ампликона, причем блот-гибридизацией одного из них показано, что полиморфизм обусловлен изменением его количества в составе продуктов ПЦР. Вместе с тем, Осипова и соавторы при помощи RAPD-анализа ранее показали значительные отличия групп регенерантов, полученных из двух- и шестимесячных каллусных культур линии кукурузы А188, как друг от друга, так и от интактного растения [1,2]. Степень отличия соматоклонов от исходной линии варьировала от 6,5% до 23%. Браун и соавторы [3] методом ПДРФ также обнаружили значительный полиморфизм в каллусных тканях и соматоклонах линии А188. Такие расхождения в результатах, полученных нами и другими исследователями, можно объяснить генетическими особенностями исследованных линий кукурузы. Еще одним отличием нашей работы является то, что в ней исследовали каллусные культуры, происходящие от индивидуальных растений, благодаря чему была проведена непосредственная оценка изменения отдельных геномов путем сравнения культивируемых тканей с растением-донором экспланта. Это позволило исключить возможный вклад внутрилинейной гетерогенности в полиморфизм RAPD-продуктов, выявляемый в культуре тканей.

В результате исследований было обнаружено два полиморфных фрагмента, один из которых оказался вариабельным в культуре тканей двух линий, а именно ампликон размером около 390 п.н. из спектра ПЦР-продуктов праймера А-01. В случае линии BMS по наличию данного фрагмента между собой отличались как растения, так и полученные из них культуры тканей разного возраста. В случае линии ВИР-27 данный ампликон отсутствовал во всех растениях, но появлялся в каллусных культурах. На примере линии BMS методом блот-гибридизации было показано, что этот фрагмент в разном количестве присутствует в составе ПЦР-продуктов праймера А-01 у всех объектов, т.е. ее полиморфизм носит количественный характер. Мы предполагаем, что причиной этого явления может быть эпигенетическая изменчивость (избирательная амплификация отдельных участков генома) при смене физиологического состояния клеток в условиях культуры *in vitro*. Попытка выяснить функциональное значение вариабельного фрагмента путем анализа его нуклеотидной последовательности и последующего поиска в базе данных GeneBank не увенчалась успехом. Отсутствие в ней открытых рамок считывания достаточной протяженности позволяет отнести фрагмент к некодирующим участкам генома.

Выводы

На основе сравнительного анализа индивидуальных растений и полученных от них каллусных культур показано, что культивируемые ткани инбредных линий кукурузы BMS, ВИР-27, ЧК-218 в культуре *in vitro* характеризуются низким уровнем геномной изменчивости. Полиморфизм заключался в изменениях количества ампликонов в спектрах продуктов ПЦР. В культивируемых тканях двух линий кукурузы (BMS, ВИР-27) обнаружен вариабельный ампликон размером около 390 п.н., однако выяснить его функциональное значение путем анализа нуклеотидной последовательности не удалось.

Литература

1. Осипова Е.С., Кокаева З.Г., Троицкий А.В., Долгих Ю.И., Шамина З.Б., Гостимский С.А. RAPD-анализ соматоклонов кукурузы // Генетика. – 2001. – Т.37, №1. – С. 91–96.
2. Осипова Е.С., Ковеза О.В., Троицкий А.В., Долгих Ю.И., Шамина З.Б., Гостимский С.А. Выявление специфических фрагментов у соматоклонов кукурузы и создание на их основе SCAR-маркеров // Генетика. – 2003. – Т.39, №12. – С. 1664–1672.
3. Brown P.T.H., Göbel E., Lörz H. RFLP analysis of *Zea mays* callus and their regenerated plants // Theor. Appl. Genet. – 1991. – vol. 81. – P. 227–232.

4. Майданюк Д.Н., Андреев И.О., Спиридонова Е.В., Чеченева Т.Н., Кунах В.А. Геномная изменчивость линии кукурузы Black Mexican Sweet Corn C456 в культуре тканей *in vitro*: результаты RAPD-анализа // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т.4, №1. – С. 58-67.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
6. Борейко В. С. Индуцированные мутации у инбредных линий кукурузы при помощи химических мутагенов // Дис. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. – К.: Ин-т молекулярной биологии и генетики АН УССР, 1978. – 190 с.

Резюме

RAPD-анализ геномов индивидуальных растений кукурузы линий Black Mexican Sweet, ВІР-27 и ЧК-218 и полученных от них каллусов показал низкий уровень изменчивости *in vitro*. В культивируемых тканях двух линий кукурузы обнаружен варибельный ампликон размером около 390 п.н., однако выяснить его функциональную роль путем анализа нуклеотидной последовательности не удалось.

RAPD-аналіз геномів окремих рослин кукурудзи ліній Black Mexican Sweet, ВІР-27 і ЧК-218 та отриманих від них калюсних культур показав низький рівень мінливості *in vitro*. В культивованих тканинах двох ліній (BMS та ВІР-27) знайдено варіабельний амплікон розміром близько 390 п.н., проте з'ясувати його функціональну роль шляхом аналізу нуклеотидної послідовності не вдалося.

RAPD-analysis of maize plants from Black Mexican Sweet, VIR-27 and ChK-218 inbred lines as well as derived from them cultured tissues revealed low genetic variability *in vitro*. A variable amplicon of approximately 390 bp was found in cultured tissues of two inbred lines. An analysis of amplicon sequence did not allow to recognize it's function.

МАТВЄЄВА Н.А., ШАХОВСЬКИЙ А.М., КВАСКО О.Ю., ВАСИЛЕНКО М.Ю., ГЕРАСИМЕНКО І.М., КУЧУК Н.В.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного 148. e-mail joyna@i.com.ua*

***CICHORIUM INTYBUS* L. ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ОБ'ЄКТ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

Дослідження в галузі біотехнології рослин відрізняє їх практична спрямованість, зокрема, науковий і практичний інтерес становить використання досягнень генетичної інженерії в медицині та ветеринарії [1, 2]. Відомо, що гени, які кодують антигени бактеріальних чи вірусних патогенів, можуть експресуватися в клітинах рослин. При цьому вони зберігають свої імуномодулюючі властивості та можуть слугувати лікувальними і профілактичними засобами. Отже, генетично модифіковані рослини можуть бути використані для продукування фармакологічно активних білків, включаючи антитіла, вакцини, гормони. Нині розроблено методи, що дозволяють ініціювати в рослинах синтез бактеріальних антигенів. Це може бути здійснено шляхом генетичної трансформації [3], наприклад, методом агробактеріальної трансформації. Харчові культури, що не потребують термообробки, можуть стати природним, готовим до вживання продуктом для профілактики та лікування низки захворювань, тобто, так званими їстівними вакцинами [1]. Фармацевтичні препарати

рослинного походження мають ряд переваг. Їх виробництво та зберігання має відносно невелику вартість, вони придатні для масового виробництва [3].

В процесі отримання рекомбінантних білків важливим є вибір рослини – об’єкту трансформації. В залежності від мети ними можуть бути харчові або нехарчові культури. Харчові культури в профілактичних цілях можуть вживатися безпосередньо в їжу. Механізм імунізації такими “їстівними вакцинами” базується на розпізнаванні М-клітинами епітелію тонкого кишковика чужорідного білку, що має антигенні властивості. Нехарчові культури є потенційними виробниками – біофабриками цільових білків, які можуть бути виділені та очищені [4].

Цикорій (*Cichorium intybus* L.) – дворічна рослин родини Asteraceae - має спектр лікарських властивостей, що обумовлено наявністю інуліну, кумаринів, флавоноїдів, вітамінів [5]. Зокрема, цикорій використовують в медицині як гепатопротекторний, притивиразковий, протизапальний, кардіотонічний, диуретичний засіб [5, 6]. Цикорій є цінною харчовою культурою, адже кореневища рослин є сировиною для виготовлення заміни кави, а ряд виведених салатних сортів використовують в їжу у сирому вигляді. Отже, цикорій, зокрема, салатні сорти, може стати основою для створення біовакцин.

Оскільки цикорій не є розповсюдженим об’єктом, нами було вивчено деякі особливості культивування цієї рослини *in vitro*, зокрема, оптимізовані умови регенерації, мікророзмноження та укорінення. Результати цих досліджень було використано для отримання генетично модифікованих рослин з генами, що кодують синтез туберкульозних антигенів та інтерферону.

Матеріали та методи

Вихідним матеріалом було насіння цикорію *C. intybus* сорту Пала росса. Насіння стерилізували послідовно в 70% етанолі (1 хв.) і 25% розчині комерційного препарату «Білизна» (10 хв.), та промивали в дистильованій воді (60 хв.). Пророщували насіння на агаризованому середовищі MS [7] при 16 -годинному світловому фотоперіоді та температурі 24°C.

Для регенерації пагонів і трансформації використовували сім’ядольні та справжні листки 10-12-денних проростків. На них робили поперечні надрізи та культивували при 16-годинному світловому фотоперіоді та температурі 24°C.

Для визначення частоти регенерації рослин з сім’ядольних та листових експлантів, мікророзмноження та укорінення використовували середовища, що відрізнялися як вмістом солей (MS або B₅ [8], так і фітогормонів кінетина, α-нафтилоцтової кислоти (НОК), бензиламінопурина (БАП), індолілоцтової кислоти (ІОК), індолілмасляної кислоти (ІМК).

Для трансформації використовували *Agrobacterium tumefaciens* (штам GV3101) з векторними конструкціями pCB063 та pCB124 (рис. 1). При створенні векторної конструкції pCB063 був використаний бінарний вектор, що містить ген *nptII* з регуляторними послідовностями NOS промотору і термінатору. У ділянку Т-ДНК під контролем 35S промотору і OCS термінатору клонувана структурна послідовність гена, що кодує синтез туберкульозного антигена ESAT6. Т-ДНК вектору pCB124 містила селективний ген *nptII*, цільовий ген *ifn-α2b*, злитий з лідерною послідовністю, що забезпечує транспорт цільового білку в апопласт.

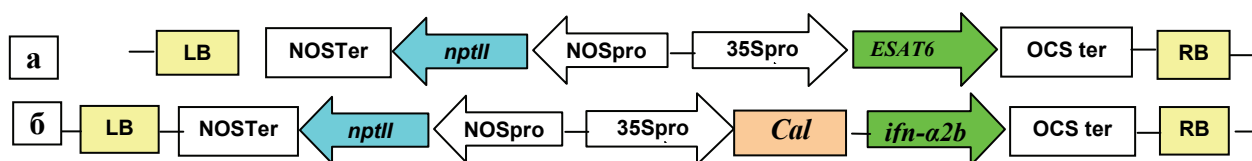


Рисунок 1- Схема Т-ДНК векторів pCB063 і pCB124 для агробактеріальної трансформації *Cichorium intybus*: LB, RB – ліва і права межі Т-ДНК; *nptII* – ген

неоміцинфосфотрансферази II; *ifn- α 2b* – ген інтерферону- α 2b; ESAT6 - ген, що кодує синтез туберкульозного антигена; NOSpro - промотор гена нопалінсинтази; NOSter – термінатор гена нопалінсинтази; 35Spro – промотор гена 35S-білку з геному вірусу мозаїки цвітної капусти; OCster – термінатор гена октопінсинтази; *cal* – кальретикулін.

Бактерії вирощували на середовищі LB [9] з антибіотиками (100 мг/л карбеніциліну, 50 мг/л рифампіцину, 25 мг/л гентаміцину) 48 годин при температурі 27⁰С. Бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням (3000 об/хв, 10 хв.), осад ресуспендували в розчині 10мМ MgSO₄. Листки з попередньо зробленими насічками інкубували в бактеріальній суспензії 30 хв., промокали фільтрувальним папером і культивували на агаризованому середовищі MS без антибіотиків протягом двох діб. Після цього експланти переносили послідовно на середовища MS з 2,5 кінетину, 0,5 НОК (1 тиждень) та MS з 0,5 кінетину, 0,05 НОК з додаванням антибіотиків канамицину (25 мг/л) і цефотаксиму (600 мг/л). Пагони, що утворилися, укорінювали на середовищі MS без гормонів з антибіотиками в таких самих концентраціях.

Геномну ДНК виділяли із зелених листків стерильних рослин СТАВ методом [10].

Таблиця 2 - Праймери, використані для підтвердження присутності генів

Ген	Праймери	Розмір ампліфікованого фрагменту, п.н.
<i>nptII</i>	5'- cctgaatgaactccaggacgaggca-3' 5'- gctctagatccagagtcgctcagaag-3'	622
<i>Int-α2b</i>	5'-ctcctgctgaaggacag-3' 5'-ggagtcctcctcatcag-3'	264
<i>ESAT6</i>	5'-ctgaccatggcagagcagcagtggaaatttcgc-3' 5'-gagaattctgcgaacatcccagtgctcg-3'	299

ПЛР-ампліфікацію геномної ДНК проводили на ампліфікаторі Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) з термостатованою кришкою в пробірках з ультратонкими стінками. Реакційна суміш складалася з однократного ПЛР-буфера із сульфатом амонію, 0,2 мкМ відповідних праймерів (таблиця 2), 200 мкМ кожного з дезоксинуклеотидтрифосфатів, 0,5 ед. Таq-полімерази, 10-50 нг ДНК-проби. Загальний об'єм реакційної суміші становив 20 мкл.

Умови ампліфікації: первинна денатурація - 94⁰С, 3 хв., 30 циклів ампліфікації (94⁰С, 30 сек.- 60⁰С, 30 сек.- 72⁰С, 30 сек.), остаточно полімеризація - 72⁰С, 5 хв.

Результати та обговорення

Кількість публікацій щодо генетичної трансформації цикорію є обмеженою. Експерименти було спрямовано в напрямку створення рослин зі зміненим фенотипом, зокрема, з прискореним цвітінням [11], стійких до гербіцидів [12], таких, що синтезують фруктан [13]. Враховуючи той факт, що запорукою успіху застосування різних методів генетичної трансформації є оптимізовані та ефективні методики культивування рослин в культурі, нами проведено серію експериментів та визначено оптимальний склад поживних середовищ як для регенерації рослин з листових експлантів, так і для їх укорінення *in vitro*. Так, було показано, що при наявності у складі середовища макроелементів середовища MS та 0,5 мг/л кінетину частота регенерації становить 100%. При використанні у якості фітогормону 0,5 мг/л БАП (макроелементи MS) цей показник виявився нижчим та становив 70%. При зміні мінерального складу середовища на В5 спостерігали суттєве зменшення частоти регенерації, яка становила 0 – 50% в залежності від наявності та концентрації кінетину та БАП.

Визначено оптимальний склад середовища для укорінення отриманих регенерантів – ½ макроелементів MS та 0,1 - 2,5 ІМК. За таких умов культивування

коренева система мала максимальну вагу (до 276 мг на рослину), що перевищувало її розміри на середовищах MS та ½ MS у 30 та 10 разів відповідно.

Після агробактеріальної трансформації сім'ядольних експлантів отримано рослини, що зберігали зелене забарвлення при культивуванні в присутності селективної концентрації канаміцину (25 мг/л). Частоту трансформації експлантів вираховували за відношенням кількості експлантів із зеленими на селективному середовищі пагонами до загальної кількості експлантів у відсотках. Цей показник становив в залежності від використаної конструкції - рСВ063 або рСВ124 – 7,7 та 26,9% відповідно. Ми вважаємо, що успіху було досягнуто насамперед завдяки використанню об'єкту, що відзначається високим регенераційним потенціалом, адже частота регенерації рослин сорту Пала росса становила 100%.

Для підтвердження наявності цільових генів застосовували метод ПЛР-аналізу. Вибірковий аналіз тотальної ДНК рослин, регенерованих на селективному середовищі після трансформації конструкцією рСВ124 з та рослин після трансформації конструкцією рСВ063 показав присутність як селективного гена *nptII*, так і цільових генів *ifn-α2b* та *ESAT6*.

Таким чином, було показано, що до складу оптимального середовища для регенерації рослин з сім'ядольних експлантів цикорію сорту Пала росса мають входити мікроелементи за MS та 0,5 – 2,5 мг/л кінетину. Швидке укорінення спостерігається на середовищі, що містить ½ мікроелементів за MS та 0,1 – 0,5 мг/л ІМК. Показано, що методом агробактеріальної трансформації можуть бути отримані генетично модифіковані рослини цикорію як з геном *ifn-α2b*, так і з геном *ESAT6*. Частота трансформації експлантів виявилася досить високою та становила 7,7 – 26,9%, що, вірогідно, є результатом високої регенераційної здатності сорту Пала росса. Раніше нами було показано, що є можливим створення трансгенних рослин салату з геном *ESAT6* з високою ефективністю [14]. Проведені дослідження показують, що цикорій, так само як і салат, є можливим перспективним об'єктом генетичної трансформації, зокрема, може стати основою створення так званих біовакцин.

Література

1. Mason H.S., H. Warzecha, T. Mor et al. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine // Trends Mol. Med. – 2002. – Vol. 8, № 7. – P. 324 - 329.
2. Rice J., W. M. Ainley, P. Shewen . Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health // Anim. Health. Res. Rev. – 2005. – Vol. 6, № 2, P. 199 - 209.
3. Daniell H., S. J. Streatfield, K. Wycoff. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants // Trends Plant Sci. - 2001. – Vol. 6, № 5. – P. 219 - 226.
4. Horn M.E., K.M. Pappu, M.R. Bailey et al. Advantageous features of plant-based systems for the development of HIV vaccines // J. Drug Target. – 2003. – Vol. 11, № 8-10. - P. 539 - 545.
5. Gadgoli C., Mishra S.H. Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus* // Ethanopharmacology. - 1997. – Vol. 58, № 2. – P. 131-134.
6. Ahmad K.D., S.N. Gilani, A.H. Akhta, L. Khan. Antiulcerogenic evaluation of aqueous extracts of *Cichorium intybus* and *Phyllanthus emblica* in normal and aspirin-treated rats // Pakistan. J. of Scie. and Industrial Res. - 1998. – Vol. 41, № 2. – P. 92 - 96.
7. Murashige T., Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15, № 3. – P. 473–497.
8. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. – 1968 – Vol. 50, № 1. – P. 148–151.
9. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. - 480 с.

припущення про можливість відбору клітинних ліній з перехресною стійкістю до абіотичних стресів та іонів важких металів, які не є фізіологічно необхідними для рослинного організму та здатні в мікрокількостях чинити багатфакторний негативний вплив на функціонування клітин дикого штаму. Очевидно, що пріоритет будуть мати ті токсичні елементи, які не здатні індукувати суттєвих порушень і перебудов у структурній організації геному [7]. Одними із таких токсичних елементів можуть бути оксіаніони вольфраму, які чинять багатовекторний вплив на фізіолого-генетичні процеси, в тому числі на експресію генів, що реалізується на рівні транскрипції та трансляції.

Нами отримані клітинні лінії сої (*Glycine max* L., Merr), стійкі до токсичних концентрацій вольфрамат оксіаніонів (WR), які крім того, мають перехресну стійкість до модельованих іонних, осмотичних стресів та іонів ванадію. Методом RAPD- аналізу був показаний низький рівень мінливості ДНК WR-лінії [8]. Ці властивості WR- ліній роблять їх адекватною модельною системою для вивчення на клітинному рівні молекулярно-генетичних та цитогенетичних аспектів комплексної стійкості рослин.

Метою даної роботи було цитологічне дослідження вихідного калюсу та тривало культивованої клітинної лінії сої, стійкої до летальних концентрацій вольфраму.

Матеріали і методи

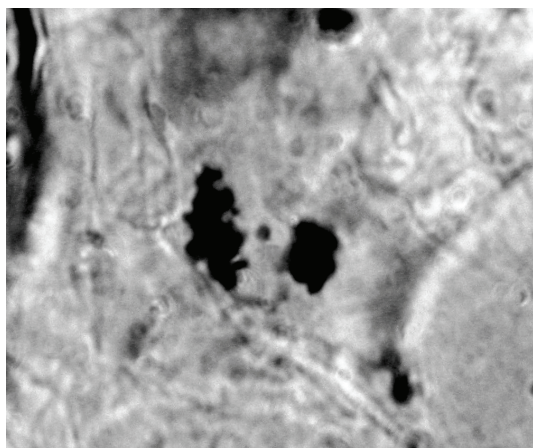
Об'єктом дослідження служили: калюс, індукований із листкової пластинки сої сорту Київська -27 на середовищі B5 Гамборга, та WR- лінія, яка була отримана методом „плейтингу” на модифікованому селективному середовищі B5, що замість молібдену містило вольфрамат-оксіаніони в концентрації 1мМ, яка є летальною для клітинних культур дикого типу, крім того, азот був присутній тільки в нітратній формі.

Цитогенетичне дослідження проводили в період найбільшої мітотичної активності клітин, на сьому добу пасажу. Матеріал фіксували в суміші етилового спирту та льодяної оцтової кислоти (3:1) протягом доби за температури 4°C і переносили в 70 % етиловий спирт. Для аналізу зразки відмивали декілька разів у дистильованій воді і переносили для мацерації у 5N HCl кімнатної температури на 20 хвилин. Калюсні тканини фарбували 2 %-ним розчином ацетоорсеїну за кімнатної температури протягом 2-3 діб. Тимчасові давлені препарати готували в 45% оцтовій кислоті за методикою Паушевої [9].

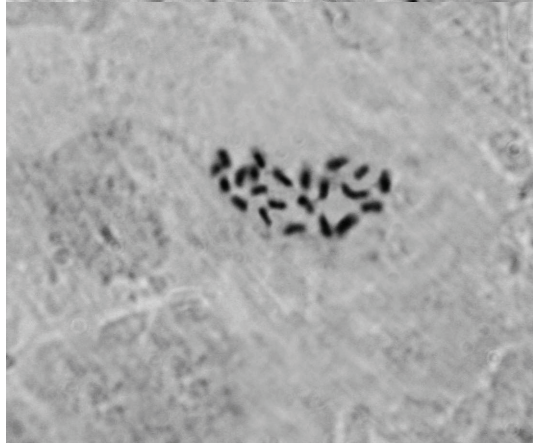
Результати та обговорення

Клітини інтактних рослин сої (*Glycine max* L., Merr) мають 40 хромосом ($2n=4x=40$). Припущено, що походження цього виду пов'язане з ало- або автополіплоїдизацією [10].

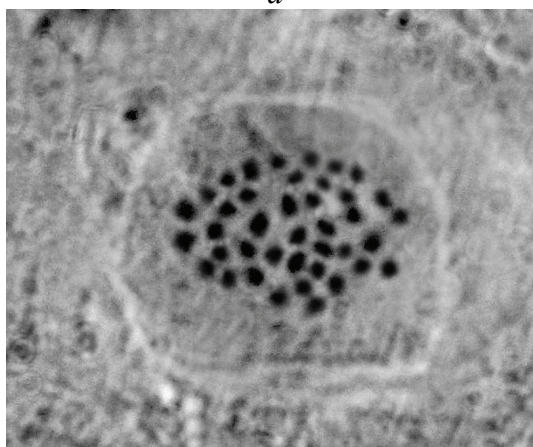
Цитологічний аналіз клітин вихідного калюсу (1 пасаж), показав широке варіювання числа хромосом від 10 до 60 із двома чітко вираженими модальними класами 2x та 4x, які складають 42,8% та 35,7% відповідно. У 14,2% клітин відмічено редукцію числа хромосом – їх кількість не перевищувала 10 (1x). Приблизно з однаковою частотою (у сумі близько 7%) спостерігалась поява анеуплоїдних та поліплоїдних клітин. Поряд з цим були виявлені структурні перебудови хромосом, які представлені у вигляді одиничних фрагментів, однак такі порушення зустрічалися досить рідко з частотою близько 1 % (рис.1.а.).



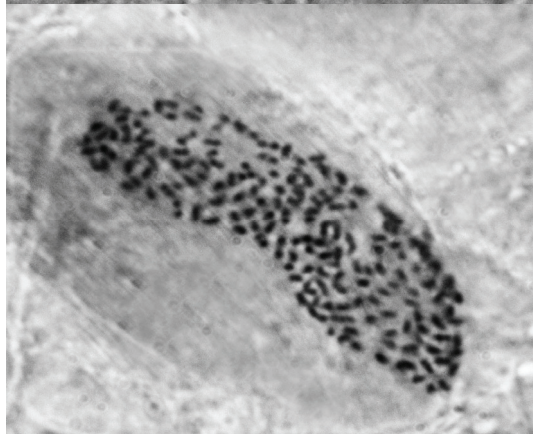
a



б



в



г

Рис. 1. Мітотичні клітини вихідного калюсу та WR- лінії сої
a – одиничний фрагмент вихідного калюсу; *б* – гаплоїда клітина ($n=2x=20$); *в* –
диплоїдна клітина ($2n=4x=40$); *г* – поліплоїдна клітина ($2n=12x=120$) WR- лінії.

При культивуванні вихідного калюсу на середовищі із селективною дозою іонів вольфраму (1мМ) клітин на стадії мітозу знайти не вдалося. Крім того, за летальної дози цього стресору здійснювалася фрагментація ДНК клітин із формуванням безперервного спектру фрагментів широкого діапазону молекулярних мас. Це свідчить про загибель клітин шляхом некрозу за дії токсичних концентрацій оксіаніонів вольфраму.

Вольфрам-стійка клітинна лінія восьмого пасажу представляє собою гетерогенну популяцію, в якій зустрічаються клітини різного рівня плоідності з розмахом мінливості числа хромосом від 7 до 90. Модальний клас складала клітини з кількістю хромосом біля 4x (60%), тоді як число хромосом біля 2x було виявлено у 10%, а 3x - у 20% клітин. Кількість анеуплоїдних та поліплоїдних клітини складала близько 3% та 7%, відповідно. У тривало культивованої вольфрам-стійкої лінії 43 пасажу модальний клас становили клітини з числом хромосом біля 4x (57,8 %). При цьому спостерігався більший спектр за числом хромосом - від 20 до 120 на клітину, тобто не зустрічалися метафази з кількістю хромосом 1x. Клітини з числом хромосом 2x та 6x зустрічалися з частотою - 11,5%, 3x – виявлені у 3,8% клітин, а 8x та 12x становили приблизно 15,5 % загальної кількості всіх мітотичних клітин. Серед близько 300 проаналізованих мітозів стійкої клітинної лінії різного терміну культивування анафазних аберацій не спостерігалось. На рис. 1(б, в, г) представлені приклади типових метафаз WR-лінії.

Отримані дані свідчать, що на відміну від вихідного калюсу у вольфрам-стійкої клітинної лінії 8-го та 43-го пасажів в присутності летальних доз стресора спостерігається один модальний клас з числом хромосом - біля 4x. Крім того, відмічається тенденція до підвищення рівня плоідності від тривалості культивування, про що свідчить збільшення клітин з числом хромосом більшим 4x.

Відомо, що при культивуванні в умовах *in vitro* тільки деякі культури можуть мати стабільне число хромосом, тоді як інші зазнають швидких змін геному. Численні дані стосовно генетичних змін в культурі *in vitro* дають підставу вважати, що збереження клітинами генетичної стабільності може розглядатися лише як виключення, а культивовані клітини вищих рослин є штучно створеними популяціями, головною особливістю яких є висока гетерогенність та мінливість [3]. Міксоплоїдія - поширене явище не тільки при культивуванні *in vitro*, а й досить часто зустрічається в нормі у клітинних популяціях меристем. Тому гетерогенність клітин за числом хромосом вже на перших етапах культивування контрольного калюсу може обумовлюватися як варіабельністю вихідних клітин експланта, так і компонентами живильного середовища [11,12].

Відносну стабільність модального класу хромосом (біля 4x) клітин WR-лінії можна пояснити тим, що скоріш за все вона утворилася в результаті розмноження мутантної клітини, відібраної при селекції на стійкість до летальної концентрації оксіаніонів вольфраму. В наших дослідах такі клітини зустрічаються з частотою 10^{-6} .

Взагалі, отримані дані свідчать про відносно низький рівень цитологічної та молекулярно-генетичної мінливості геному вольфрам-стійкої лінії сої.

Література

1. Breiman A., Felsenburg T., Galun E. Is *Nor* region variability in wheat invariably caused by tissue culture? // Theor. Appl. Genet. — 1989. — Vol. 77. — P. 809-814.
2. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 1. Изменчивость в онтогенезе // Биополимеры и клетка. — 1994. — Т. 10, № 6. — С. 5-35.
3. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. — К.: Логос, 2005. — 730 с.
4. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция //Киев: Наукова думка. —

10. Дрейнер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. - М., 1991. - С. 241 - 245.
11. Harsh Pal Bais, R. T. Venkatesh, Arun Chandrashekar, G. A. Ravishankar Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of Witloof chicory –In vitro shoot regeneration and induction of flowering // Current Sci. – 2001. - Vol. 80, № 1. - P. 83-87.
12. Vermeulen A., Vaucheret H., Pautot V., Chupeau Y. Agrobacterium mediated transfer of a mutant Arabidopsis acetolactate synthase gene confers resistance to chlorsulfuron in chicory (*Cichorium intybus* L.) // Plant Cell Rep. - 1992, Vol. 11, № 5-6. - P. 243-247.
13. Vijn I., van Dijken A., Sprenger N., van Dun K., Weisbeek P., Wiemken A., Smeekens S. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase // The Plant J. – 1997. – Vol. 11, № 3. - P. 387 – 398.
14. 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. – Т.44, № 2. – С. 27-32.

Резюме

Методом агробактеріальної трансформації отримані генетично модифіковані рослини цикорію сорту Пала росса з геном синтезу інтерферону *ifn-α2b* та з геном, що кодує синтез туберкульозного антигену ESAT6 з частотою трансформації експлантів 7,7 – 26,9%. Проведені дослідження показують, що цикорій є перспективним об'єктом генетичної трансформації, зокрема, може стати основою створення так званих біовакцин.

Методом агробактериальной трансформации получены трансгенные растения цикория сорта Пала росса с геном синтеза интерферона *ifn-α2b* и геном, кодирующим синтез туберкулезного антигена ESAT6. Цикорий может быть перспективным объектом генетической трансформации, в частности, может стать основой создания так называемых биовакцин.

Transgenic chicory plants cv. Pala rossa with gene coding synthesis of tubercular antigene ESAT6 and *ifn-α2b* genes have been resieved via Agrobacterium-mediated transformation with frequencies 7,7 – 26,9%. Chicory can be perspective object of genetic transformation, in particular, can become a basis of creation of so-called biovaccines.

МИХАЛЬСЬКА С.І., СЕРГЄЄВА Л.Є., ТИЩЕНКО О.М.

Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська 31/1, e-mail: oltyko@gmail.com

МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ СОЇ, СТІЙКОЇ ДО ОКСІАНІОНІВ ВОЛЬФРАМУ

Ускладнення генетико-селекційних програм потребує пошуку нетрадиційних підходів та методів, які дозволяють виявити та використати всі потенційні можливості рослинного організму для підвищення їх стійкості до несприятливих факторів довкілля. Практичне використання культури тканин рослин стимулюється високим рівнем генетичних змін, які з одного боку, можуть бути обумовлені гетерогенністю вихідного експланту, з іншого – умовами культивування *in vitro*. Генетична гетерогенність калюсних ліній може служити основою для технології створення генотипів з новими ознаками і подальшого отримання рослин – регенерантів або клітинних штамів з бажаними якостями [1-6].

Для гарантованого відбору цінних мутацій, що виникають на рівні інтактною рослини *in vivo* або при культивуванні *in vitro* рослинних тканин, запропоновано напрямок клітинної селекції, який полягає у створенні селективних систем з використанням летальних концентрацій іонів важких металів [7]. Теоретично висунуто

1990. – 280с.;
5. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell cultures // Ann.Rev.Plant Physiol. – 1984. – 35. – P. 519-542
 6. Сергеева Л.Е. Изменения культуры клеток под действием стресса. – К.: Логос, 2001. – 100 С.
 7. Сергеева Л.Е. Новая среда с ионами бария – альтернативная система для отбора солеустойчивых клеточных линий // Биотехнологія. – 2002. - 2. – С.47-52.
 8. Тищенко Е.Н., Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Данильченко О.А. RAPD- анализ вольфрамустойчивой клеточной линии сои с комплексной толерантностью к осмотикам // Физиология и биохимия культ. растений. - 2008. – Т.40. - №4. – С.329-337.
 9. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. М.1988. – 280 с.
 10. Roth E. J, Frazier B L., Aruya N. R. Lark K G. Genetic variation in an inbred plant: Variation in tissue cultures of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] // Genetic - 121 – 1989 - P.359-368.
 11. Бублик Е.Н., Адонин В.И., Кунах В.А. Цитогенетическая изменчивость клеточных линий *Ungernia victoris* при выращивании на питательных средах различного состава // Цитология и генетика. – 2008. - №1. С.29 -36.
 12. Чугункова Т.В., Дубровная О.В. Цитогенетический анализ каллусных культур и растений – регенерантов, полученных из эксплантов сахарной свеклы различной ploidy // Цитология и генетика. – 1998. – Т.32, №4. – С.9-15.

Резюме

Показано, що на відміну від вихідного калюсу, в якому виявлено два модальних класи числа хромосом (біля 2x та 4x), у вольфрам-стійкої клітинної лінії спостерігається один модальний клас (біля 4x). Крім того, відмічається тенденція до підвищення рівня плоідності вольфрамстійкої лінії із збільшенням терміну культивування в умовах *in vitro*.

Показано, что в отличии от исходного каллуса, у которого определено два модальных класса числа хромосом (около 2x и 4x), у вольфрамустойчивой клеточной линии наблюдается один модальный класс числа хромосом (около 4x). Кроме того, отмечается тенденция к увеличению уровня ploidy у вольфрамустойчивой клеточной линии с повышением срока культивирования в условиях *in vitro*.

There were shown that unlike the initial callus with two modal chromosome classes (near 2x and 4x) the tungsten resistant cell line is characterized by single modal chromosome class (near 4x). Besides that tendency towards polyploidy in tungsten resistant cell line with the increasing of cultivation tern in vivo is exhibited.

РУДАС В. А., ШАХОВСЬКИЙ А. М., МОРГУН Б. В., МАТВЄЄВА Н. А., КУЧУК М. В.

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: rudasv@gmail.com

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ РОСЛИН КАРТОПЛІ СТІЙКИХ ДО ГЕРБІЦИДУ БАСТА, ЩО МІСТЯТЬ ГЕН *cup11A1* ЦИТОХРОМУ P450sc

Створення сортів культурних рослин з підвищеною продуктивністю та стійкістю до гербіцидів є нагальною вимогою нашого часу. Використання сучасних біотехнологічних методів і, зокрема, генетичної трансформації рослин дозволяє значно скоротити час отримання рослин з бажаними характеристиками.

Метою нашого дослідження було отримання методами генної інженерії рослин картоплі з підвищеною біологічною продуктивністю та стійкістю до гербіцидів. Вибір

гена *bar* для генетичної трансформації зумовлений його високою ефективністю [1], широким застосуванням та наявністю комерційних контактних гербіцидів суцільної дії (Basta, Vialaphos, Glufosinate, Phosphinothricin) до яких він надає стійкість. В свою чергу ген *sup11A1* кодує мітохондріальний цитохром P450_{scs}, який в стероїдогенних тканинах тварин каталізує перетворення холестерину в прегненолон, спільний метаболічний попередник усіх стероїдних гормонів. Стимулюючий вплив ендогенного застосування стероїдних гормонів на проростання пилку тютюну був продемонстрований в 1995 році [2]. Декілька років тому було показано, що трансгенні рослини *Nicotiana tabacum*, які несли ген *sup11A1*, що кодує цитохром P450_{scs} з мітохондрій кори надниркових залоз бика, випереджали рослини дикого типу за швидкістю росту і розвитку надземної і підземної частин, вмістом водорозчинного білку, вуглеводів і крохмалю [3,4,5]. Ці позитивні перетворення відбувалися внаслідок зміни гормонального статусу трансгенних рослин і свідчили про функціональну активність P450_{scs} тваринного походження в рослинах. Іншим можливим позитивним явищем при трансформації рослин геном *sup11A1* може бути поява у трансгенних рослин стійкості до деяких гербіцидів. Було продемонстровано що трансгенні рослини картоплі, які несуть ген *sup1A1* пацюка відрізнялися підвищеною стійкістю до гербіцидів хлортолуруну і метабензтіазуруну [6].

Матеріали і методи

Бактеріальний штам. Для генетичної трансформації картоплі використовували *Agrobacterium tumefaciens* штам GV3101, що несе генетичну конструкцію pCB093 розміром 10960 п.н. На Т-ДНК розміщувалися експресивні касети Pnos-*bar*-Tocs, P35S-*sup11A1*-T35S та P35S-*sgfp*-Tnos.

Рослинний матеріал. В роботі були використані асептично вирощені *in vitro* рослини 6 сортів картоплі (*Solanum tuberosum* L.), а саме: Луговська, Дезіре, Білоруський 12, Ласунак, Слов'янка, Незабудка. Рослини вирощували в пробірках на середовищі МС [7] при температурі 23-25 °С, 16-годинному світловому фотоперіоді та розмножували живцюванням.

Генетична трансформація картоплі. В експериментах використовували по 100 міжвузлів кожного сорту картоплі. Трансформацію і регенерацію рослин здійснювали згідно [8] з деякими модифікаціями. Для селекції трансгенних ліній в середовище додавали 1-4 мг/л фосфінотрицину.

ПЛР аналіз. Для перевірки відсутності агробактеріальної ДНК в отриманих рослинних лініях проводили ПЛР з праймерами на *virD1*. Бактеріальний ген *virD1* розміщений поза Т-ДНК і не переноситься в рослинний геном при трансформації. Для ампліфікації фрагменту цього гена довжиною 432 п.н. використовувалися праймери *virD1*-1, 5'-ATG TCG CAA GGC AGT AAG CCC A-3' та *virD1*-2, 5'-GGA GTC TTT CAG CAT GGA GCA A-3' [9]. Для аналізу *bar* гена використали 2 пари праймерів: 1 пара — 5'-GGA ATT CAT GAG CGG AGA ATT AAG GGA GT-3' та 5'-CAG ATC TCG GTG ACG GGC AGG AC-3', які утворювали фрагмент розміром 911 пн, 2 пара — 5'-GCG GTC TGC ACC ATC GTC AAC-3' і 5'-CAG ATC TCG GTG ACG GGC AGG AC-3', які утворювали фрагмент розміром 494 п.н. Для аналізу гена *sup11A1* використовували пару праймерів 5'-GCC ACA TCG AGA ACT TCC AGA AG-3' та 5'-CTG GTG TGG AAC ATC TTG TAG ACG-3', які утворювали фрагмент розміром 502 п.н. [4].

Виділення сумарної РНК та синтез першого ланцюга кДНК. Сумарну РНК виділяли згідно методики [10]. Матеріалом були листки асептичних рослин вагою біля 200 мг. Концентрацію та чистоту препаратів РНК вимірювали на спектрофотометрі BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35.

Проведення зворотньої транскрипції. 1 мкг сумарної РНК попередньо обробленої ДНКазою I, вільною від РНКаз (Fermentas), використовувався як матриця для синтезу першого ланцюга кДНК (зворотнього транскрипту). Синтез проводили за допомогою спеціалізованого набору реактивів компанії Fermentas (#K1612) за

інструкцією фірми-виробника. Для кожної проби РНК проводили дві паралельні реакції — у присутності і у відсутності (негативний контроль) зворотної транскриптази M-MuLV. Для наступної ампліфікації застосовували ті ж самі специфічні до кодуєчої частини гена *cup11A1* цитохрому P450_{scs} праймери, які давали фрагмент розміром 502 п.н.

Результати та обговорення

В результаті експериментів згідно методики [8] трансгенні рослини отримані не були. Спостерігали швидке почорніння експлантів і їх загибель, а також неконтрольований ріст агробактерій. В подальших експериментах використали по 100 експлантів картоплі сортів Луговська і Слов'янка. Обробка експлантів агробактерією здійснювалася так, як і в попередніх експериментах, але була докорінно змінена система селекції трансгенних клітин. Була використана багатоступінчаста система селекції трансгенних клітин, яку здійснювали шляхом поступового підвищення концентрації фосфінотрицину (перші 2 місяці культивування — 1 мг/л, III-IV місяці — 2 мг/л, і надалі — 4 мг/л), нітрату амонію (від 0 до 1,65 г/л) в живильному середовищі (в перший місяць — повна відсутність нітрату амонію в середовищі, II місяць — 1-10 % від концентрації в середовищі МС, III місяць — 50 % від концентрації в середовищі МС, надалі вирощування на середовищі МС (100 %) та збільшенням освітленості експлантів від темряви по повноцінного освітлення (I місяць — темрява, II місяць — розсіяне світло, надалі повне освітлення). Через 5-6 місяців селекції було регенеровано 8 трансгенних рослин картоплі сорту Луговська. 4 із 8 рослин мали аномальну морфологію: утворювали багато пагонів і погано вкорінювалося. Це було добре помітно навіть в умовах *in vitro*. Можливо ці аномалії зв'язані зі зміною гормонального статусу рослин. Остаточні висновки можна буде зробити після вирощування всіх рослин в ґрунті, хромосомного аналізу і більш детального молекулярно-біологічного аналізу всіх рослин.

ПЛР-аналіз на *vir*-район *A. tumefaciens* був негативним для всіх 8 трансгенних рослин, що свідчить про відсутність у них агробактеріального забруднення. Проведений ПЛР-аналіз на ген *bar* з використанням 2 пар праймерів та на ген *cup11A1* цитохрому P450_{scs} з використанням 1 пари праймерів підтвердив інтеграцію цих генів в геном всіх 8 отриманих трансформованих рослин (Рис. 1). Для аналізу експресії *cup11A1* гена на рівні РНК були взяті 2 трансгенні рослини з нормальною морфологією. Аналіз показав наявність мРНК гена *cup11A1* в обох рослинах (Рис. 2), що свідчить про активну транскрипцію. В подальшому планується провести дослідження на виявлення білкового продукту гена.

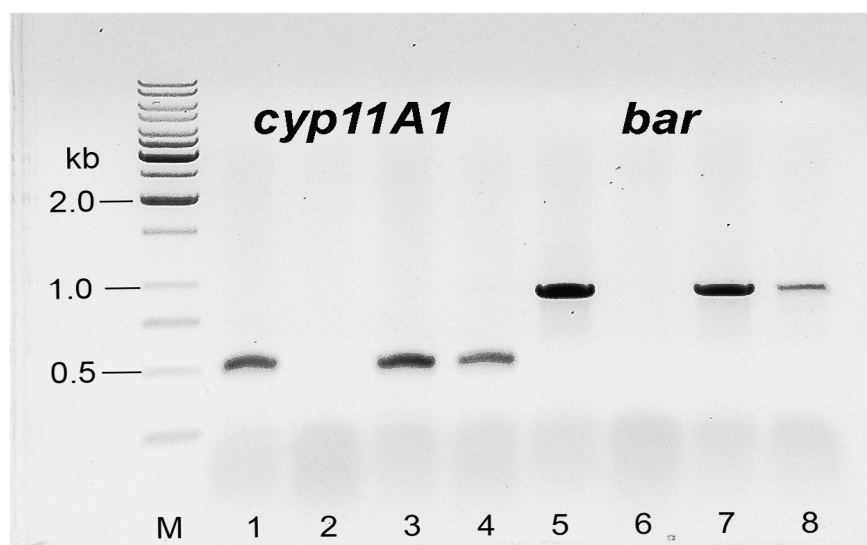


Рис. 1. Результаты ПЛР-анализу на гены *bar* та *cyp11A1* растений картофеля сорта Луговська, трансформированных штамом рСВ093: М — ДНК маркер, 1, 5 — плазмидна ДНК в якості позитивного контролю, 3-4, 7-8 — загальна ДНК трансформированных растений картофеля клонів 1 і 2

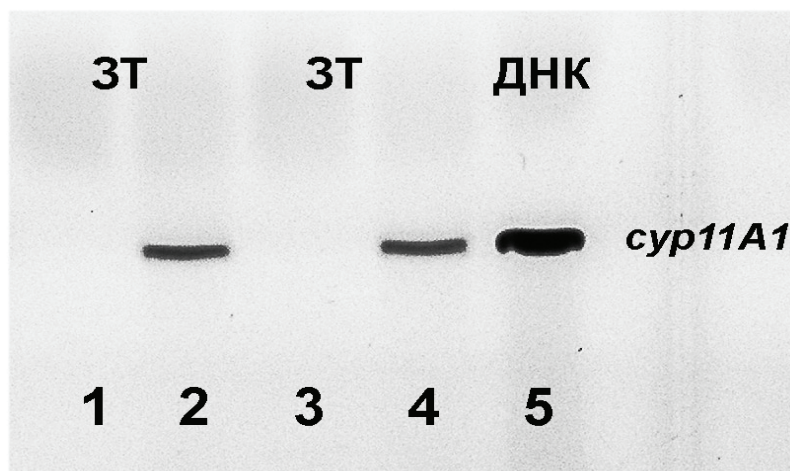


Рис 2. Аналіз зворотних транскриптів (ЗТ) і геномної ДНК (ДНК) рослин картоплі на ген *cyp11A1*: 1, 3 — РНК трансгенних рослин № 5 і 8 без додання зворотної транскриптази в якості негативного контролю; 2, 4 — ЗТ з РНК трансгенних рослин № 5 і 8 відповідно; 5 — геномна ДНК трансформованої рослини

Висновки

Проведено генетичну трансформацію конструкцією з генами *bar* і *cyp11A1*. Регеновано 8 рослин картоплі вдосконалим методом поступового підвищення концентрації фосфінотрицину і нітрату амонію в живильному середовищі. Хоча фенотипічно рослини різняться, проте було показано, що усі вони інтегрували ген *bar* (стійкість до фосфінотрицину) та ген *cyp11A1* цитохрому Р450_{scs}. Молекулярний аналіз 2 рослин підтвердив транскрипцію гена цитохрому Р450_{scs}.

Література

1. De Block M., Botterman J., Vandewiele, M., Dockx J., Thoen, C., Gosselé, V., Movva N., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme // EMBO J. — 1987. — vol. 6. № 9.— P.2513-2518.
2. Ylstra B., Touraev A., Brinkmann A. O., Heberle-Bors E., Tunen AJV. Steroid hormones stimulate germination and tube growth of *in vitro* matured tobacco pollen // Plant Physiology. — 1995.— vol. 107, № 2. — P.639-643.
3. Бердичевец І.Н., Манешина Т.В., Ярмолинский Д.Г., Спивак С.Г., Шпаковский Г.В., Картель Н.А. Трансформация растений табака рекомбинантной плазмидой рGBP450f экспрессирующей кДНК *cyp11A1* цитохрома Р450_{scs} из коры надпочечников быка // Международная конференция «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». — Минск. — 2004.
4. Спивак С.Г. Бердичевец І.Н., Картель Н.А. Трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *cyp11A1* цитохрома Р450_{scs} животного происхождения // Фактори експериментальної еволюції організмів. — Київ. — 2006. — С.639-644.
5. Спивак С.Г., Морозова Е.В., Бердичевец І.Н., Картель Н.А. Влияние экспрессии гена *cyp11A1* цитохрома Р450_{scs} животного происхождения на гормональный статус и фенотип растений табака *Nicotiana tabacum* L. // Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве. — Київ. — 2007.— С.72.
6. Yamada T., Ohashi Y., Ohshima M., Inui H., Shiota N., Ohkawa H., Ohkawa Y. Inducible cross-tolerance to herbicides in transgenic potato plants with the rat *cyp1A1* gene //Theor. Appl. Genet. — 2002. — vol. 104. № 2-3.— P.308-314.

7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — vol. 15, № 3. — P.473-497.

8. Beaujean A., Sangwan R.S., Lecardonnel A., Sangwan-Norreel B.S. *Agrobacterium*-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: an efficient protocol of transformation // *J. Exp. Bot.* — 1998. — vol. 49, № 326. — P.1589-1595.

9. K.H. Lipp João, Brown T.A. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^r::pGSFR1161 in the presence of acetosyringone // *Plant Cell Rep.* — 1993. — vol. 12, № 7-8. — P.422-425.

10. Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // *Anal. Biochem.* — 1987.— vol. 163, № 1. — P.16-20.

Резюме Отримано 8 трансгенних ліній картоплі сорту Луговська після *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації штамом, що несе ген *bar* та ген *cyp11A1* цитохрому P450_{scc} кори надниркових залоз бика. 4 із 8 рослин мали аномальну морфологію. Проведений ПЛР-аналіз на гени *bar* і *cyp11A1* підтвердив інтеграцію цих генів в геном всіх отриманих трансформованих ліній. Транскрипція гена *cyp11A1* підтверджена ПЛР аналізом зворотних транскриптів.

Получено 8 трансгенных линий картофеля сорта Луговская после *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации штаммом, несущим ген *bar* и ген *cyp11A1* цитохрома P450_{scc} из коры надпочечников быка. 4 из 8 растений имели аномальную морфологию. Проведенный ПЦР-анализ на гены *bar* и *cyp11A1* подтвердил интеграцию этих генов в геном всех полученных трансформованных линий. Транскрипция гена *cyp11A1* подтверждена ПЦР-анализом обратных транскриптов.

Eight PPT-resistant potato lines were obtained after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation with a gene construct carrying *bar* gene and *cyp11A1* gene of cytochrome P450_{scc} from bovine adrenal cortex. Four out of eight plants had abnormal morphology. Integration of foreign genes in genome for all plants was confirmed by PCR analysis. Transcription of *cyp11A1* gene was confirmed by RT-PCR analysis.

САХНО Л.А., МОРГУН Б.В., КИЩЕНКО Е.М., КУЧУК Н.В.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

Украина, 03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 148, e-mail: sakhno2007@ukr.net

НАСЛЕДОВАНИЕ ВВЕДЕННЫХ ГЕНОВ *BAR* И *CYP11A1* ЦИТОХРОМА P450_{scc} ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В T₁ ПОКОЛЕНИИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА И РАПСА

В последние годы возрастает интерес к введению различных генов цитохрома P450 животного происхождения в геном растений. Это связано с возможностью получения растений с новыми ценными характеристиками: устойчивостью к гербицидам и способностью к ремедиации почв и воздуха за счёт экспрессии генов, участвующих у млекопитающих в метаболизме ксенобиотиков (*cyp1A1*, *cyp2B6*, *cyp2C19*, *cyp2E1*) [1,2,3], а также ускорению темпов роста благодаря синтезу не присущих растительным тканям биологически-активных молекул (*cyp11A1*) [4]. Растения риса [1] способны расти на почвах, содержащих атразин и метолахлор, и накапливать их, очищая почву. Картофель с активным геном *cyp1A1*, полученным из печени крысы, демонстрирует устойчивость к гербицидам хлортолуруну и метабензтиазуруну [2]. Тополя, экспрессирующие ген *cyp2E1* цитохрома P450 из печени кролика, способны поглощать такие ядовитые вещества, как трихлорэтилен,

винилхлорид, четырёххлористый углерод, хлороформ и бензен [3], благотворно влияя на состояние почв и воздуха.

В экспериментах с табаком было показано, что трансгенные растения, в ядро которых был интегрирован ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения, опережают контрольные в среднем на две недели по темпам роста и развития [4]. Наблюдаемый фенотипический эффект авторы объясняют влиянием новых биологически-активных стероидных веществ, не характерных для растений дикого типа. Сокращение периода вегетации и возможность более раннего сбора урожая, в том числе рапса и табака, важны для сельхозпроизводителей.

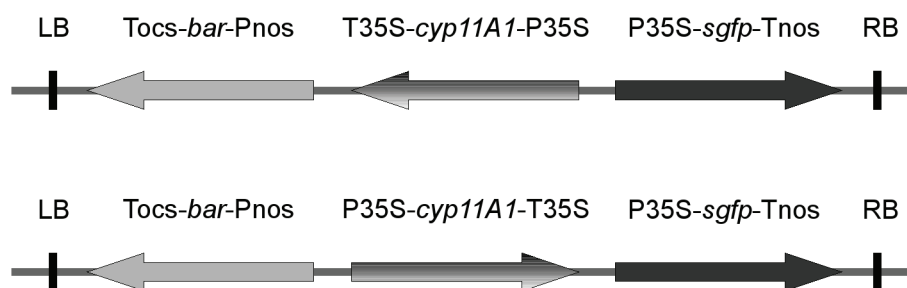
Целью данной работы было получение растений табака и рапса, несущих в ядерном геноме ген *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка, и анализ наследования в первом поколении трансформантов.

Материалы и методы

Растительный материал. В качестве исходного материала использовали поддерживаемые в условиях *in vitro* растения ярового рапса (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) следующих промышленных сортов: Калиновский и Мария селекции Национального аграрного университета УААН, Магнат (селекция РУП «Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию»), а также растения табака *Nicotiana tabacum* сортов Wisconsin и Petite Havana.

Agrobacterium tumefaciens-опосредованная трансформация рапса и табака. Трансформацию рапса проводили согласно методике, разработанной нами ранее [5], регенерацию трансгенных растений табака получали по общепринятой методике [6]. Селекцию растений проводили в присутствии в средах фосфинотрицина (PPT, 5 мг/л).

Плазмиды и бактериальный штамм. В качестве донора гена *sup11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка использовалась плаزمида pGBP450f, полученная из Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Бинарный вектор pICH5290 служил реципиентом гена *sup11A1* и основой для двух генетических конструкций - pCB092 и pCB093. Использовались компетентные клетки *Escherichia coli* штамма XL-1 Blue (Stratagene), а трансформация осуществлялись общепринятым химическим методом [7]. Для работы с растительными тканями использовался



Agrobacterium tumefaciens штамм GV3101.

Рис. Схематическая карта генетических конструкций pCB092 (вверху) и pCB093 (внизу). Экспрессирующие кассеты указаны с промоторами (P) и терминаторами (T)

Анализ полученных растительных линий с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для подтверждения введения генов *bar* и *sup11A1* анализировали тотальную ДНК регенерированных растений с помощью реакций амплификации с праймерами 5'-GGA ATT CAT GAG CGG AGA ATT AAG GGA GT-3' и 5'-CAG ATC TCG GTG ACG GGC AGG AC-3', с которыми синтезируется фрагмент размером 910 пн (*bar*), и 5'-GCC ACA TCG AGA ACT TCC AGA AG-3' и 5'-CTG GTG TGG AAC ATC TTG TAG ACG-3', дающие фрагмент размером 502 пн (*sup11A1*) [4]. Для проверки отсутствия агробактериальной ДНК в полученных растительных линиях проводили ПЦР с праймерами на *virD1*. Для амплификации фрагмента этого гена длиной 432 пн использовали праймеры *virD1*-1, 5'-ATG TCG CAA GGC AGT AAG CCC A-3' и *virD1*-

2, 5'-GGA GTC TTT CAG CAT GGA GCA A-3' [8]. Для реакции брали 200 нг геномной ДНК каждого образца, по 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,2 мкМ смеси четырёх дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 1 единицу Taq полимеразы в однократном реакционном буфере. Общий объем смеси составлял 20 мкл. Программа амплификации была следующей: денатурация 94 °С, 4 мин; 35 циклов — 56 °С 1 мин; 72 °С, 20 сек; 94 °С, 30 сек; заключительный цикл — 10 мин при 72 °С.

Определение количества растворимого белка в листьях рапса. Для анализа количества белка в листьях растений рапса, поддерживаемых в асептической культуре, применяли микрометод Бредфорда [9]. Для экстракции белков использовали тройной объем 100 мМ Tris-Cl буфера (рН 8,0), содержащего 5 мМ Na₂EDTA, 100 мМ NaCl, 10 мМ β-меркаптоэтанола и 2,5 % поливинилпирролидона. Анализ проводили на спектрофотометре BioPhotometer (Eppendorf) v.1.35.

Статистическая обработка результатов проводилась оценкой разности средних (*t*-критерий Стьюдента) при сравнении количеств белка и определением критерия χ^2 при расщеплении в T₁ поколении трансформантов согласно [10].

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов по трансформации листовых дисков с использованием двух генетических конструкций получено 46 независимых фосфинотрициностойчивых линий рапса трёх промышленных яровых сортов (6 линий, вектор pCB092, с использованием сорта Калиновский, 7 и 11 линий, вектор pCB093, с использованием сортов Мария и Магнат, соответственно) и 29 линий табака двух сортов (9 и 11 линий, вектор pCB092, с использованием сортов Wisconsin и Petite Havana, соответственно, и 8 линий, вектор pCB093, с использованием сорта Petite Havana). Интеграция целевого гена *cup11A1* и селективного гена *bar* показана с помощью ПЦР для 24-х из 28-ми проанализированных линий рапса и всех линий табака. С помощью реакции амплификации с праймерами на ген *virD1* показано отсутствие бактериального заражения полученных трансформантов.

Трансгенные растения табака были высажены в почву в условиях теплицы. Оказалось, что при самоопылении семена завязываются у всех растений, полученных в результате экспериментов с вектором pCB093, и только у двух из 10, регенерировавших и образовавших цветки в опытах с использованием вектора pCB092. При опылении трансформанта pCB092/A6 пыльцой растения дикого типа семена завязались. Возможно, нарушение пыльцеобразования связано с особенностями конструкции (взаиморасположение генов в T-ДНК, **рис.**).

Растения пяти линий рапса также были перенесены в грунт в условиях теплицы. В результате самоопыления получены жизнеспособные семена. Проростки анализировались *in vitro* на устойчивость к фосфинотрицину (**табл.**). У отобранных линий поколения T₁, растущих в присутствии 10 мг/л PPT *in vitro*, при анализе с помощью ПЦР показано наличие введенных генов *bar* и *cup11A1*.

Табл. Характеристика T₁ поколения трансформантов рапса (сорт Мария, вектор pCB093)

Линия	Масса 1000 семян, г	Всхожесть <i>in vitro</i> , %	Количество растений		Расщепление	χ^2
			PPT ⁺	PPT ⁻		
Vn12/93/1	3,213	99	73	26	3:1	0,12
Vn12/93/2	3,118	96	73	23	3:1	0,13
Vn12/93/11	3,209	94	72	22	3:1	0,13
Vn12/93/12	3,188	98	72	26	3:1	0,12
Vn12/93/14	3,257	90	68	22	3:1	0,01
Vn12 (контроль)	3,249	96	-	96	-	-

При определении количества растворимых белков в листьях исходных растений рапса, трансформантов T₀ и T₁, культивируемых в асептических условиях, оказалось, что различия не являются статистически достоверными (результаты не представлены). В публикации [11] сообщалось, что уровень белка в листьях трансформированных растений табака, несущих ген *cyp11A1* и полученных в результате ПЭГ-опосредованной трансформации протопластов, значительно увеличивался. Возможно, расхождения в наших результатах связаны с особенностями использованных растительных культур, способах введения ДНК в растения и/или особенностями экспрессии введенного целевого гена.

Выводы. С использованием сконструированных нами генетических конструкций, несущих гены *bar* и *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка, в результате *A.tumefaciens*-опосредованной трансформации листовых дисков получено 46 независимых РРТ устойчивых линий рапса трёх промышленных яровых сортов и 29 линий табака двух сортов. Показано, что введенные гены наследуются, и расщепление в первом поколении трансформантов *V.napus* при самоопылении близко к 3:1. Различия в накоплении растворимых белков листьями исходных растений рапса, трансформантов T₀ и T₁, культивируемых в асептических условиях, не являются статистически достоверными.

Литература

1. Kawahigashi H., Hirose S., et al. Transgenic rice plants expressing human P450 genes involved in xenobiotic metabolism for phytoremediation // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2008. - V. 15, N.2-3. – P. 212 – 219.
2. Yamada T., Ohashi Y., et al. Inducible cross-tolerance to herbicides in transgenic potato plants with the *cyp11A1* gene // Theor. Appl. Genet. – 2002. – V. 104. – P. 308 – 314.
3. Doty S.L., James C.A., et al. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees // PNAS. - 2007. – V.104, N. 43. – P.16816 – 16821.
4. С.Г. Спивак, И.Н. Бердичевец, Н.А. Картель. Трансгенные растения табака, экспрессирующие ген *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К., 2006. – С.639-644.
5. Спосіб отримання трансформованих рослин ріпаку методом агробактеріальної трансформації / Гочева Є.А., Сахно Л.А. Кучук М.В. // Патент України на корисну модель № 39205. – Публ. 10.02.2009, бюл. № 3.
6. Horsch R.B., Fraley R.T., et al. Inheritance of functional foreign genes in plants // Science. - 1984. – V. 223. – P. 496–498.
7. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual / Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. - Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1989.- 1500 p.
8. Lipp Joao K.H. Enhanced transformation of tomato co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* C58 C1 Rif^r:pGSFR1161 in the presence of acetosyringone // Plant Cell Rep. - 1993. - V. 12. - P. 422-425.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal.Biochem. – 1976. – V.72, N 2. – P.248 – 254.
10. Лакін Г.Ф. Биометрия // М.: Высш.школа. – 1990. – 352 с.
11. С.Г. Спивак, Морозова Е.В. и др. Влияние экспрессии гена *CYP11A1* цитохрома P450_{SCC} животного происхождения на гормональный статус и фенотип растений табака *Nicotiana tabacum* L. // Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве. – Киев. – 2007. – С.72 -73.

Резюме

В результате *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации листовых дисков с использованием генетических конструкций, несущих гены *bar* и *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} из митохондрий коры надпочечников быка, получено 46 независимых фосфинотрицинустойчивых линий рапса трёх промышленных яровых

сортов и 29 линий табака двух сортов. Интеграция чужеродных генов подтверждена с помощью ПЦР. Показано, что расщепление по введенным генам в первом поколении трансформантов при самоопылении составляет 3:1. Различия в накоплении растворимых белков листьями исходных растений рапса, трансформантов T₀ и T₁, культивируемых в асептических условиях, не являются статистически достоверными.

В результаті *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації листових дисків з використанням генетичних конструкцій, що несуть гени *bar* і *cyp11A1* цитохрома P450_{SCC} з мітохондрій кори надниркових залоз бика, отримано 46 незалежних фосфінотрицистинстійких ліній ріпаку трьох промислових ярих сортів і ліній тютюну двох сортів. Інтеграцію чужорідних генів підтверджено за допомогою ПЛР. Показано, що розщеплення по введеним генам в першому поколінні трансформантів за умов самозапилення становить 3:1. Відмінності в накопиченні розчинних білків листям вихідних рослин ріпаку, трансформантів T₀ і T₁, які культивуються в асептичних умовах, не є статистично достовірними.

Forty six independent PPT-resistant lines of three Ukrainian commercial rapeseed varieties and twenty nine lines of two *Nicotiana tabacum* varieties were obtained as a result of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leaf disks with gene constructs carrying *bar* gene and *cyp11A1* cytochrome P450_{SCC} gene from bovine adrenal cortex. Integration of the foreign genes was confirmed by PCR analysis. The self-pollinated first transgenic progeny demonstrated segregation of the introduced genes as 3:1. The difference among parent rapeseed plants, T₀ and T₁ transformants cultivated under aseptic conditions concerning total soluble protein in leaves was not statistically significant.

СЕРГЕЕВА Л.Е.,¹ ПОРЕЦКАЯ Е.И.,¹ ГАМАЛЕЙ В.И.²

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины,
Украина, 03022, Киев, ул. Васильковская 31/17, e-mail: e.poretskaya@gmail.com

²Институт земледелия УААН,
Украина, 08162, Киевская обл., п.г.т. Чабаны, ул. Машиностроительная, 2Б

ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ У СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА, ОТОБРАННЫХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ БАРИЯ

Растущее с годами число публикаций, посвященных различным аспектам солевого стресса и солеустойчивости, подтверждает постулат о фундаментальности и сложности поставленной проблемы. Выявление физиологических корреляционных взаимосвязей, расшифровка генетических механизмов устойчивости, однако, не увеличили количества полученных растительных форм, которые бы демонстрировали выдающиеся показатели солеустойчивости. Не упростились и сами методы их получения. Очевидна потребность поиска новых гипотез, подходов, методов.

Явление солеустойчивости достоверно связывают с поддержанием баланса катионов калия и натрия. Также было установлено, что ионы тяжелых металлов, воздействуя на мембранные системы переноса ионов калия, препятствуют его выведению из клетки [10,18]. В связи с вышеизложенным была высказана идея и разработан способ получения солеустойчивых клеточных линий растений с использованием селективных сред, содержащих ионы тяжелого металла бария [5]. Отобранные таким образом клеточные клоны табака оказались устойчивыми не только к селектирующему стрессору, но и к 20 г/л солей морской воды либо сульфата натрия.

В основе такого феномена комплексной устойчивости логично было ожидать установление стабильного уровня ионов K^+ .

Основной причиной, вызывающей ингибирование роста растений при солевом стрессе (кроме снижения водного потенциала), является избыток ионов Na^+ , которые не требуются гликофитам для нормального роста [9,14]. На клеточном уровне одним из наиболее опасных последствий солевого стресса является поступление Na^+ и снижение уровня K^+ .

Табак является классическим гликофитом. Поэтому проанализировать соотношение ионов K^+/Na^+ в клетках каллусной культуры табака, устойчивой к стрессорам, воздействующим на гомеостаз K^+ , представлялось не только целесообразным, но и необходимым. Рис.1 отображает баланс ионов K^+ и Na^+ в каллусе при его выращивании на селективных средах, содержащих стрессовые агенты, в концентрациях летальных для клеточных культур дикого типа.

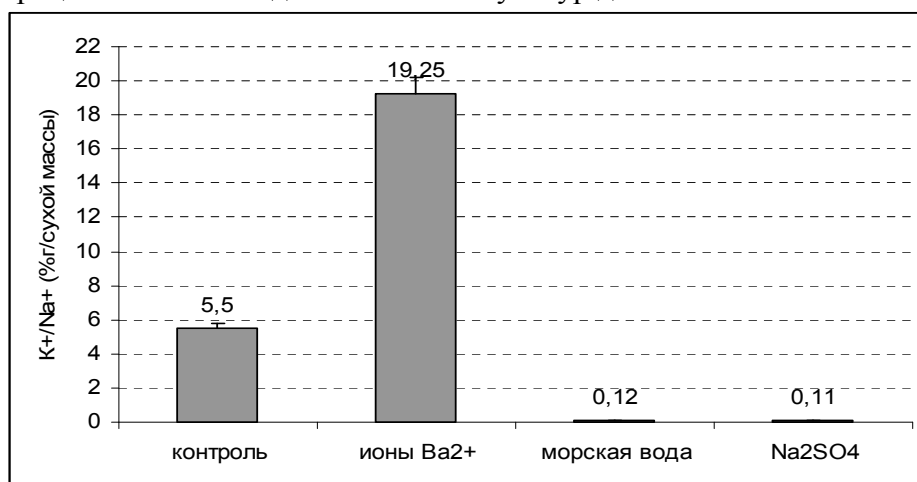


Рис.1. Соотношение K^+/Na^+ у устойчивых клеточных линий табака

Очевидна зависимость содержания ионов от среды культивирования. Соотношение K^+/Na^+ было максимальным в присутствии ионов бария и минимальным при засолении (при этом тип засоления не имел существенного значения).

Транспорт ионов K^+ осуществляется путем активного их переноса по K^+ -каналам. Исследуя работу каналов поступления K^+ протопластов пыльцы *Brassica sinensis* Л.-М. Фан с соав. отмечали, что с увеличением электроотрицательности мембранного потенциала с -58 мВ до величин более отрицательных чем -100 мВ (-180 мВ) поступление K^+ повышалось. Однако добавление 1мМ либо 100мМ Ba^{2+} ингибировало транспорт K^+ даже при максимальной (-180 мВ) электроотрицательности каналов [8]. Этим свойством отличаются и ионы цезия. Ионы Cs^+ ингибировали поглощение ионов калия и их перенос из корней в наземную часть у галофита солончаковой травы [15]. В других публикациях отмечали, что ионы Ba^{2+} ограничивают поступление и других ионов [3,11].

В нашем случае наблюдалось обратное событие. Ионы Ba^{2+} (присутствовавшие в летальных концентрациях) не только не ингибировали процесс поступления ионов K^+ , но даже стимулировали его, поскольку уровень K^+ в каллусе, растущем на данной селективной среде был выше этого показателя в норме.

При культивировании устойчивых клеточных линий табака при засолении было отмечено снижение содержания в клетках ионов K^+ и существенное увеличение Na^+ . На это событие указывали и другие авторы. Так накопление ионов Na^+ во внутриклеточном пространстве у солероса *Atriplex triangularis* при солевом стрессе К. Бу с соав. считали защитной реакцией, способствующей противостоять осмотическому стрессу. Более того, этот процесс, по мнению авторов, играл более существенную роль в солеустойчивости растения чем компартментация соли в солевых полостях [7]. При

сравнении адаптации к NaCl различающихся по солеустойчивости генотипов кукурузы отмечалось, что рост уровня Na^+ и снижение содержания K^+ и Ca^{2+} было более значимым у устойчивого генотипа [12]. Однако, кроме этих и аналогичных публикаций имеются и обратные свидетельства. Они указывают на то, что солеустойчивые растения могут удерживать баланс K^+/Na^+ при засолении [15,1,2].

Ранее при изучении солеустойчивых клеточных линий табака, культивируемых в присутствии солей морской воды или Na_2SO_4 , мы наблюдали увеличение содержания ионов Na^+ , которое, однако, было меньшим чем у клеточной культуры дикого типа [4]. Одновременно с накоплением этих катионов в каллусе существенно возрастал уровень свободного пролина. В результате реализации обоих событий происходило выравнивание осмотического давления вне и внутри клетки, за счет чего и обеспечивалась жизнеспособность солеустойчивых линий табака. Прямую корреляцию между содержанием ионов Na^+ и пролина выявили и другие авторы [15,19]. У отобранных линий табака также измеряли содержание свободного пролина при культивировании в различных стрессовых условиях (Рис.2). Видно, что уровень аминокислоты в каллусах, культивируемых на селективных средах с ионами Ba^{2+} и Na_2SO_4 , сходны и существенно не отличаются от ее содержания в клетках, которые росли в нормальных условиях. Тогда как при переносе культуры на среду с солями морской воды содержание пролина возрастало (более чем в 10 раз относительно этого параметра, измеренного в отсутствие действия стрессового фактора).

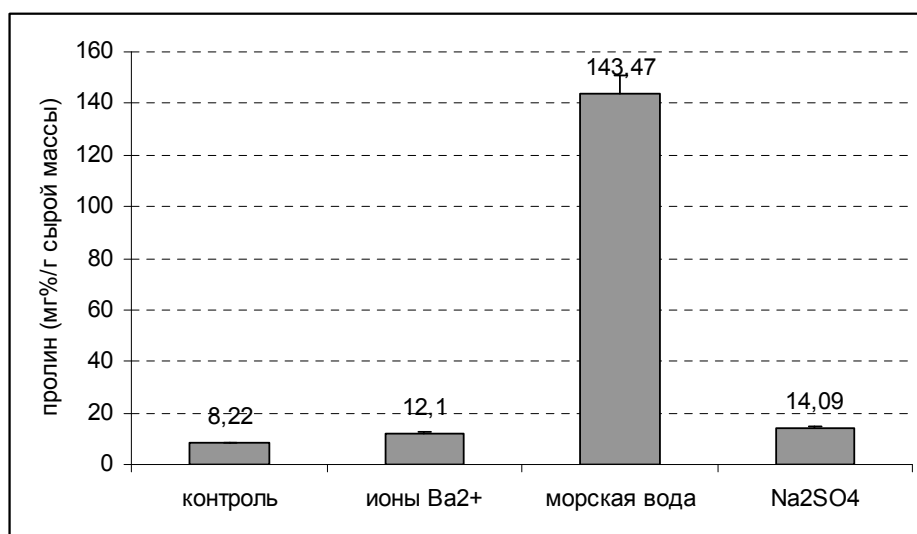


Рис.2. Содержание свободного пролина у устойчивых клеточных линий табака. Среднее значение трех биологических повторностей, измеренное в конце отдельного пассажа (28 день)

Очевидно, что на определенном этапе у Ba -устойчивых клеточных линий при выращивании на солевом фоне реализуются различные анион-зависимые механизмы их детоксикации. Поскольку, как указывалось выше, ионы Ba^{2+} являются блокаторами K^+ каналов, логично предположить, что в результате клеточной селекции отбираются клоны с повышенной энергией транспорта ионов. В пользу этого феномена свидетельствует увеличение содержания K^+ в клетках, растущих в присутствии Ba^{2+} . С другой стороны рост клеток при значительных экзогенных концентрациях ионов Na^+ указывает на их быстрое удаление из цитозоля с помощью транспортеров плазматической и вакуолярной мембран. Далее для выравнивания осмотического баланса накопление ионов должно обязательно компенсироваться увеличением

содержания осмолитов цитоплазмы. При выращивании на среде с солями морской воды таким соединением является пролин. В случае альтернативного сульфатного засоления, когда уровень пролина невысок, накапливаются, скорее всего, другие осмолиты. Ими могут быть глицинбетаин, свободные сахара, глицерин. О том, что их сверхсинтез может компенсировать осмотический разбаланс неоднократно отмечалось ранее. Не исключена также реализация других механизмов устойчивости. По нашему мнению осморегуляция у устойчивых клеточных линий, культивированных на солевом фоне, осуществляется следующим образом. Засоление любого типа является источником избытка гидратированных ионов Na^+ . Вследствие подобия между радиусами гидратированных ионов Na^+ (1,65-2,05 Å) и K^+ (2,35-2,66 Å) между катионами создается конкуренция [6]. Далее ионы Na^+ начинают поступать внутрь клетки. Механизмы этого процесса еще не ясны, однако есть основания считать, что низкая аффинность и проницаемость для Na^+ и K^+ -транспортных систем (например LCT1 и НКТ1) могут способствовать переносу Na^+ [17]. В нашем случае (как указывалось выше) транспорт K^+ усилен, поэтому не исключена вероятность активации поступления и ионов Na^+ . Поступив в клетку, Na^+ индуцирует экспрессию гена мембранной АТФ-азы [13]. За этим следует активное удаление Na^+ из цитозоля. Осмотическое давление в клетке изменяется. Восстановление баланса происходит за счет увеличения уровня осмолитов.

Интегральным показателем устойчивости растительного организма всегда выступает его рост и развитие (увеличение биомассы, других биометрических показателей) в условиях стрессового давления. Если рост биологической системы при действии различных стрессовых факторов обеспечивается за счет «включения» различных механизмов устойчивости, это может свидетельствовать в пользу активности ее генома и может быть основой для установления новых детерминант устойчивости.

Литература

1. *Ершов П.В., Решетова О.С., Трофимова М.С., и др.* Активность ионных транспортеров и солеустойчивость ячменя // Физиология растений. – 2005. – 52, №6. – С.867-875
2. *Леонова Т.Г., Гончарова Э.А., Ходоренко А.В., и др.* Солеустойчивые и солечувствительные сорта ячменя и их характеристика // Физиология растений. – 2005. – 52, №6. – С.876-881
3. *Николаев Б.А., Алексеева В.Я., Гордон Л.Х.* Влияние ионов лития на рост корней пшеницы и роль фосфоинозитидного цикла в регуляции ростовых процессов // Цитология. – 2001. – 43, №10. – С.969-974
4. *Сергеева Л.Е., Мартыненко А.И.* Осморегулирование у клеточных линий табака, устойчивых к солевому стрессу // Физиология и биохимия культ. растений. – 1993. – 25, №6. – С.587-591
5. *Сергеева Л.Е.* Новая селективная среда с ионами бария – альтернативная система для отбора солеустойчивых клеточных линий // Биотехнология. – 2002, №2. – С.47-51
6. *Biggin P.C., Smith G.R., Shrivastava et al.* Potassium and sodium ions in a potassium channel studied by molecular dynamics simulations // Biochim. et Bioph. Acta. – 2001. – 1510. – P.1-9
7. *Bu Q., Bai X., Zhu J., et al.* Накопление и распределение соли в листьях *Atriplex triangularis* при солевом стрессе // Jingyong ju huanjing shengum xuebao = Chin.J. Appl. And Environ. Biol. – 2007. – 13, №2. – С.192-195
8. *Fan L.M., Wu W.H., Yang H.-Y.* Identification and characterization of the inward K^+ channel in the plasma membrane of Brassica pollen protoplasts // Plant and Cell Physiology. – 1999. – 40, №8. – P.859-865
9. *Greenway H., Munns R.* Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes // Annual Review of Plant Physiol. – 1980. – 31. – P.149-190

10. *Lefebvre D.D.* Increased potassium absorption confers resistance to group 1A cations in rubidium-selected suspension cells of *Brassica napus*// *Plant Physiol.* – 1989. – 91, №4. – P. 1460-1466
11. *Li L.G., Jin K.D., Yan J.Q., et al.* Salt-adaptive mechanisms of K⁺-channel in plasma membrane of tobacco callus // *Chinese Science Bulletin.* – 1996. – 4. – P.1707-1711
12. *Mansour M. M. F., Salama K.H.A., Ali F.Z.M., et al.* Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance // *Gen and Appl. Plant Physiol.* – 2005. – 31, №1-2. – P.29-41
13. *Niu X., Zhu J.K., Narasimhan M.L. et al.* NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte // *Plant Physiol.*–1993.– 103.–P.713-718
14. *Niu X., Bressan R.A., Hasegawa P.M., et al.* Ion homeostasis in NaCl stress environments // *Plant Physiology.* – 1995. – 109.– P.735-742
15. *Peng Y.H., Zhu Y.-E., Mao Y.-Q., et al.* Alkali grass resists salt stress through high [K⁺] and endodermis barrier to Na⁺//*Journ. of Exper. Bot.*–2006.–55, №398.–P.939-949
16. *Qiu L.-Z., Huang Y.-J., Huang J.-Q., et al.* Сравнительное изучение вегетационных и физиологических характеристик различных солетолерантных растений при солевом стрессе // *Zhejiang daxue xuebao. Nongye yushengming kexue ban = J. Zhejiang Univ. Agr. And Life Sci.* – 2006. – 32, №4. – C.420-427
17. *Rus A., Yokoi S., Sharkhuu A. et al.* AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁺ entry into plant roots // *Proc. Nat. Acad. Sciences USA.* – 2001. – 98. – P.14150-14155
18. *Strang J., Macnair M.R.* Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance of *Mimulus guttatus* Fischer ex DC // *New Phytol.* – 1999. – P.383-388
19. *Tani C., Sasakawa H.* Proline accumulates in *Casuarina equisetifolia* seedlings under salt stress // *Soil Sci. and Plant Nutr.* – 2006. – 52, №1. – P.21-25

Резюме

Методом клеточной селекции получены клеточные линии табака, устойчивые к ионам бария. Эти линии росли на средах, содержавших 20 г/л солей морской воды либо Na₂SO₄. При культивировании каллуса на среде с ионами Ba²⁺ устойчивые линии накапливали ионы K⁺. При культивировании на любом солевом фоне у этих линий отмечали снижение содержания ионов K⁺ и накопление ионов Na⁺. В клетках, растущих в присутствии солей морской воды, возрастал уровень свободного пролина, тогда как при выращивании каллуса на средах с ионами Ba²⁺, Na₂SO₄ либо в нормальных условиях этот параметр существенно не различался.

Методом клітинної селекції отримані клітинні лінії тютюну, стійкі до іонів барію. Ці лінії росли на середовищах, що містили 20 г/л солей морської води або Na₂SO₄. При культивуванні калусу на середовищі з іонами Ba²⁺ стійкі лінії нагромаджували іони K⁺. При культивуванні за умов будь-якого типу засолення у цих ліній відмічали зниження вмісту іонів K⁺ та збільшення іонів Na⁺. В клітинах, які росли в присутності солей морської води, зростав рівень вільного проліну; в той же час при вирощуванні калусу на середовищах з іонами Ba²⁺, Na₂SO₄ або за нормальних умов цей параметр істотно не відрізнявся.

Tobacco cell lines, resistant to barium ions, were obtained via cell selection. These lines grew on media with the addition of 20 g/l of sea water salts or Na₂SO₄. During cultivation on the Ba-selective medium the resistant cell lines accumulated K⁺ ions. The decrease of K⁺ and increase of Na⁺ ions in calli there were observed during cultivation under any type of salinity. The free proline level rose during cell growing on the medium with the

addition of sea water salts, whereas there were no considerable differences among these parameters during cell cultivation on Ba^{2+} ; Na_2SO_4 or control media.

СУПРУН С. М., ДОНЧЕНКО Г. В., ПАРХОМЕНКО Ю.Ф., *КУРЧЕНКО И. Н., *ХАРКЕВИЧ Е.С., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Украина, 01601, Киев, ул. Леонтовича, 9, e-mail: kich@biochem.kiev.ua

**Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Украина, 03143 ул. Заболотного, 154, e-mail: irinakurchenko@ukr.net*

БИОТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНОВ, ПИЩЕВОЙ И КОРМОВОЙ ДОБАВКИ

Грибы - ценный источник природных форм биологически активных веществ, а именно: незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, витаминов, витаминоподобных веществ, таких как убихинон Q_{10} и других, обладающих свойствами антиоксидантов и антимутогенов. Тот факт, что грибной белок по своему аминокислотному составу не уступает животному, а также то, что другие важные биологически активные вещества, содержащиеся в грибах является основанием для использования грибов для получения пищевых и кормовых добавок. Биологическая ценность биомассы грибов зависит от состава клеточной стенки, остов которой составляют гликозаминогликаны, а также хитин обладающий свойством природного сорбента. Использование микромицетов позволило разработать новые биотехнологии получения липидов, витаминов, β -каротина из *Blakeslea trispora*, пищевых волокон на основе хитин-глюканового комплекса. Микромицеты являются перспективными для использования в различных отраслях народного хозяйства: сельском хозяйстве, медицине, а также в защите окружающей среды. Более того, использование микромицетов для получения витаминов представляет реальную альтернативу химическому синтезу [1-4].

Цель работы - селекция штаммов микромицетов-продуцентов витаминов, коферментов и разработка биотехнологии получения на их основе витаминно-коферментного препарата.

Материалы и методы

Нами был использован метод поэтапной селекции для отбора штаммов-продуцентов витаминов, коферментов среди различных таксономических групп микромицетов музейных культур коллекции Украины. Для получения витаминно-коферментного препарата путем совместного культивирования подобраны следующие штаммы грибов: *Fusarium sambucinum* F-10011 - продуцент витамина РР (никотиновой кислоты) и его производных, а также штамм *Penicillium sclerotiorum* 10015-продуцент β -каротина, белка. Штаммы депонированы и хранятся в коллекции культур Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Микромицеты выращивали на синтетической питательной среде Чапека с мелассой (1% по р.в.) в качестве источника углерода. Посевной материал выращивали в колбах Эрленмейера на качалках при 240 об/мин в течение 24 часов. Ферментацию проводили при глубинном культивировании в колбах или в производственных условиях на лабораторной стендовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО "Стиролбиотех". Среду для ферментации стерилизовали в автоклаве при 1–1,5 атм. в течение 30 мин и засеивали 5%-ным инокулятом. Продолжительность культивирования в лабораторных условиях составляла в зависимости от поставленных целей до 62-72 часов, а в производственных для получения препарата, с отработанной технологией процесс культивирования составлял - 42–48 часов. Получено две формы препарата - порошкообразную и жидкую (гранулированную при внесении наполнителя.). Жидкую

форму препарата получали по разработанной нами технологии с использованием термической обработки. Содержание витаминов и других биологически активных веществ в грибах и в препарате определяли с использованием методов, приведенных в справочнике по микологии [5].

- убихинон Q₁₀ — спектрофотометрически с предварительным хроматографическим разделением компонентов неомыляемых веществ [6];

- содержание хитина в биомассе по разнице количества N-ацетилглюкозамина после гидролиза соляной кислотой и производили перерасчет количества глюкозамина на хитин с использованием коэффициента 1.17 [4].

- содержание НАД определяли в аликвотах кислоторастворимого экстракта с помощью дрожжевой алкогольдегидрогеназы [7].

Витаминно-коферментный препарат был протестирован на животных: дубовом шелкопряде, рыбах, перепелах. В первом опыте использовали гусениц дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* G.-M., которых обрабатывали препаратом при разведении (1:20). Корм контрольных гусениц в соответствующие периоды обрабатывали водой.

Во втором опыте для обработки икры карпа *Ciprinus carpio* L. (0,5 кг), полученной от одной самки, 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 антисепролегниозная обработка фиолетовым "К" (в опыте обработка химическими препаратами не проводилась). В третьем опыте использовали две группы перепелов - контрольную и опытную по 90 голов каждая (45 самцов и 45 самок). В комбикорм опытной группы вводили препарат, который позволил увеличить уровень сырого протеина в комбикорме на 1,5%. Длительность опыта была 28 дней, препарат вводили, начиная с 14 дня.

Результаты и обсуждение

Предварительная селекция позволила нам отобрать несколько штаммов микромицетов, которые были перспективными продуцентами биологически активных соединений, в частности, витаминов и коферментов. Так штамм *Fusarium sambucinum* синтезировал и накапливал повышенные количества никотиновой кислоты и ее производные, коэнзима А (КоА), убихинона Q₁₀; штамм *Mycelia sterilia* (white) – тиамин и его производных, белка; *Penicillium sclerotiorum* –β-каротин и белка; *Penicillium vitale* – флавинадениндинуклеотида (ФАД). При изучении действия предшественников биосинтеза витаминов и коферментов на их конечный выход обнаружено, что введение триптофана в культуральную среду повышает выход никотиновой кислоты, а введение самой никотиновой кислоты – выход ее коферментной формы – никотинамидадениндинуклеотида (НАД). Изучены условия биосинтеза КоА и ФАД штаммами-продуцентами. При добавлении в реакционную смесь предшественников синтеза КоА и ФАД их выход значительно повышался. Отмечено, что в условиях стимуляции никотиновой кислотой синтез НАД наблюдалась интенсификация роста мицелия, а также раннее образование в культуре конидий. На бесклеточном экстракте *Fusarium sambucinum*, который выращивали в среде с ниацином и триптофаном, показано снижение в этих условиях активности пиррофосфорилазы. Изучение активности ключевых ферментов биосинтеза НАД - триптофанпирролазы и НАД-пиррофосфорилазы позволило установить существование двух путей биосинтеза НАД в клетке гриба-продуцента. Внесение в среду аденозина одного из предшественников синтеза АТФ приводило к активации НАД-пиррофосфорилазы, что стимулировало запасной путь сверхсинтеза НАД у *Fusarium sambucinum*.

Результаты проведенного исследования создали предпосылки для дальнейшей разработки биотехнологий получения отдельных витаминов с использованием

грибных штаммов-продуцентов. Грибная биомасса, обогащенная витаминами, уже сейчас может быть использована как основа для получения лечебно-профилактических препаратов.

Основываясь на изучении их физиолого-биохимических особенностей, биосинтеза отдельных витаминов, скорости роста, отсутствие антагонизма, были отобраны культуры для совместного культивирования с целью получения кормовой и пищевой добавки. Для получения витаминно-коферментного препарата подобраны культуры *Fusarium sambucinum* ИМВ F-10011-продуцента никотиновой кислоты и ее производных, продуцента кофермента КоА и белка незаменимых аминокислот (лизина и триптофана) и *Penicillium sclerotiorum* – продуцент β-каротина. Нами отработаны условия их совместного культивирования и согласно регламенту на стендовой установке Научно-технического центра производственной биотехнологии ОАО «Стиролбиотех» были наработаны партии препарата. В результате совместного культивирования в 2-3 раза увеличивается содержание исследуемых витаминов и количество белка в препарате, а также сокращаются сроки ферментации до 46 часов.

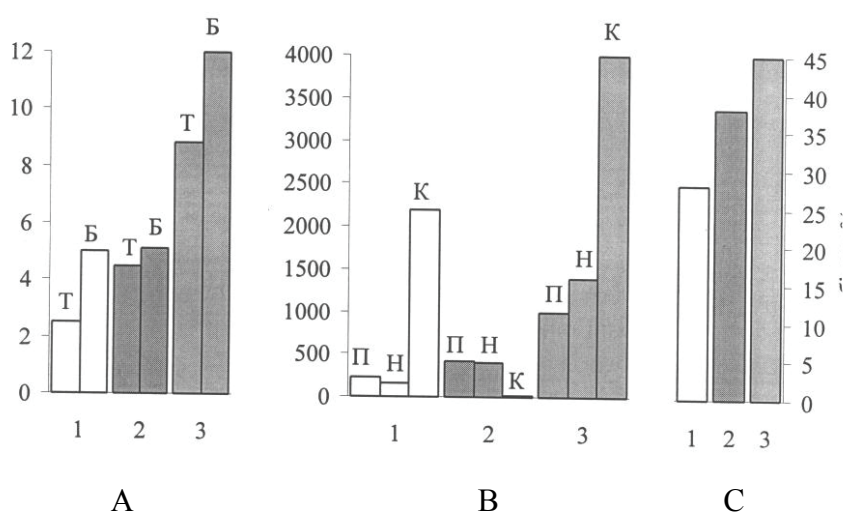


Рис. Содержание витаминов (А,В, мкг/г сухого веса) и белка (%) при моно- и совместном культивировании штаммов-продуцентов: 1-*Penicillium sclerotiorum*; 2-*Fusarium sambucinum*; 3-совместное культивирование; Т-тиамин; Б-биотин; П-пантотеновая к-та; Н-никотиновая к-та; К-каротиноиды

Полученный витаминно-коферментный препарат представляет собой комплекс природных биологически активных веществ (витаминов, коферментов, незаменимых аминокислот, микроэлементов, ненасыщенных жирных кислот). Он содержит значительное количество никотиновой кислоты и ее производных, в частности NAD (6,0 мг/г с.в.), β-каротин, тиамин, витамин Е, витамин В₁₂, фолиевую кислоту.

Данный препарат испытан в опытах на шелкопрядах, икре карпа, перепелах. Использование препарата способствовало значительному повышению жизнеспособности гусениц: на 14,8 %, массы кокона и шелковой оболочки до 11,2 % и 12,8 %, соответственно. Более того, полученный препарат позволяет защищать полезных насекомых от инвазийных (микроспориоз дубового шелкопряда) и экзогенных инфекций (ядерного полиэдроза). Применение препарата приводило к снижению заболеваемости ядерным полиэдрозом на 9–12 %.

В экспериментах по обработке икры карпа биопрепаратом было обнаружено, что выход личинок из подопытной икры в условиях тепловодного хозяйства составил около 100 %, тогда как выход в контроле не превышал 74 %. Применение витаминно-коферментного препарата повышает процент выхода личинок из икры, а также снижает пораженность их сапролегниозом. В опытах с перепелами было отмечено повышение

массы молодняка, начиная с 21 дня, а по достижению 28 суток живой вес исследуемых птиц в опыте составлял $124,5 \pm 1,1$, а в контроле $116,6 \pm 1,5$ г. Эти данные свидетельствуют о том, что исследуемый препарат может использоваться в качестве лечебно-профилактического средства.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что используя метод поэтапной селекции различных таксономических групп микромицетов музейных культур коллекции Украины, нами отобраны наиболее перспективные штаммы-продуценты витаминов, коферментов. Продемонстрировано, что биологическая ценность полученного грибного препарата определяется тем, что он наряду с природным комплексом биологически активных веществ содержит значительное количество жизненно важных витаминов. В составе исследуемого препарата преобладают такие витамины, как: никотиновой кислоты и ее биологически активные формы, тиамин, витамин Е и β -каротин, соединения с чрезвычайно широким спектром действия. Все вышеупомянутые витамины принимают активное участие в основных метаболических путях живых организмов, способствуя их физиологическому протеканию. Применение витаминной грибной биомассы способствует повышению функционирования иммунной системы живых организмов, что обосновывает возможность применения ее, в качестве основы для получения лекарственных средств, как в медицине, так и сельском хозяйстве.

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. – Santa Cruz, С.А. 1995. 251 p.
3. *Беккер З. Е.* Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 260 с.
4. *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.
5. *Билай В.И.* Методы экспериментальной микологии.-1982 .- 550 с.
6. *Донченко Г.В.* Биохимия убихинона Q. - 1988.- 297 с.
7. *Bergmeyer H.U.* Methods of Enzymatic Analysis. - New York; London: Verlag Chemie, 1963. - 1064 p.

Резюме

Селекционированы штаммы-продуценты витаминов: *Fusarium sambucinum* – продуцент никотиновой кислоты и ее производных форм, *Penicillium sclerotiorum* - β -каротина и белка. На основе изучения их физиолого-биохимических свойств разработана биотехнология получения биопрепарата при совместном культивировании отобранных штаммов, что позволило сократить сроки ферментации и повысить выход биологически активных веществ. Испытания грибного препарата с высоким содержанием витаминов, коферментов и других биологически активных веществ обосновывает возможность его применения в качестве кормовой и пищевой добавки.

Селекціоновані штами – продуценти вітамінів та коферментів : *Fusarium sambucinum* – продуцент нікотинової кислоти та її похідних, *Penicillium sclerotiorum* - β -каротину та білку. На основі вивчення їх фізіолого-біохімічних властивостей розроблена біотехнологія отримання біопрепарату при сумісному культивуванні штамів мікроміцетів, що дозволило скоротити терміни ферментації та підвищити вихід біологічно активних речовин. Випробування грибного препарату з високим вмістом вітамінів, коферментів та інших біологічно активних речовин обґрунтовує можливість застосування його в якості кормової та харчової домішки.

Micromycetes strains were selected: *Fusarium sambucinum* – nicotinic acid producer and its derivatives, *Penicillium sclerotiorum* - β -carotene and protein. The biotechnology of biopreparation obtaining based on physiology-biochemical property was developed using joint cultivation of selected strains. This approach has allowed reduce the terms of fermentation and augment the output of biologically active substances. The test of fungal preparation which had high content of vitamins, coenzymes and other biologically active substances proves the possibility of its using as food and chow additives.

**ШИМШИЛАШВИЛИ Х.Р¹, ЮРЬЕВА Н.О², БЕРДИЧЕВЕЦ И.Н.¹,
ГОРДУКОВА М.А.¹, ЦЫДЕНДАМБАЕВ В.Д.², НОСОВ А.М.²,
ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.¹**

¹*Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН (ИОГен РАН).*

Россия, Москва, ул. Губкина 3. 119991

e-mail: chris@vigg.ru

²*Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН (ИФР РАН)*

Россия, Москва, ул. Ботаническая 35. 127276

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ, ЗА СЧЕТ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ С РАЗЛИЧНОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Известно, что одной из первичных ролей в способности растений к перенесению холода отводится мембранным липидам. Молекулы липидов в мембране образуют двойной слой, в котором гидрофобные концы жирных кислот обращены друг к другу, а гидрофильные головки образуют заряженный слой на поверхности мембран. При нормальной температуре и оптимальном осмотическом давлении мембрана представляет собой жидко кристаллическую структуру, обладающую определенной степенью текучести. Термин «текучесть» используется для описания степени неупорядоченности и физической подвижности внутри липидного бислоя мембран. При снижении температуры или гипертоническом шоке, молекулы жирных кислот приближаются друг к другу. По сути, это означает сжатие мембраны и уменьшение ее текучести. При определенных условиях может наступить критический момент, когда большая часть липидов потеряет свою подвижность настолько, что произойдет фазовый переход из жидко-кристаллического состояния в состояние геля. Это приведет к гибели клетки, если она будет не в состоянии поддерживать свои мембраны на определенном уровне текучести. Главными причинами смертельного исхода являются уменьшение подвижности белков в липидном бислое, их неспособность к изменению конформации и как следствие - полная потеря своих функций. При отклонении температуры от нормальной в сторону ее повышения либо при гипотоническом шоке, мембраны растягиваются, то есть возрастает подвижность липидных молекул в бислое и текучесть мембран увеличивается. Этот процесс может привести к разделению липидной фазы и полному разрушению мембранных структур. Обычно клетки обладают защитными системами для контроля над состоянием своих мембран и в момент изменения условий среды активируют эти системы. Так при снижении температуры активируется синтез десатураз. Десатуразы – это ферменты, которые вводят двойные связи в молекулы жирных кислот, и характеризуются высокой субстратной специфичностью. Следует отметить, что в ряде работ говорится о ключевой роли ненасыщенных ЖК в ответных реакциях растений не только на изменение температуры, но и на атаки фитопатогенов. В тоже время роль десатураз в механизмах адаптации биологических мембран и растений в целом до

конца не выяснена. Это связано, прежде всего, с методическими трудностями анализа экспрессии генов в высших растениях и со значительно более сложными механизмами регуляции в эукариотических системах. В связи с этим, важно разработать адекватные модели для изучения физиологической роли десатураз в жизнедеятельности растений, в том числе выяснения вклада ненасыщенности жирных кислот в мембранных липидах в механизмах устойчивости растений к стрессовым факторам. Такими моделями могут быть трансгенные растения, экспрессирующие гетерологичные гены, кодирующие десатуразы с различной субстратной специфичностью.

Материалы и методы

В работе использовались: штамм *Escherichia coli* BL21, агробактерии, растения картофеля сорта «Десница», «Юбилей Жукова».

Результаты и обсуждения

Были сконструированы экспрессионные растительные вектора, несущие в своем составе нативные и гибридные гены десатураз.

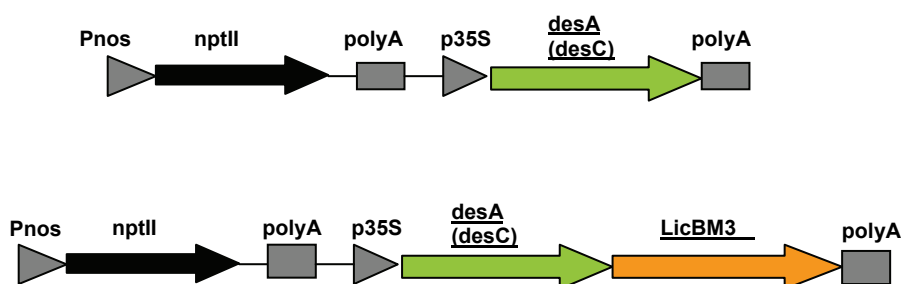


Рисунок 1. Pnos- промотор нопалинсинтазы, nptII - ген устойчивости к канамицину, polyA - полиА последовательность, p35S- промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, desA, desC- гены $\Delta 12$ -, $\Delta 9$ -десатуразы, соответственно LicBM3 - репортерный ген, кодирующий лихеназу.

Далее была проведена агробактериальная трансформация растений картофеля. Выбор этих растений для создания моделей основан на том, что, во-первых, растения картофеля относятся к достаточно холодостойким растениям и могут переносить кратковременное понижение температуры до -4°C , что облегчит проведение экспериментов по определению холодоустойчивости трансформантов растений, а также по устойчивости растений к фитопатогенам. Далее, на селективном агенте были отобраны первичные трансформанты и проведен их молекулярно-генетический анализ. В настоящее время проанализированы трансформанты линий с нативным и гибридным геном $\Delta 12$ -десатуразы.

С использованием системы праймеров, их концентраций и условий ПЦР, разработанных нами, проведена мультиклексная ПЦР, результаты которой показали наличие последовательностей селективного и целевых генов, а также регуляторных элементов в геномной ДНК трансформантов.

Для того, чтобы показать, что в полученных трансформантах картофеля происходит образование белковых продуктов, белковые лизаты, полученные из независимых трансформантов растений, были проанализированы методом энзимограмм. Полученные результаты показали, что в отобранных трансформантах происходит образование гибридных белков с молекулярной массой соответствующей теоретически рассчитанной. Эти результаты позволили нам включить отобранные трансформанты в дальнейшие эксперименты.

Далее был проведен сравнительный анализ по определению ненасыщенных жирных кислот в мембранных липидов в контрольных растениях и различных линиях трансформантов. Было показано, что экспрессия гетерологичной десатуразы

приводит к достоверному увеличению как диеновых, так и триеновых жирных кислот в мембранных липидах трансформантов.

Для того, чтобы выяснить взаимосвязь между изменением в уровне ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов трансформантов картофеля и их устойчивостью к низким температурам был проведен их физиолого-биохимический анализ. Для этих целей мы использовали стандартные методы определения степени холодостойкости растений:

1. Метод определения интенсивности перекисного окисления липидов, определяемого по накоплению в листьях продукта этого процесса – малонового диальдегида (МДА) до охлаждения и после холодной экспозиции у контрольных растений и трансформантов. Было показано, что в результате Холодовой экспозиции содержание МДА в тканях контрольных растений возрастает, тогда у трансформантов этот показатель достоверно не изменяется. Это свидетельствует о более высокой устойчивости трансгенных линий к низкотемпературному стрессу. В отношении исследуемых трансформантов картофеля следует отметить, что во всех линиях трансформантов даже до охлаждения уровень МДА был почти в 1,5 раза ниже, чем у контрольных растений (рис. 2).

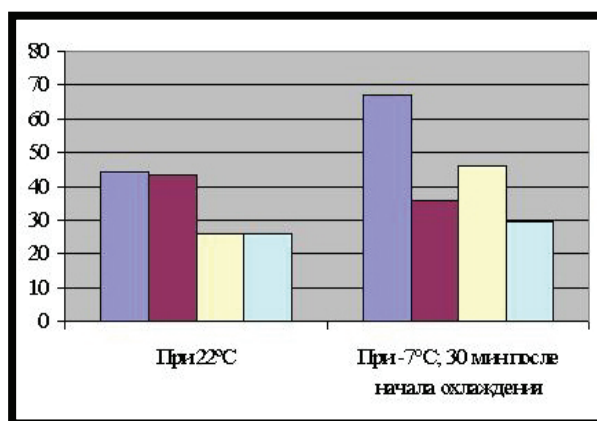


Рисунок 2. Определение интенсивности перекисного окисления липидов по МДА. Контрольные растения - линия W, Трансформанты DesA-LicBM3 - линии C1-3

2. Метод определения индекса повреждения листьев – это показатель электропроводности водных экстрактов полученных в результате экзосмоса электролитов из тканей листьев при холодной экспозиции при -7°C и после нее. Он позволяет регистрировать скорость утечки ионов калия и натрия. Показано, что через час после 30-минутной инкубации при -7°C индекс повреждения листьев исходного сорта значительно увеличился, в то время как у растительных трансформантов он остался практически без изменений (рис. 3).

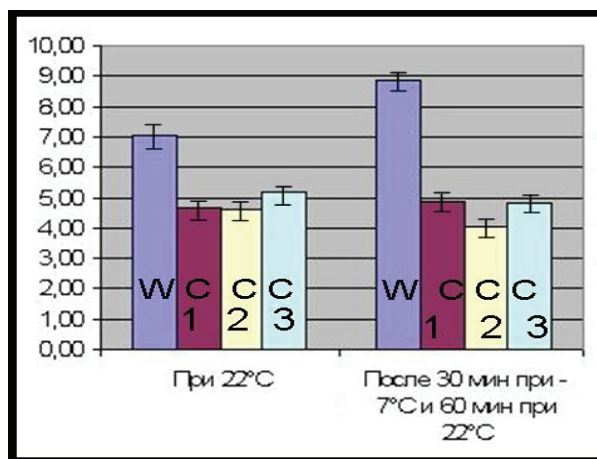


Рисунок 3 Определение Индекс повреждения листьев трансформированных линий картофеля в норме и после охлаждения. Контрольные растения - линия W, Трансформанты DesA-LicBM3 - линии C 1-3.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что экспрессия гетерологичной десатуразы в растениях картофеля приводит к увеличению количества ненасыщенных жирных кислот мембранных липидов, что коррелирует с более высокой устойчивостью трансформантов картофеля к низким температурам.

Полученные результаты свидетельствуют и о том, что в трансформантах растений изменены физические свойства мембраны. Это позволило сделать нам следующее предположение: изменение физических свойств мембран в трансформантах растений (за счет более высокого содержания ненасыщенных жирных кислот) может модулировать конформацию и/или активность интегрированных в мембранные липиды белковых комплексов, большинство из которых являются либо рецепторами, либо сенсорами, участвующими в передаче сигналов при действии стрессовых факторов. В частности, сенсоры, которые участвуют в запуске защитных механизмов у растений в ответ на атаку фитопатогенов.

Для косвенного подтверждения этого предположения были проведены следующие эксперименты.

Была проведена инокуляция листьев растений картофеля суспензией зооспор гриба *Phytophthora infestans*. В качестве стандартов использовали растения сорта: Никулинский - с высокой устойчивостью к патогену, Десница – со средней устойчивостью и Жуковский ранний - восприимчивый сорт. Отмечалась задержка в появлении симптомов поражения у трансформантов картофеля по сравнению с растениями исходного сорта и сортов-стандартов.

Далее, мы провели предварительную оценку трансформантов картофеля, экспрессирующих гибридный ген десатуразы, на устойчивость к возбудителю бактериального рака картофеля. На листьях трансформантов картофеля отмечено отсутствие симптомов этого заболевания, по сравнению с исходным сортом.

Сравнение показателей устойчивости трансформантов картофеля к ряду фитопатогенов с показателями устойчивости либо исходного сорта, либо сортов-стандартов подтверждают, что трансформанты картофеля, экспрессирующие ген Δ -12-десатуразы, могут быть потенциально устойчивыми к возбудителю фитофтороза и бактериального рака.

Молекулярные механизмы такой устойчивости могут быть в дальнейшем изучены на сконструированных нами моделях. В настоящее время, можно только предположить, что изменение физических свойств мембран в трансформантах

растений (за счет более высокого содержания ненасыщенных жирных кислот) может модулировать конформацию белков-сенсоров, участвующих в передаче сигналов при действии стрессовых факторов, и, как следствие, приводит к активации защитной системы растений.

Резюме

Были сконструированы гибридные гены *desA-licBM3* и *desC-licBM3*. Эти гены были клонированы в растительные экспрессионные вектора, которыми далее были трансформированы растения картофеля *Solanum tuberosum*. Показано, что гибридные гены экспрессируются в растительных трансформантах и при этом десатуразы и лихеназа сохраняют свои основные свойства. Продемонстрировано, что экспрессия гетерологичных десатураз в растениях приводит к увеличению ненасыщенных жирных кислот, что коррелирует с более высокой толерантностью растений к воздействию стрессовых факторов.

Hybrid genes *desA-licBM3* and *desC-licBM3* were constructed. These hybrid genes were cloned in plant expression vectors and were introduced into *Solanum tuberosum*. It was shown that hybrid genes expressed in transgenic plants and desaturases and lichenase save their main behaviors consisting hybrid genes. It was demonstrated that expression of heterological desaturases into plants led to increase unsaturated fat acids and this correlate with high level of plant tolerance to set stress factors.

ЯЦИШИН В.Ю., ФЕДОРОВИЧ Д.В., ВОРОНОВСЬКИЙ А.Я., СИБІРНИЙ А.А.

Інститут біології клітини НАН України,

Україна, 79005, Львів, вул. Драгоманова, 14/16, e-mail: yatsyshyn.v@gmail.com

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ СИНТЕЗУ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA*

Флавінові кофактори: флавінмононуклеотид (ФМН) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД) є похідними рибофлавіну (РФ) та задіяні у багатьох реакціях, необхідних для основних метаболічних процесів (аеробне та анаеробне дихання, фотосинтез, денітрифікація, репарація ДНК, біолюмінесценція). Флавопротеїни залучені в метаболізм вуглеводів, ліпідів, білків, синтез вітамінів В₆ та В₁₂, а також у метаболізм заліза. Препарати флавінових нуклеотидів мають медичне значення і використовуються як реагенти у біохімії.

Відомо багато мікроорганізмів, здатних до надсинтезу попередника флавінових нуклеотидів – РФ, але досі не описано жодного природного надсинтетика ФМН чи ФАД. Лише мутанти гриба *Emmenthosium ashbyii* здатні продукувати деякі кількості ФАД у суміші з РФ. Нами було вперше сконструйовано рекомбінантні штами флавіногенних дріжджів *Candida famata* з надекспресованим геном *FMN1* (кодує РФ-кіназу – фермент, який каталізує фосфорилування РФ до ФМН), здатні до надсинтезу ФМН [2], що продукували в 1000 разів більше цього нуклеотиду, ніж штам дикого типу. Як відомо [8], одним із ефективних способів підвищення продуктивності процесу надсинтезу бажаних метаболітів є, окрім методів генетичної інженерії, підбір оптимального складу середовища культивування та умов ферментації.

У роботі наведено дані про вплив різних факторів на процес біосинтезу ФМН отриманими нами рекомбінантними штамми *C. famata* з надекспресованим геном *FMN1* за умов інкубації визначеної кількості клітин. Підібрано оптимальне джерело і концентрацію вуглецю (сахароза) та азоту (сечовина). Встановлено, що оптимальною для нагромадження ФМН є 24 годинна інкубація.

Матеріали та методи

У роботі використовували отриманий нами раніше рекомбінантний штам дріжджів *Candida famata* 13-76, що містить додаткові гени *FMN1 D. hansenii* під контролем промотора *TEF1 C. famata*. Схема конструювання плазмід із геном *FMN1* під контролем промотора *TEF1* та отримання трансформантів описані в [2].

Дріжджі вирощували при 300С у багатому середовищі YPD (дріжджовий екстракт, 0,5%; пептон, 1%; глюкоза, 2%) та мінімальному середовищі Беркгольдера, що містило 5 г/л KH_2PO_4 [4].

Вміст флавінів у культуральній рідині визначали флуориметрично на флуорометрі Turner Quantech FM 109510-33 після хроматографічного розділення, із використанням синтетичного РФ як стандарту [5].

Дані представлено як середнє \pm похибка середнього ($M \pm m$). Статистичну обробку здійснювали із використанням коефіцієнта Ст'юдента. Математичне опрацювання результатів виконували за допомогою програмного пакета Microsoft Office Excel 2003.

Результати та обговорення

Раніше нами було показано, що надекспресія гену *FMN1* дріжджів *C. famata*, шляхом заміни його нативного промотора на сильний конститутивний промотор *TEF1*, призводить до суттєвого зростання активності РФ-кінази та виникнення надсинтезу ФМН у рекомбінантних штамів, що містять такий модифікований ген [2, 3]. Отримані штами-надсинтетики продукують ФМН, однак кількості цільового продукту недостатні для використання цих штамів у промисловості. Як шляхи підвищення синтезу ФМН ми розглядаємо введення додаткових копій гену *FMN1* у геном надсинтетика, пригнічення гідролітичної активності фосфатаз, що можуть розщеплювати новоутворений продукт, а також оптимізацію умов культивування.

Компоненти середовища підбирали шляхом інкубації клітин рекомбінантного штаму *C. famata* 13-76 у середовищі вибраного складу (як основа використовувалось модифіковане синтетичне середовище Беркгольдера [4]). Перед цим дріжджі вирощували протягом 1,5 діб для нагромадження біомаси. Клітини «виброджували» у середовищі без джерела вуглецю або без джерела азоту протягом 6 год. (2 генерації). Отриманий таким чином інокулят інкубували протягом 15-70 год. у середовищі з різними джерелами вуглецю і азоту.

Відомо, що коло джерел вуглецю, які використовуються дріжджами, надзвичайно велике, але найкраще засвоюються моно- та дисахариди. Для перевірки впливу на синтез ФМН джерела вуглецю ми використали лише сахарозу та глюкозу як субстрати, які забезпечують добрий ріст *C. famata*.

Виявилось, що інкубація в середовищі, де джерелом вуглецю була сахароза, дає змогу отримати лише на 8% більше ФМН, ніж інкубація з глюкозою (рис. 1). Таким чином, значної різниці між випробуваними субстратами помічено не було, як джерело вуглецю в подальших експериментах використовували сахарозу, як стандартний компонент вихідного середовища. Однак, концентрацію цього компонента було підвищено до 30 г/л, оскільки саме за таких умов у культуральне середовище виділялося найбільше ФМН.

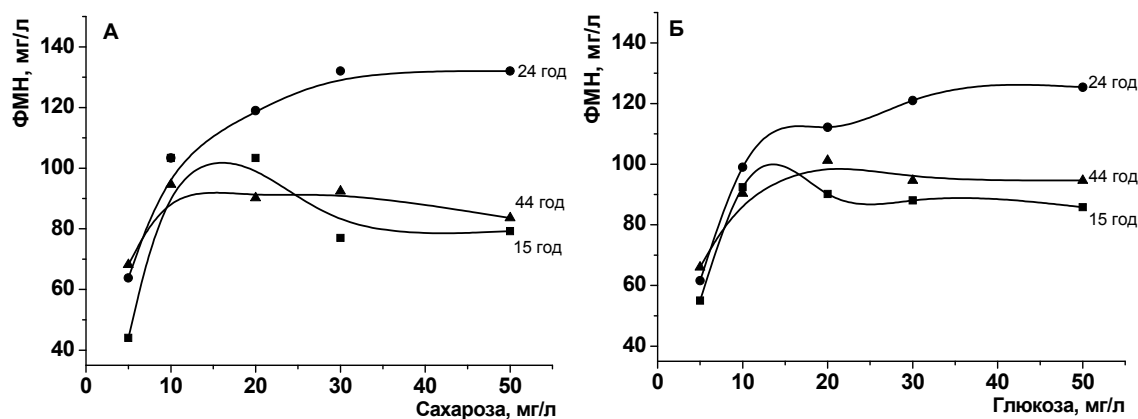


Рис. 1. Визначення оптимального джерела та концентрації вуглецю для продукції ФМН штамом 13-76 *C. famata*: інкубація з сахарозою (А) та глюкозою (Б)

Крім того, наші дослідження показали (див. рис. 1), що оптимальною для синтезу ФМН є 24-годинна інкубація, при тривалішому культивуванні вміст цього нуклеотиду в культуральній рідині суттєво знижується, можливо через розщеплення фосфатазами.

Для підбору джерела азоту та його концентрації використовували модифіковане середовище Беркгольдера, що містило 3% сахарози. Як джерела азоту ми вибрали солі амонію, сечовину та гліцин, а також їх поєднання (таблиця) у концентраціях, еквівалентних кількості азоту в базовому середовищі.

Як виявилось, сечовина є оптимальним для продукції ФМН джерелом азоту. Заміна сечовини на діамоній фосфат та гліцин призводила до зниження синтезу цієї сполуки на 12%, а внесення сульфату амонію зменшувало вихід ФМН у 5,5 разів. Одним з пояснень негативного впливу іонів сульфату на продукцію ФМН може бути значне закислення середовища інкубації, що відбувається внаслідок утилізації амонію.

Таблиця. Продукція ФМН рекомбінантним штамом 13-76 *C. famata* при інкубації протягом 24 год. в середовищах із різними джерелами азоту

Джерело азоту	ФМН, мг/л
(NH ₄) ₂ SO ₄	21,6 ± 1,94
Сечовина	123,2 ± 9,82
(NH ₄) ₂ HPO ₄	107,8 ± 8,31
Гліцин	108,2 ± 5,55
(NH ₄) ₂ SO ₄ +гліцин	90,8 ± 5,20
Сечовина+гліцин	122,5 ± 11,1
(NH ₄) ₂ HPO ₄ +гліцин	103,1 ± 11,0

Вірогідно відрізняється від відповідних контрольних значень із $p < 0,05$

ФМН хімічним способом [1].

Інші компоненти середовища, зокрема мікроелементи, також можуть мати важливе значення для оптимізації синтезу ФМН. Для визначення впливу макро- та мікроелементів необхідно провести багатофакторний аналіз. В будь-якому випадку,

Експерименти щодо визначення концентрації сечовини в поживному середовищі, оптимальної для максимальної продукції ФМН, показали, що внаслідок додавання у 5 разів більшої кількості цього джерела азоту синтез ФМН зростає у 2,5 рази, порівняно із базовим середовищем Беркгольдера (див. рис. 2).

Отримані результати вказують на те, що підбір оптимальних концентрацій лише джерела вуглецю і азоту дозволяє збільшити продукцію ФМН в 10 разів. При цьому в культуральній рідині рекомбінантного штаму не нагромаджуються інші фосфорильовані продукти, як це має місце при отриманні

отримані рекомбінантні штами для синтезу ФМН не потребують додавання дорогих попередників та інших компонентів: РФ або АТФ, як це описано для бактерійних надсинтетиків ФМН [6, 7].

Однак, в культуральній рідині штамів-надсинтетиків ФМН наявний РФ. Можливою причиною цього може бути гідроліз нуклеотиду за участю фосфатаз. Можливо, пригнічення активності цих ферментів за допомогою компонентів середовища – інгібіторів фосфатаз, дозволить підвищити вихід цільового продукту.

Дані літератури [6, 7] та наші дослідження [2, 3] свідчать про перспективність використання мікроорганізмів для отримання ФМН. Основною перевагою мікробіологічного синтезу цього нуклеотиду є уникнення синтезу побічних продуктів. На нашу думку, введення додаткових копій гену, що кодує РФ-кіназу, а також подальша оптимізація середовища культивування з застосуванням методів математичного планування експериментів дозволять використовувати штами, отримані шляхом надекспресії гену РФ-кінази для промислового отримання ФМН.

Література

1. Березовский В.М. Химия витаминов / Березовский В. М. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 632 с.
2. Вороновський А.Я., Дмитрук К.В., Іщук О.П., Федорович Д.В., Сибірний А.А., Яцишин В.Ю. Спосіб отримання флавінмононуклеотиду (5'-ФМН) / Патент України на корисну модель №22568, 25 квітня 2007 р.
3. Іщук О.П., Яцишин В.Ю., Дмитрук К.В., Вороновський А.Я., Федорович Д.В., Сибірний А.А. Генно-інженерне конструювання штамів флавіногенних дріжджів *Candida famata* з високою активністю рибофлавінкінази // Укр. біохім. журнал. – 2006. – Т. 78, № 5. – С.53-59.
4. Шавловський Г.М., Жарова В.П., Щелокова И.Ф., Трач В.М., Сибірний А.А., Кшемінська Г.П. Флавіногенна активність природних штамів дрожжей *Pichia guilliermondii* // Прикл. біохімія і мікробіологія. – 1978. – Т.14. – С. 184-189.
5. Bessey O.A., Lowry J.Y., Love R.H.J. The fluorometric measurement of the nucleotides of riboflavin and their concentration in tissues // J. Biol. Chem. – 1949. – Vol. 180, N 2. – P. 378-381.
6. Hagihara T., Fujio T., Aisaka K. Cloning of FAD synthetase gene from *Corynebacterium ammoniagenes* and its application to FAD and FMN production // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1995. – Vol. 42, N 5. – P. 724-729.
7. Nakagawa S., Hagihara T., Fujio T., Aisaka K. Metaphosphate-dependent phosphorylation of riboflavin to FMN by *Corynebacterium ammoniagenes* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1995. – Vol. 43, N 2. – P. 325-329.
8. Wu Q.-L., Chen T., Gan Y., Chen X., Zhao X.-M. Optimization of riboflavin production by recombinant *Bacillus subtilis* RH44 using statistical designs // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 76, N 4. – P. 783-794.

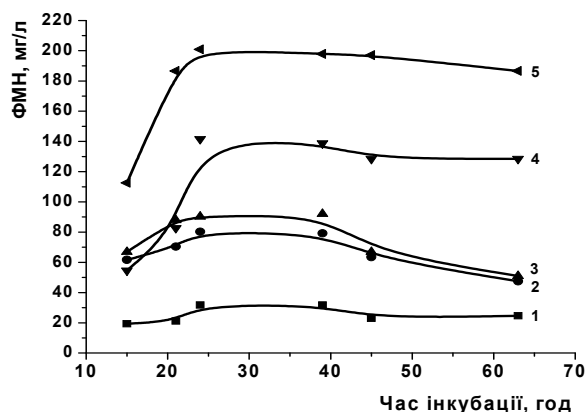


Рис. 2. Підбір оптимальної концентрації джерела азоту для продукції ФМН штамом 13-76 *C. famata*: 1 – 0,01% сечовини, 2 – 0,05% сечовини, 3 – 0,1% сечовини 4 – 0,2% сечовини, 5 – 0,5% сечовини

Резюме

Оптимізовано середовище для максимального нагромадження ФМН рекомбінантними штамми дріжджів *Candida famata*, що містять ген РФ-кінази FMN1 під контролем сильного конститутивного промотора TEF1.

Оптимизирован состав среды для максимального накопления ФМН рекомбинантными штаммами дрожжей *Candida famata*, содержащими ген РФ-киназы FMN1 под контролем сильного конститутивного промотора TEF1.

The medium composition for maximal FMN production by recombinant strains of the yeast *Candida famata* that express the *FMN1* gene encoding riboflavin kinase under control of the strong constitutive *TEF1* promoter was optimized.

**GERASYMENKO I.M., LYPOVA N.M., SAKHNO L.A., SHCHERBAK N.L.,
SINDAROVSKA Y.R., BANNIKOVA M.A., SHELUDKO Y.V., KUCHUK N.V.**

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine,
Zabolotnoho str. 148, Kiev 03680, Ukraine, e-mail: ysheludko@ukr.net*

OBTAINING AND ANALYSIS OF TOBACCO, LETTUCE AND RAPE PLANTS TRANSFORMED WITH HUMAN INTERFERON ALFA 2B GENE

Interferons are a large family of multifunctional secreted proteins involved in animal antiviral defence, cell growth regulation and immune system activation [1]. The human interferon alpha2b (hIFN- α 2b) is used to treat several diseases including some types of cancer and hepatitis C. Recombinant human interferons have been produced in bacteria, yeast, insect and mammalian cells, and several plant species. Plants as source of pharmaceutical proteins have important advantages over microbial or animal cell systems. They are free from bacterial toxins and human pathogens like viruses and prions, so the recombinant proteins of plant origin are considered to be safer [2]. In some cases they can be used without purification as edible vaccines that lowers production costs considerably [3]. The main obstacle on the way of using transgenic plants for high-scale production of recombinant proteins is the low level of foreign gene expression in case of stable integration into plant nuclear genome (usually about 0.1-0.5 % TSP) [3]. However, the high specific activity of hIFN- α 2b may allow using of transgenic plants as food supplements to enhance immune functions of humans and animals.

Here we describe *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of model and agricultural plant species with hIFN- α 2b gene that resulted in obtaining of plants expressing physiologically active human interferon.

Materials and methods

Agrobacterium tumefaciens strain GV3101 was used for plant transformation. *Escherichia coli* strain XL1Blue was used for cloning of binary plasmid vectors. Plasmid vectors pICH5290, pCBV16, pICH13301 and pICH17311 were generously donated by Icon Genetics GmbH (Germany). Restriction endonucleases (REs) and T4 DNA ligase were used with supplied buffers (Fermentas, Lithuania). Bacterial cell transformation, plasmid DNA isolation and electrophoretic analysis were carried out as described in [4]. A short nucleotide sequence containing *Bam*HI and *Xba*I recognition sites was added to the pICH13301 and pICH17311 constructs digested with *Pst*I RE. Native and recombinant hIFN- α 2b genes were excised with *Nco*I and *Xba*I REs and ligated into pICH5290 and pCBV16 vectors predigested with the same REs. The obtained vectors were designated as pCB73, pCB123, pCB124 and pCB125 (Table1).

Table 1.

Constructed plasmid vectors used for plant transformation

Plasmid vector	Selective gene	Gene of interest
pCB073	<i>bar</i>	Native hIFN- α 2b
pCB123	<i>nptII</i>	Native hIFN- α 2b
pCB124	<i>nptII</i>	Recombinant hIFN- α 2b with calreticulin signal peptide
pCB125	<i>bar</i>	Recombinant hIFN- α 2b with calreticulin signal peptide

Nicotiana tabacum cv. Wisconsin was transformed by co-cultivation of leaf explants with *Agrobacterium* carrying pCB073 plasmid. Plants were regenerated on MS medium [5] containing 1 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA and 5 mg/l PPT.

Cotyledons and hypocotyls excised from 7-days old seedlings of lettuce (*Lactuca sativa*) cv. Odeskij kucheriavij were inoculated with *Agrobacterium* carrying pCB125 plasmid and transferred to B5 medium [6] containing 25 g/l sucrose, 3 mg/l kinetin, 0.5 mg/l naphthylacetic acid, and 5 mg/l PPT. PPT-resistant shoots were rooted on the B5 medium complemented with 0.5 mg/l NAA and 5 mg/l PPT. Obtained plants were transferred to soil and treated with herbicide BASTA.

Rape plants of different varieties (Kletochnyj, Kalinovskij, Westar, Maria, Brutor, Aira, VNIS-100) were transformed by co-cultivation of leaf explants with *Agrobacterium* carrying pCB073 or pCB125 plasmid. *Agrobacterium* treated explants were placed onto medium with 2 mg/l 2,4-D, 1mg/l NAA, 0,1 mg/l Kin and 0,1 mg/l BA for callus formation. Plants were regenerated on MS-basal medium supplemented with 2 mg/l BA, 1 mg/l Zea, 1 mg/l NAA, 1 mg/l GA and 1 mg/l ABA containing 10 mg/l PPT [7].

PCR analysis was carried out with primers INTFOR 5'-ctctgcttgaaggacag-3' and INTREV 5'-ggagtctctctcatcag-3' amplifying the 264 bp fragment of hIFN- α 2b gene. To detect agrobacterial contamination, an additional primer pair (VirD1-1 5'-atgtcgcaaggcagtaagccca-3' and VirD1-2 5'-ggagtcttccagcatggagcaa-3') was simultaneously used for amplification of 432 bp fragment of *virD1* gene. The reaction mixture contained 1 mkg of total plant DNA; 0.25 mK of each primer; 0,5 u of *Taq* DNA polymerase and corresponding buffer (Helicon, Russia); 0.5 mM dNTPs (0.125 mM each). Amplification was conducted under following conditions: 94°C 5 min \rightarrow (94°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec) x 30 \rightarrow 72°C 5 min.

Extracts from plant leaves were prepared in double volume of 100 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0, containing 5 mM Na₂EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol, and 2.5 % PVP. The total protein content was measured by the method of Bradford. The extracts were tested for their ability to protect cells against cytopathic viral replication in the vesicular stomatitis virus cytopathic effect assay.

Results and discussion

Genetic constructs for *Agrobacterium*-mediated transformation of plant nuclear genome were built up on the basis of binary plasmid vectors pICH5290 and pCBV16. They included *bar* or *nptII* genes, respectively, under control of nopaline synthase promoter and octopine synthase terminator. It allowed selection of transformed plants by their resistance to phosphinothricin (PPT) or kanamycin, respectively. hIFN- α 2b gene with native N-terminal cleavable signal peptide and recombinant hIFN- α 2b gene fused to *Nicotiana plumbaginifolia* calreticulin signal peptide were derived from pICH13301 and pICH17311 plasmid, respectively. The signal peptides determine translocation of newly synthesized proteins across the membrane of endoplasmic reticulum that leads to their excretion into apoplast and may increase the production level. It was reported previously, that using of *N. plumbaginifolia* calreticulin signal peptide allowed to achieve high level of transient expression of hIFN- α 2b gene in *N. benthamiana* [8]. However, we decided to use both native and recombinant hIFN- α 2b genes because in different plant species the effectiveness of signal peptides may vary.

The obtained vectors contained the genes of interest under control of CaMV 35S promoter and nopaline synthase terminator (Table 1).

In our experiments we transformed model plant species (tobacco) as well as lettuce and rape which can be used in raw form in human diet or animal feeding. The hIFN- α 2b gene was introduced in plant cells by *Agrobacterium* carrying pCB125 or pCB73 vectors. After selection for PPT resistance we have obtained 7 tobacco plants, 9 lettuce plants and 54 rape plants. Presence of the hIFN- α 2b gene as well as absence of *Agrobacterium* contamination was confirmed by duplex PCR assay for all obtained tobacco and lettuce plants and for 19 rape plants (12 of variety Kletochnyj, 4 of variety Kalinovskij, 1 of variety Westar, 1 of variety Maria and 1 of variety Brutor).

The extracts from four green-house grown lettuce plants harboring the hIFN- α 2b gene were tested for their ability to protect cells against cytopathic viral replication. One of the tested transformants, as well as control non-transformed plant showed no activity in the vesicular stomatitis virus cytopathic effect assay. Three other lines demonstrated varying levels of antiviral activity (Table 2).

Table 2.

Interferon activity in leaf extracts of lettuce plants

Lettuce plant	Interferon activity, IU/ml of leaf extract	Interferon activity, IU/g FW
Non-transformed	0	0
Transformant 1	0	0
Transformant 2	12.5	27
Transformant 3	100	226
Transformant 4	200	448

Primary transformants of tobacco and lettuce were self-fertilized and seeds were obtained.

Physiologically active human interferons have been produced earlier in several plant species by different methods. Stable nuclear transformation was reported for tobacco (interferon beta, [9]), rice plants (interferon alfa, [10]) and cell suspension cultures (interferon gamma, [11]), and potato (interferon α 2b and 8, [12]; interferon α 2b, [13]). The maximum interferon activity in potato plants reached 560 IU/g FW [12], which is comparable with our data for lettuce (448 IU/g FW, Table 2). In tobacco, high levels (up to 20 % TSP, or 3 mg/g FW) of hIFN- α 2b were achieved by chloroplast transformation [14]. However, obtaining of transplastomic plants is a difficult task. Up to date it is feasible for a restricted number of plant species. Many agricultural plants still resist attempts of chloroplast transformation. Another way to increase recombinant protein production in plants is transient expression of foreign gene [15]. By this method active human interferon beta [16] and chicken interferon alpha [17] were produced in lettuce. The drawback of transient expression is the difficulty of scaling up the process. Stable nuclear transformants are suitable for field cultivation in ton range. No additional purification of recombinant protein is necessary if the plant can be freshly consumed. Presently human interferon alfa produced in transgenic duckweed is in phase II of clinical trials (Biolex, USA). In case of hIFN- α 2b, the high specific activity of the recombinant protein (10^8 IU/mg) may allow using of transgenic plants even with low level of target protein accumulation as food supplements to enhance immune functions of humans and animals.

Conclusions

We have constructed plasmid vectors for *Agrobacterium*-mediated transformation of plant nuclear genome with human interferon alpha2b gene. With the obtained genetic constructions we performed *Agrobacterium*-mediated transformation of model (tobacco) as well as agricultural plant species (lettuce, rape) and proved the transgene presence in the

selected transformants. The transformed lettuce plants were proved to produce active interferon with the maximal activity about 500 IU/g FW.

References

1. Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. // J. Gen. Virology – 2000. – Vol. 81. – P. 2341-2364.
2. Larrick J.W., Thomas D.W. Producing proteins in transgenic plants and animals. // Curr. Opin. Biotechnol. – 2001. – Vol. 12. – P. 411-418.
3. Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. // Trends in Plant Sci. – 2001. – Vol. 6. – P. 219–226.
4. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. (2nd ed.) // Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. - 1989.
5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // Physiol. Plant. – 1962. – Vol.15 – P. 473-497.
6. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells// Exp. Cell Res. – 1968. – Vol. 50. – P. 151-158.
7. Sakhno L.A., Gocheva E.A. et al. Stable expression of the promoterless *bar* gene in transformed rapeseed plants // Cytology and Genetics - 2008. - Vol. 42. - N1. – P. 16-22.
8. Gils M., Kandzia R., et al. High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. // Plant Biotech. J. - 2005. - Vol.3. - P.613-620.
9. Edelbaum O., Stein D., et al. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants.// J Interferon Res. - 1992. - Vol.12. - P. 449-453.
10. Masumura T., Morita S., et al. Production of biologically active human interferon- α in transgenic rice. // Plant Biotechnology - 2006. - Vol.23. - P.91-97.
11. Chen T.L., Lin Y.L., et al. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. // Transgenic Res. - 2004. - Vol.13. - P.499-510.
12. Ohya K., Matsumura T., et al. Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants.// J Interferon Cytokine Res. - 2001. - Vol.21. - P. 595-602.
13. Sawahel W.A. The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation.// Cell Mol Biol Lett. - 2002. - Vol.7. - P.19-29.
14. Arlen P.A., Falconer R., et al. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b. // Plant Biotechnol J. - 2007. – Vol. 5. – P. 511-525.
15. Sheludko Y.V. *Agrobacterium*-mediated transient expression as an approach to production of recombinant proteins in plants. // Recent Patents on Biotechnology. – 2008. – Vol. 2. – P. 198-208.
16. Li J., Chen M., et al. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce. // Scientia Horticulturae - 2007. - Vol.112. - P.258-265.
17. Song L., Zhao D.G., et al. Transient expression of chicken alpha interferon gene in lettuce.// J Zhejiang Univ Sci B - 2008. - Vol.9. - P.351-355.

Summary

Plasmid constructs for *Agrobacterium*-mediated transformation of plant nuclear genome with human interferon alpha2b gene were built up and used to obtain transgenic plants of tobacco, lettuce and rape. Presence of the target gene was confirmed by PCR analysis and interferon activity in lettuce plants was shown by the vesicular stomatitis virus cytopathic effect assay.

Сконструированные вектора для *Agrobacterium*-опосредованной трансформации ядерного генома растений геном интерферона альфа 2b человека были использованы для получения трансгенных растений табака, салата и рапса. Присутствие целевого гена было показано с помощью ПЦР анализа. Трансформированные растения салата демонстрировали антивирусную активность интерферона.

Сконструировані вектори для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації ядерного геному рослин геном інтерферону альфа 2b людини були використані для отримання трансгенних рослин тютюну, салату та ріпаку. Присутність цільового гену було показано за допомогою ПЛР аналізу. Трансформовані рослини салату демонстрували антивірусну активність інтерферону.

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

БАБІЙ І.П., ПОБЕРЕЖНИК О.В., ГОЛУБ Н.Я., ЧЕРНИК Я.І.

Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, Львів, вул. Грушевського, 4, email: irinanet@centrum.cz

ВПЛИВ ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ І ФАРМОКОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ЦЕРЕБРАЛУ НА ДЕГЕНЕРАТИВНІ ТА РЕГЕНЕРАТИВНІ ПРОЦЕСИ У СТРУКТУРІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ МУТАНТІВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

В наш час актуальними залишаються дослідження генетично зумовлених захворювань нервової системи людини. Нейродегенеративні захворювання (НДЗ) займають чи не найперше місце серед таких поширених патологій як онкологічні, судинні, імунні. Нейродегенеративні розлади – це група хронічних прогресивних захворювань, які починаються у зрілому віці, призводять до фізичних та розумових розладів і передчасної смерті. Хвороби Альцгеймера, Паркінсона, Гантінгтона, атаксійні синдроми та ін., які пов'язані із втратою нейронів у певних ділянках мозку, є спадково зумовлені – локалізовано гени, які детермінують їх розвиток [1, 2]. В останні роки досягнуто певного прогресу у терапії НДЗ. Застосовано низку фармакологічних препаратів із різними механізмами дії, але жоден з них не дає 100% ефективності при лікуванні [2, 5, 6].

На сьогоднішній день швидкими темпами впроваджується в практичну медицину застосування лазерної терапії і хірургії. З наукових джерел [7] відомо про використання лазерного випромінювання для лікування захворювань нервової системи людини, а саме хвороб Паркінсона та Альцгеймера. Беручи до уваги факт подібності процесів диференціації і дегенерації нервової системи в різних організмів, а також високу еволюційну консервативність генів (до 70%) [11], які контролюють ці процеси, дослідження проводили на модельному еукаріотичному об'єкті – *Drosophila melanogaster*. Метою даної роботи було дослідити вплив лазерного випромінювання і макрофракції фармакологічного препарату церебралу на дегенеративні та регенеративні процеси у структурі головного мозку нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*.

Матеріали і методи

Матеріалом дослідження служили мутантні лінії *D. melanogaster* 76.15, 28.11 і 3.5.8 зі змінами структур головного мозку, попередньо отримані в нашій лабораторії під впливом етилметансульфонату [3, 8], а також лінія дикого типу Oregon (в якості контролю). Нейродегенеративні зміни у мутантів виявлялися у вигляді вакуолей, отворів, прогалин, у результаті чого тканина мозку на гістологічних зрізах нагадувала губку, павутину, або швейцарський сир [3].

У роботі було проаналізовано декілька варіантів дослідів по впливу фармакологічного препарату церебралу (личинкове згодовування, обробка препаратом імаго) та двох видів лазерного випромінювання (сканованого і неперервного). Церебрал вносили в поживне середовище в концентрації, яку розраховували, виходячи з рекомендованої максимальної добової дози фармакологічного препарату на одиницю ваги людини в перерахунку її на 100мл поживного середовища (3,6мг /100мл середовища). Доза сканованого випромінювання – 0,2 мДж та неперервного – 40 мДж. Використовували максимально допустиму дозу, виходячи з даних по застосуванню лазерного випромінювання у терапії стосовно людини [4].

Для дослідження фенотипового прояву структур головного мозку виготовляли гістологічні препарати зрізів мозку за методом Джагера і Фіжбака [10]. Аналізували препарати за допомогою мікроскопа марки Carl Zeiss в ультрафіолетовому світлі при збільшенні 12 x 40. Мух утримували в термостаті при температурі 25°C в пробірках, заповнених стандартним поживним середовищем [9].

Результати та обговорення

Поява нейродегенерацій у досліджуваних мутантів зафіксована в різні терміни: у лінії 76.15 пористість тканини мозку виникає вже на 2–3 день життя імаго; у лінії 3.5.8 та 28.11 вакуолі різного розміру по всій мозковій тканині простежуються на 10 – 11 день.

У досліді використали церебрал – суміш білків, низькомолекулярних пептидів і вільних амінокислот. Екстракт водорозчинних молекул був виділений групою авторів [2, 5] із кори головного мозку ссавців, у яких відбувся геморагічний інсульт. Після цього у мозку тварин відбуваються активні регенеративні і репараційні процеси, стимулюється ріст нейронів і синапсоутворення. Церебрал підсилює синтез NGF (фактора росту нейронів), проявляє моделюючий вплив на імунну систему піддослідних тварин, що може бути одним із основних механізмів його нейроактивуючої дії.

Ми дослідити вплив церебралу на дегенеративні процеси в структурі головного мозку нейродегенеративних мутантів дрозофіли. У табл. 1 наведено результати досліджень по впливу препарату методом личинкового згодовування на динаміку появи змін у мозковій тканині мутанта 76.15. Гістологічні препарати зрізів головного мозку виготовляли у мух з 1 по 11 день життя. Результати аналізу засвідчили, що церебрал відтерміновує появу мутантного фенотипу на 6 – 7 днів. Препарат блокує порушення метаболічних процесів і частково відновлює функцію нейронів, але ці процеси не є довготривалими, і в мутантних особин з 9 –10 денного віку нейродегенеративні зміни знову виявляються (рис.1).

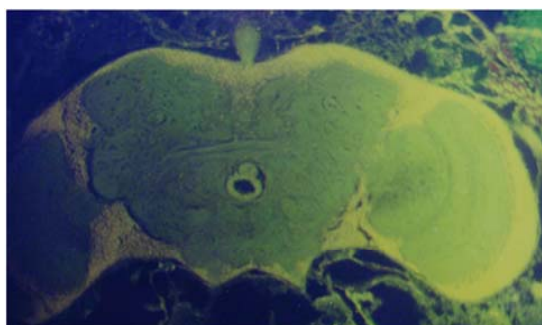
Таблиця 1

Динаміка появи змін у мутантів *D.melanogaster* лінії 76.15 після впливу церебралу (личинкове згодовування)

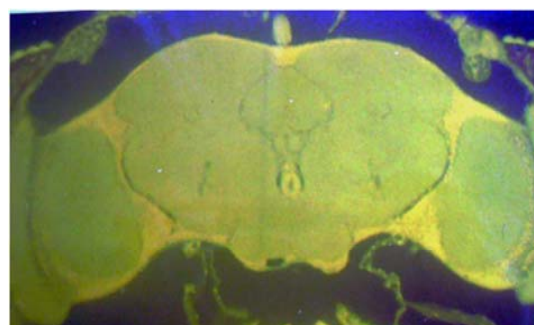
Вид досліджу	Дні										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
контроль	N	N	N/M	M	M+	M+	M+	M++	M++	M++	M++
дослід	N	N	N	N	N	N	N	N	N/M	M	M+

Примітка. N – фенотип дикого типу; M – мутантний фенотип; + – поодинокі плями, малі отвори; ++ – великі отвори.

Для лінії 3.5.8 було показано, що під впливом церебралу (личинкове згодовування) зони дегенерації у структурі мозку не виявлялися до 13-го дня життя імаго (в той час як без дії препарату – до 10-го дня).



А



Б

Рис.1. Гістологічні зрізи мозку лінії 76.15 при личинковому згодовуванні церебралу: А – 11 денні, Б – 6 денні

З метою визначення можливого впливу церебралу на регенеративні процеси в тканині головного мозку (коли вже появилися початкові зміни), ми використали мутантну лінію 3.5.8 з пізнім проявом нейродегенерацій. В одному випадку згодовували церебрал дорослим 10-денним імаго, вносячи препарат у верхні шари поживного середовища, у другому – наносили на фільтрувальну салфетку в пробірку (без середовища), в яку поміщали на ніч дорослих імаго. Контролем служили особини лінії 3.5.8 без дії препарату. Гістологічні зрізи мозку виготовляли щоденно з 11-го по 17-ий дні життя мух. Аналіз препаратів тканини мозку не показав відмінностей – у всіх імаго впродовж досліджуваного періоду проявлявся мутантний фенотип, який прогресував з віком особин (табл. 2).

Таблиця 2

Динаміка появи змін у мутантів *D.melanogaster* лінії 3.5.8 після впливу церебралу (обробка препаратом імаго)

Вид досліджу	Дні						
	11	12	13	14	15	16	17
контроль	N/M	M	M	M+	M+	M+	M++
середовище +церебрал	N/M	M	M	M+	M+	M+	M++
фільтр+церебрал	N/M	M	M	M+	M+	M+	M++

Отже, фармакологічний препарат церебрал проявляє нейропротекторну дію – призупиняє нейродегенерації, але не призводить до регенеративних процесів у головному мозку мутантів *D. melanogaster*.

Застосування лазерної терапії і хірургії, яка є безмедикаментозною, не призводить до звикання, не має побічних ефектів; посилює дію лікарських препаратів, дозволяючи значно зменшити їх дозу [7]. Нами досліджено вплив двох видів лазерного випромінювання – сканованого і неперервного – на регенеративні процеси у структурі головного мозку мутантних ліній 76.15 та 28.11. Як контроль використано неопромінених особин. Як видно з табл. 3, у лінії 76.15 з раннім проявом нейродегенерацій як в контролі, так і під впливом випромінювання впродовж з 4 по 10 дні життя імаго на всіх зрізах мозку проявлявся мутантний фенотип – регенеративні зміни у тканині головного мозку не відбувалися.

Таблиця 3

Динаміка появи змін у мутантів *D. melanogaster* лінії 76.15 після впливу лазерного випромінювання

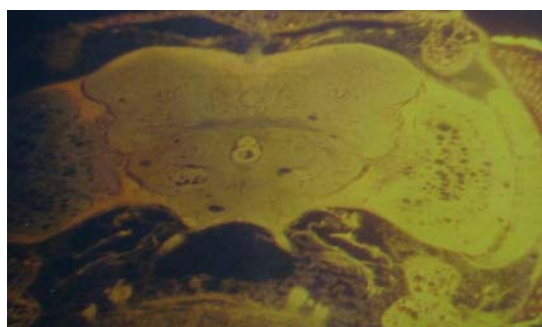
Вид досліджу	Дні						
	4	5	6	7	8	9	10
контроль	M	M+	M+	M+	M++	M++	M++
скановане випромінювання	M	M+	M+	M++	M++	M++	M++
неперервне випромінювання	M	M+	M+	M++	M++	M++	M++

Не призводить до відновлення пошкодженої структури мозку вплив лазерного випромінювання і у мух лінії 28.11 з пізнім проявом нейродегенерацій – впродовж з 10 по 14 день життя у всіх проаналізованих особин спостерігався мутантний фенотип (табл. 4, рис. 2).

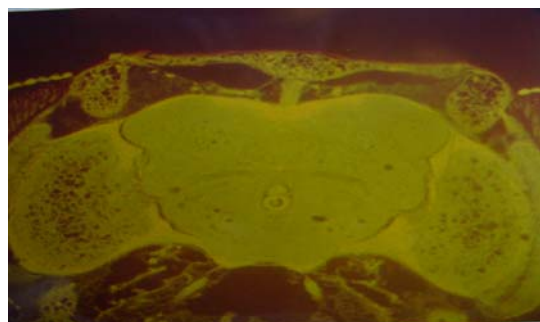
Таблиця 4

Динаміка появи змін у мутантів *D.melanogaster* лінії 28.11 після впливу лазерного випромінювання

Вид досліджу	Дні				
	10	11	12	13	14
контроль	N/M	M	M+	M+	M++
скановане випромінювання	N/M	M	M+	M++	M++
неперервне випромінювання	N/M	M	M+	M++	M++



А



Б

Рис. 2. Нейродегенеративні зміни у структурі головного мозку у мух лінії 28.11 на 14 день життя імаго: А - контроль, Б – після дії лазерного випромінювання

Таким чином показано, що ефективнішою у затримці розвитку нейродегенерацій у *D. melanogaster* є дія фармакологічного препарату церебралу, ніж лазерного випромінювання. Однак, жоден з проаналізованих чинників не призводив до регенеративних процесів у тканині головного мозку досліджених мутантів як з ранньою, так і з пізньою нейродегенерацією.

Література

1. Абрамов В.А., Івнев Б.Б., Казаков В.Н. и др. Болезнь Альцгеймера. – Донецк, 2001, – 625 с.
2. Бредли Р., Фримен А. Эффекты холинергических препаратов при болезни Альцгеймера // Фармакология и токсикология. – 1991. – Т. 54, № 3. – С. 4–10.
3. Бобак Я.П., Кімак Н.Я., Максимів Д.В., та ін. Пошук морфологічних змін мозку, індукованих етилметансульфанатом, в лінії Oregon Drosophila melanogaster // Цитологія і генетика. – 2001. – № 6. – С.34–37.
4. Гримблатов В.М. Индивидуализация дозы в лазеротерапии // Науч. приборостроение. – 1995. – № 3. – С. 102–109.
5. Даумумен И.В. Современные подходы к терапии болезни Альцгеймера // Журнал неврологии и психиатрии. – 1998. – Т. 12. – С. 56–62.

6. *Макаренко А.Н., Григорьева Т.И., Гасуль Е.Р. и др.* Адемент – новое и эффективное средство для лечения болезни Альцгеймера // Стресс и поведения. Материалы 7-й Междунар. конф. по биол. психиатрии. – М., 2003. – С.60.
7. *Самосюк И.З., Карабень И.Н., Березецкая Н.М., Гаркавенко В.В.* Эффективность магнитолазерной терапии у пациентов с болезнью Паркинсона: результаты клинкоэлектрэнцефалографического исследования // Український медичний часопис. – 2004, – № 5 (43) – IX/X. – С. 54–60.
8. *Щербата И.Р., Матийцив Н.П., Черник Я.И.* Генетический анализ нейродегенеративных мутантов *Drosophila melanogaster* по X – хромосоме, индуцированных этилметансульфаном и нитрозэтилмочевинной // Генетика, 2004. – Т. 40, № 9. – С. 1280–1285.
9. *Greenspan R. J.* Fly puhsing. The Theory and practice of *Drosophila* genetics // Gold Spring harbor Lab. Press., NY, USA. – 1997. – P. 23–46.
10. *Heisenberg M., Bohl K.* Isolation of anatomical brain mutants of *Drosophila* by histological means. *Z. Naturforsch [C]*. – 1979. – vol. 34.
11. *Paul A., Hardy I.* Genetic aspects of nervous system development // *J. neurogenetics*. – 1990. – vol. 6. – P. 115–131.

Резюме

У проведених дослідках вивчалась дія лазерного випромінення та фармакологічного препарату церебралу на дегенеративні та регенеративні процеси у структурі головного мозку нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*. Церебрал призводив до відтермінування появи змін у тканині мозку на 6 – 7 днів у мутантів з ранньою дегенерацією; дія лазерного випромінювання такого результату не виявила. Регенеративні процеси після прояву мутантного фенотипу не спостерігалися.

В проведених опытах изучалось действие лазерного излучения и фармакологического препарата церебралу на дегенеративные и регенеративные процессы в структуре головного мозга нейродегенеративных мутантов *D. melanogaster*. Церебрал приводил к отсрачиванию появления изменений в ткани мозга на 6 – 7 дней у мутантов с ранней дегенерацией; действие лазерного излучения такого результата не обнаружило. Регенеративные процессы после проявления мутантного фенотипу не наблюдались.

The influence of laser radiation and pharmacological preparation cerebral was studied on degenerative and regenerative processes in the brain structure of neurodegenerative mutants of *D. melanogaster*. Cerebral causes delaying of changes into brain tissues of mutant with early degeneration for 6 - 7 days; the influence of laser radiation doesn't cause the same results. The regenerative processes after appearance of mutant phenotype weren't observed.

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*

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ХРОМОСОМНОГО АППАРАТА ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ, ДО И ПОСЛЕ МУТАГЕННОЙ НАГРУЗКИ МИТОМИЦИНОМ С IN VITRO

Изучение стабильности функционирования генетического аппарата у человека является одним из фундаментальных вопросов современной цитогенетики, в связи с тем, что повреждения генома могут составлять основу нарушений иммунной системы, развития канцерогенеза, снижения продолжительности жизни. Развитие методов современной генетики показало наличие большого количества спонтанных повреждений ДНК, возникающих под влиянием эндогенных причин, и только небольшая часть этих повреждений реализуется в конечные цитогенетические аномалии. Известно, что

спонтанные уровни aberrаций хроматидного, хромосомного и, особенно, геномного спектра в организме здоровых людей крайне низкие: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-5} на клетку соответственно. Поэтому, выявление индуцированных хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови может использоваться не только для определения наличия ионизирующего излучения, поглощенного организмом, но и в качестве биоиндикаторов при оценке радионуклидно-токсикогенно-геномного риска (RTG-risk) для здоровья людей и экологического здоровья в целом [7].

Спонтанный уровень мутагенеза является количественной характеристикой мутационного процесса, и подходить к его оценке следует с учетом всех вариаций. Для оценки показателя спонтанного мутагенеза у человека на хромосомном уровне используют лимфоциты периферической крови. Они равномерно распределены и находятся в одной фазе клеточного цикла (G_0), долгое время не делятся, сохраняя все перестройки, которые могли возникнуть во время действия различных факторов. Кроме того, не следует забывать, что контроль специфических структурных характеристик внутренней среды осуществляется именно иммунной системой, которая, при взаимодействии с другими системами организма, обеспечивает его гомеостаз [8].

Единая структурная основа наследственности определяет универсальный характер действия мутагенов на все виды живых организмов. В процессе индуцированного мутагенеза между ними есть позитивная корреляция, поскольку мутации являются результатом сложных взаимодействий между репликацией, рекомбинацией и случайными ошибками в работе репарационных систем. Следовательно, нестабильность хромосом в определенной мере отражает мутагенные процессы под воздействием факторов внешней среды.

Особый интерес представляют «дисгеномные эффекты», в частности, скрытая генетическая нестабильность, которая проявляется повышением чувствительности генома к дальнейшему действию различных мутагенов. Феномен геномной нестабильности характеризуется предрасположенностью к мультифакториальным заболеваниям, формированием вариантов с множественными аномалиями, повышением частоты возникновения хромосомных aberrаций и мутаций микросателлитассоциированных фракций ДНК [7].

В последние годы появились исследования, направленные на изучение роли генетических факторов в формировании многих заболеваний, в частности ревматических болезней суставов. Одним из таких заболеваний является остеоартроз (ОА) - наиболее частая форма поражения суставов, распространенность которого в популяции зависит от возраста, достигая максимальных значений в более зрелом возрасте [2, 4].

Согласно современным представлениям ОА - мультифакториальное заболевание со многими признанными факторами риска, в качестве которых рассматриваются возраст, пол, наследственная предрасположенность, избыточный вес и другие [3].

Поскольку кардинальным признаком ОА является прогрессирующая деструкция хряща, в котором коллаген тип II является наиболее распространенным компонентом, в ряде работ исследовался ген, кодирующий проколлаген тип II (COL2A1), локализованный на 12-й хромосоме, который действительно оказался сцепленным с ранним развитием ОА в семьях с частым обнаружением последнего в нескольких поколениях [5, 6]. Эти находки позволили высказать предположения, что и другие генетические дефекты при ОА локализируются вблизи этого маркера, а снижение прочности хряща может быть связано с мутациями в молекулах гена коллагена. В последние годы также были выявлены гены, которые оказывают влияние на формирование ОА, в частности ген кластера ИЛ-1, локализованный на хромосоме 2q13 [8]. Японскими учеными были идентифицированы 2 локуса, связанные с ОА - COL 9A3 связан с развитием ОА коленных суставов, COL 2A1 – с развитием коксартроза [10].

Таким образом, факторами риска ОА могут быть как внешнесредовые воздействия, так и семейно-генетические, но особенно очевиден комплексный характер этих воздействий на формирование данного заболевания.

В ГУ «Институт охраны здоровья детей и подростков АМН Украины» проводятся комплексные исследования, посвященные особенностям формирования ОА у детей и подростков. Одним из направлений изучения данного заболевания является изучение факторов наследственности в формировании ОА у подростков. Установлено семейное накопления заболеваний суставов, а также повышенный уровень хромосомных aberrаций (до 5,87%) у подростков, больных ОА [1].

Вполне закономерно, что выяснения вопроса о том, связано ли появление цитогенетических аномалий собственно с их индукцией или является показателем общей дестабилизации генетического материала, требует глубокого изучения индивидуальной, внутригрупповой изменчивости по комплексу цитогенетических характеристик. В связи с этим, проведение комплексного генетического мониторинга у подростков, больных ОА, является чрезвычайно важной и актуальной проблемой, что и определило необходимость проведения данного исследования.

Материалы и методы

Цитогенетическое исследование выполнено у 11 подростков обоего пола, больных ОА (основная группа), 16 практически здоровых сверстников (контрольная группа) 13-17 лет, которые обследовались в лаборатории медицинской генетики ГУ «ИОЗДП АМНУ». У всех обследованных пробандов проводили цитогенетическое исследование двух клонов лимфоцитов периферической крови. В одном флаконе культивировали клетки крови по стандартной схеме [9], в другом – с мутагенной нагрузкой (митомицином С).

Для оценки влияния мутагена на стабильность хромосомного аппарата у больных ОА на 67–м часу инкубации в культуру вносили митомицин С в конечной концентрации 3 мкг/мл на 5 часов. За 3 ч. до фиксации в культуру клеток добавляли колхицин в конечной концентрации 7,5 мкг/мл.

Окрашивание препаратов хромосом проводили рутинным методом, в случае выявления сложных хромосомных перестроек у пробандов осуществляли дифференциальное G-окрашивание. У всех обследованных анализировали от 50 до 100 метафаз до воздействия мутагеном, от 50 до 100 – после воздействия мутагеном. Всего у пробандов основной группы проанализировано 964 метафазные пластинки до воздействия мутагеном и 950 - после; в контрольной группе - 1468 метафазы до - и 1264 – после мутагенной нагрузки.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета программ Excel, “SPSS Statistics 17,0”.

Результаты и их обсуждение

Результаты цитогенетических исследований показали, что хромосомные aberrации (ХА) присутствовали как в клетках здоровых подростков, так и в клетках пробандов с ОА. У подростков основной группы спонтанный уровень aberrаций находился в пределах $5,91 \pm 0,06\%$, а у детей контрольной группы - $1,98 \pm 0,02\%$, что превышало частоту ХА в контроле ($p < 0,001$) почти в 3 раза.

У пробандов основной группы до проведения мутагенной нагрузки регистрировались aberrации нескольких типов – одиночные ($0,62 \pm 0,25\%$) и парные ($3,32 \pm 0,58\%$) фрагменты, нерасхождение ($0,10 \pm 0,10\%$) и преждевременное расхождение ($0,31 \pm 0,18\%$) сестринских хроматид, кольцевые хромосомы ($0,10 \pm 0,10\%$), полиплоидные клетки ($1,35 \pm 0,37\%$), тотальное повреждение хромосом ($0,10 \pm 0,10\%$). Наибольшая частота встречаемости мутаций в этой группе была зафиксирована только для aberrаций хромосомного типа: парных фрагментов и полиплоидных клеток.

В контрольной группе до мутагенной нагрузки встречались aberrации двух типов: одиночные и парные фрагменты, с частотой $0,61 \pm 0,20\%$ и $1,23 \pm 0,29\%$ aberrаций на клетку соответственно, а также полиплоидные клетки ($0,14 \pm 0,09\%$).

Сравнивая частоту ХА в группах пробандов до мутагенной нагрузки, мы установили достоверное увеличение частоты парных фрагментов ($p < 0,001$) и полиплоидных клеток ($p < 0,001$) у подростков с ОА. Высказывается предположение, что возникновение полиплоидных клеток, которые являются проявлением геномных нарушений в организме человека, обусловлено эндоредупликацией хромосом в клетках-предшественниках и может возникать вследствие формирования анафазных дицентрических мостов с последующим соединением митотически заблокированных дочерних ядер и удвоением хромосомного набора со всеми абберациями хромосомного набора в следующем митозе. Возможно, что при нормальном течении последующих митозов лимфоцитпрекурсоров с эндореплицированными хромосомами этот вид геномных нарушений будет трансформироваться в полиплоидию в зрелых первичных лимфоцитах.

Следовательно, изучение спонтанного уровня ХА до воздействия мутагеном у больных ОА, а также у подростков контрольной группы свидетельствовало о достоверном увеличении частоты ХА у пробандов с ОА. Вероятно, что причины формирования хромосомных перестроек в лимфоцитах периферической крови в группе больных ОА могут состоять в самом патогенезе болезни и зависеть от применяемой противовоспалительной нестероидной терапии.

Анализируя состояние хромосомного аппарата в изучаемых группах после мутагенной нагрузки митомицином С, мы выявили, что уровень хромосомных аббераций у больных ОА имел меньшие значения, чем у здоровых сверстников ($13,89 \pm 1,12\%$ и $17,79 \pm 1,08\%$ соответственно, $p < 0,05$). Следует отметить, что парные фрагменты и тотальное повреждение хромосом у больных ОА также регистрировались реже, чем у здоровых сверстников ($p < 0,01$ - $p < 0,001$). Одиночные фрагменты регистрировались с одинаковой частотой ($6,95 \pm 0,83\%$ у подростков с ОА и $6,96 \pm 0,72\%$ у здоровых сверстников).

Таким образом, сравнение реакции хромосомного аппарата лимфоцитов периферической крови на тестирующее мутагенное воздействие *in vitro* позволило установить, что подростки с ОА и здоровые сверстники оказались менее чувствительными к дополнительному мутагенному воздействию. Заключительный ответ на данный вопрос будет получен в результате более глубоких цитогенетических исследований.

Выводы

1. Уровень хромосомных аббераций у больных ОА составляет 5,91%, что превышает частоту ХА у здоровых сверстников в 3 раза (1,98%, $p < 0,001$).

2. У подростков основной группы уровень ХА после мутагенной нагрузки митомицином С не превышал частоту ХА у здоровых детей ($13,89 \pm 1,12\%$ и $17,79 \pm 1,08\%$, $p < 0,05$), что свидетельствует о генетической нестабильности генома подростков обеих групп.

Литература

1. Багацька Н.В., Нефідова В.Є. Цитогенетичні особливості у дітей та підлітків, хворих на остеоартроз // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія Біологія. – 2007. - Вип. 5, № 749. – С.40-45.

2. Коваленко В.М., Шуба Н.М. Ревматичні хвороби суглобів: медико-соціальні проблеми в Україні та шляхи їх вирішення // Укр. ревм. журн. – 2003. – №3 (13). – С. 3–6.

3. Колесник Т. В. Вариабельность минеральной плотности костной ткани и некоторых генетических маркеров при остеоартрозе коленных суставов // Автореф. дис.... канд. мед. наук. – М, 2006. – 29с.

4. Лебець І.С., Матвієнко О.В., Шевченко Н.С. Особливості суглобового синдрому у підлітків із початковими проявами остеоартрозу // Укр. ревматол. журнал. – 2006. – Т.23, №1. – С.69-72.

5. Насонова В.А. Проблема ОА в начале XI века // Consilium Medicum. – 2000. – Т.2, №6. – С. 244–248.

6. *Насонова В.А.* Остеоартроз колінного сугава: причини розвитку, діагностика и профілактика // Ревматологія. – 2003. – Т.5, №2. – С. 1-8.
7. *Педан Л. Р.* Радіоіндукований цитогенетичний ефект і його модифікація in vitro в лімфоцитах периферичної крові осіб, які постраждали від Чорнобильської аварії // Автореф. дис. ... канд. біол. наук. - К., 2005. – 19 с.
8. *Laughlin J., Dowling B., Mustafa L. et al.* // Arth. Rheum. – 2002. – Vol. 46. – P. 1519–27.
9. *Moorhead P.S., Nowell P.C., Mellman W.J.* Chromosomes preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood // Exper. Cell. Res. – 1960. – Vol.20. – P. 613–616.
10. *Iked T., Mabuchi A., Fakud A. et al.* // J. Bon. Min. Res. – 2002. – Vol. 17. – P. 1290–96.

Резюме

В роботі досліджено состояние хромосомного апарату у підлітків, больных остеоартрозом (ОА), и у здорових сверстників. Установлені закономірності спонтанного мутагенеза у всіх обстежених пробандів, виявлена скрита хромосомна нестабільність генома в ответ на мутагенну нагрузку митоміцином С.

У роботі досліджено стан хромосомного апарату у підлітків, хворих на остеоартроз (ОА), та у здорових однолітків. Встановлено закономірності спонтанного мутагенезу у всіх обстежених пробандів, виявлено приховану хромосомну нестабільність геному у відповідь на мутагенне навантаження митоміцином С.

The article presents the results of studying the chromosomal apparatus status in adolescents with osteoarthrosis, and in healthy age-matched adolescents. There were established certain regularities of the probands examined, and hidden chromosomal genome instability was revealed in response to mutagens load with mitomycin C.

БАРИЛЯК І.Р., ШКАРУПА В.М., НЕУМЕРЖИЦЬКА Л.В.

ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”,
040050, Київ, вул. Мельникова, 53

МОДИФІКУЮЧИЙ ВПЛИВ ГУМАТУ НАТРІЮ НА ГЕНОТОКСИЧНІСТЬ ТІОФОСФАМІДУ

Гумінові речовини відносяться до групи фізіологічно активних речовин. Показана їх участь в детоксикації, радіоадаптивній відповіді організму, стимуляції росту та розвитку рослин [1]. Адаптогенні властивості гуматів обумовили зацікавленість в дослідженні їх можливих антимуагенних властивостей. Виявлено генопротокторну активність гумінових сполук щодо дії ряду хімічних мутагенів (бенз[а]пірен, триаміноантрацен, 2-нітрофлуорен, 1-нітроперен, митоміцин С), пестицидів (малеїновий гідрозид), сумарної мутагенної активності забруднених ґрунтів [1-7]. Поряд з цим, гумати виявилися неефективними щодо мутагенності AF-2, 4-NQO, MN-NG [3]. Існують також дані про слабку мутагенність гумінових речовин [6-9], яку деякі автори пояснюють хлоруванням зразків гуматів протягом їх підготовки [7]. За даними інших авторів основним внесоком в слабку мутагенність гуматів може бути їх забрудненість поллюантами [9].

Метою роботи було дослідити вплив гумату натрію на генотоксичні ефекти, індуковані трифункціональним алкілюючим мутагеном – тіофосфамідом в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa L.*

Матеріали і методи

В якості модельної системи використовували кореневу меристему проростків насіння *Allium cepa L.* Досліджували вплив гумату натрію (100 мг/л) на генотоксичні

ефекти, індуковані тіофосфамідом (1 мг/л), при одночасній експозиції мутагену з модифікатором. Цитогенетичні ефекти досліджували в ана-телофазі першого поділу меристематичних клітин. Для оцінки застосовували ряд цитогенетичних параметрів рослинної тест-системи: мітотичний індекс (МІ, %), розподіл клітин по фазах мітозу, частота аберантних ана-телофаз (ЧАА, %). Ефективність дії гумату натрію оцінювали по редукційному фактору (РФ), який характеризує ступінь пригнічення хімічного мутагенезу під впливом модифікатора:

$$РФ = \frac{М - (АМ + М)}{М} \cdot 100 \%,$$

де М – частота аберантних ана-телофаз індукованих мутагеном; АМ + М – частота аберантних ана-телофаз при комбінованій дії мутагену і модифікатора. Результати експериментальних даних обробляли за загальноприйнятими статистичними методиками [10].

Результати та обговорення

Результати аналізу модифікуючого впливу гумату натрію на мітотоксичність тіофосфаміду представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Модифікуючий вплив гумату натрію на показники мітотичного індексу в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa L.*

Концентрація тіофосфаміду, мг/л	Концентрація гумату натрію мг/л	Проаналізовано клітин		M±m
		Всього	З них мітотичних	
0	0	9726	957	9,84±0,30
0	100	9102	1090	11,98±0,20
1	0	5265	448	8,13±0,46
1	100	6583	624	9,48±0,36

72 годинна експозиція з тіофосфамідом (1 мг/л) призводить до вірогідного ($p < 0,05$) зменшення МІ порівняно з контролем (8,13±0,46 та 9,84±0,30 відповідно). При цьому спостерігається дезінтеграція пулів мітотичних клітин за рахунок затримки на стадії метафази (рис. 1). Гумат натрію у концентрації 100 мг/л проявляв стимулюючий вплив на проліферативну активність клітин *Allium cepa L.* Поряд з вірогідним ($p < 0,05$) зростанням МІ (11,98±0,20) спостерігали збільшення профазного індексу при зменшенні частки клітин на стадії анафази і телофази. Враховуючи зростання мітотичної активності під впливом гумату натрію, збільшення профазного індексу свідчить не про затримку на стадії профазы, а про стимуляцію клітин до вступу в мітоз. При одночасній дії гумату натрію та тіофосфаміду, мітотоксичність останнього інгібується. При цьому значення МІ ,

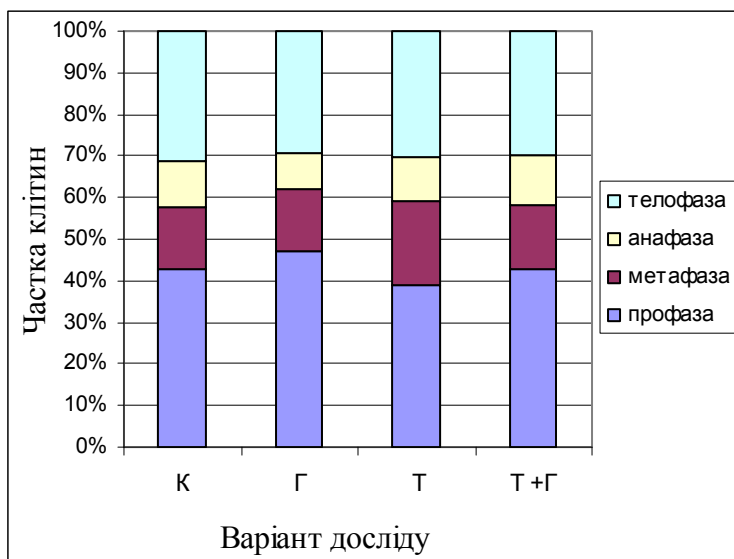


Рис. 1. Розподіл клітин *Allium cepa L.* по фазах мітозу. К – контроль; Г – експозиція з гуматом натрію; Т – експозиція з тіофосфамідом; Т+Г – одночасна експозиція з тіофосфамідом та гуматом натрію

Результати аналізу модифікуючого впливу гумату натрію на кластогенність тіофосфаміду представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Модифікуючий вплив гумату натрію на рівень аберантних клітин, індукованих тіофосфамідом

Концентрація тіофосфаміду, мг/л	Концентрація гумату натрію, мг/л	Всього ана-телофаз	Аберантних ана-телофаз	ЧАА ± Sp, %	РФ, %
0	0	1148	17	1,48±0,36	-
0	100	2388	47	1,97±0,21	-
1	0	994	212	21,33±1,30	-
1	100	850	109	12,82±1,15	39,9

72 годинна експозиція з гуматом натрію (100 мг/л) не призводить до вірогідного збільшення ЧАА. За умов пролонгованої експозиції з тіофосфамідом (1 мг/л) ЧАА збільшується в 14,41 разів порівняно з контролем. При одночасній експозиції гумату натрію з тіофосфамідом, мутагенний ефект останнього зменшується з 21,33±1,30 до 12,82±1,15 % аберантних ана-телофаз. РФ при цьому становить 39,9%.

Висновки

Гумат натрію (100 мг/л) інгібує мітотоксичність тіофосфаміду (1 мг/л) в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa L.* При цьому спостерігається нормалізація мітотичної активності по показникам: МІ та розподіл клітин по фазах мітозу (які при одночасній експозиції гумату натрію з тіофосфамідом, не відрізняються від контролю).

Література

1. Горвая А.И., Орлов Д.С., Щербенко О.В. Гуминовые вещества. – К. – 1995. – 303 с.
2. Горова А.І., Павличенко А.В. Зменшення токсико-мутагенної активності ґрунтів на території м.Жовті води з використанням гумінових сполук // Матер. міжнар. конф. : “Радіобіологічні ефекти: ризики, мінімізація, прогноз”, 22-24 березня 2005р. – Київ. – 2005. – С.120-121.
3. Sato T., Ose Y., Nagase H. Desmutagenic effect of humic acid // Mutat. Res. –1986. – 162, № 2. – P.173-178.

4. Marconi S., Angelucci R., Errichetti M. et. al. Humic acids from compost in antimutagenesis processes in soil // Fresenius Environ. Bull. – 2004. – Vol.13, № 12a. – P.1395-1397.
5. Ferrara G., Loffredo E., Senesi N., Marcos R. Humic acids reduce the genotoxicity of mitomycin C in the human lymphoblastoid cell line TK6 // Mutat. Res. – 2006. – 603, № 1. – P.27-32.
6. Use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 to analysis of genotoxicity/antimutagenicity of processed humic acids / Kubešová J., Turková V., Mikulcová A., Kučerík J., Márová I., Pekař M. // 34th Annual conference on yeast. Praha, 10-12 May 2006. – 2006. – P. 1186.
7. Cozzi R., Nicolai M., Perticone P., De Salvia R., Spuntarelli F. Desmutagenic activity of natural humic acids: inhibition of mitomycin C and maleic hydrazide mutagenicity // Mutat. Res. – 1993. – 299, № 1. – P.37-44.
8. Bernacchi F., Ponzanelli I., Minunni M., Falezza A., Loprieno N., Barale R. In vivo cytogenetic effects of natural humic acid // Mutagenesis. – 1996. – 11, № 5. – P.467-9.
9. Zhou S.W., Xu F.D., Li S.M., Song R.X., Qi S., Zhang Y., Bao Y.P. Major origin of mutagenicity of chlorinated drinking water in China: humic acid or pollutants // Sci. Total. Environ. – 1997. – 196, № 3. – P.191-196.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.

Резюме

Досліджували вплив гумату натрію (100 мг/л) на цитогенетичні ефекти тиофосфаміду (1 мг/л) в клітинах кореневої меристеми *Allium cepa* L. При дії тиофосфаміду спостерігається зменшення МІ, дезінтеграція пулів мітотичних клітин кореневої меристеми, збільшення частоти аберантних клітин (в 14,41 разів порівняно з контролем). Гумат натрію повністю інгібував мітотоксичність тиофосфаміду та на 39,9% зменшував частоту аберантних клітин, індукованих мутагеном.

Исследовали влияние гумата натрия (100 мг/л) на цитогенетические эффекты тиофосфамида (1 мг/л) в клетках корневой меристемы *Allium cepa* L. При действии тиофосфамида наблюдается уменьшение МИ, дезинтеграция пулов митотических клеток корневой меристемы, увеличение частоты аберантных клеток (в 14,41 раз в сравнении с контролем). Гумат натрия полностью ингибировал митотоксичность тиофосфамида и на 39,9% уменьшал частоту аберантных клеток, индуцированных мутагеном.

Investigated influence of sodium humate (100 mg/l) on cytogenetic effects of tiophosphamide (1 mg/l) of cells root meristem *Allium cepa* L. At action of tiophosphamide reduction MI, decomposition of pools mitotic cells root meristem, increase in frequency aberrant cells (in 14,41 times in comparison with the control) is observed. Sodium humate completely inhibit mitotoxic of tiophosphamide and on 39,9 % reduces frequency aberrant cells induced of mutagens.

БАРХАШ А.В.¹, ПЕРЕЛЫГИН А.А.², КОБЗЕВ В.Ф.¹, ПИЛИПЕНКО П.И.³, МЯСНИКОВА Н.Г.⁴, МОРОЗОВА О.В.⁵, БРИНТОН М.А.², РОМАЩЕНКО А.Г.¹, ВОЕВОДА М.И.^{1,6}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 10, e-mail: barkhash@rambler.ru

² Университет штата Джорджия, Атланта, США,

³ Новосибирский государственный медицинский университет, 630091, Новосибирск, Красный пр-т, 52

⁴ Муниципальный научно-практический неврологический центр, 630054, Новосибирск, ул. Костычева, 4

⁵ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, пр-т ак. Лаврентьева, 8

⁶ ГУ НИИ терапии СО РАМН, 630089, Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ 2'-5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТСИНТЕТАЗ ЧЕЛОВЕКА И ИХ СВЯЗЬ С ТЯЖЕЛЫМИ ФОРМАМИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Клещевой энцефалит (КЭ) – трансмиссивное природно-очаговое заболевание, вызываемое нейротропным РНК-содержащим вирусом из рода флавивирусов. Ежегодно регистрируется до 11000 случаев заболевания в России и до 3000 случаев в других европейских странах (Gritsun et al., 2003). В Сибирском федеральном округе эпидемиологическая ситуация по КЭ считается неблагоприятной - уровень заболеваемости более чем в 5 раз превышает среднероссийский (Онищенко и др., 2007).

Одна из характерных особенностей КЭ - сильно различающиеся клинические проявления заболевания: от легкой лихорадочной формы до тяжелых форм с поражением центральной нервной системы. У значительного числа индивидуумов заражение вирусом КЭ протекает бессимптомно (Иерусалимский, 2001). Предполагается, что развитие у человека определенной формы КЭ зависит в значительной степени от его врожденной степени восприимчивости к данному вирусу, т.е. от комбинации аллелей определенных генов человека, прямо или косвенно участвующих в защитных противовирусных реакциях организма.

Ранее было показано, что степень восприимчивости некоторых линий мышей к флавивирусам зависит от присутствия в геноме конкретных вариантов гена *oas1b* из семейства генов, кодирующих 2'-5'-олигоаденилатсинтеазы (2-5OAS). У восприимчивых линий мышей по сравнению с устойчивыми линиями образуется укороченный на 30% белок из-за нонсенс-мутации в 4-ом экзоне этого гена, приводящей к образованию терминирующего кодона (Perelygin et al., 2002; Mashimo et al., 2002). Поэтому гены, кодирующие 2-5OAS (*OAS*-гены), были выбраны в качестве генов-кандидатов для определения возможных факторов наследственной восприимчивости/устойчивости человека к КЭ.

OAS-гены относятся к индуцируемым интерферонами генам и являются важнейшим звеном ранней внутриклеточной противовирусной защитной реакции организма (Samuel, 2001). 2-5OAS, используя в качестве субстрата АТФ, катализируют полимеризацию АМФ с образованием 2'-5'-олигоаденилатов (2-5A), которые взаимодействуют с латентной эндорибонуклеазой L (RNASEL) и вызывают ее димеризацию и активацию. Активированная RNASEL гидролизует одноцепочечные РНК, что приводит к деградации как клеточной, так и вирусной РНК и к подавлению размножения вируса (Justesen et al., 2000). Активность 2-5OAS многократно увеличивается в присутствии двухцепочечной РНК, появляющейся в пораженных вирусом клетках.

У человека известно 3 *OAS*-гена, продукты которых обладают соответствующей ферментативной активностью - *OAS1*, *OAS2* и *OAS3*, расположенные кластером на хромосоме 12. Они кодируют разные формы 2-5OAS-белков - малую, среднюю и большую. Несмотря на относительное структурное сходство ферментов, они отличаются компарментализацией в клетке, конформацией и количеством дцРНК, необходимым для их активации. Кроме этих генов, описан ген *OAS-Like*, локализованный также на хромосоме 12 и высокогомологичный им, но продукт которого не обладает ферментативной активностью (Hovanessian, Justesen, 2007; Justesen et al., 2000).

Известны отдельные разрозненные исследования по установлению генетических основ восприимчивости человека к КЭ (Иерусалимский, 2001; Гончарова и др., 2006; Бархаш и др., 2006; Kindberg et al., 2008). В данной работе нами в качестве генетических маркеров были выбраны 23 однонуклеотидных полиморфизма (ОНП), локализованные в различных районах внутри генов *OAS1* (6 ОНП), *OAS2* (8), *OAS3* (7) и *OAS-Like* (2). Настоящее исследование посвящено изучению возможного влияния выбранных ОНП *OAS*-генов на клинические особенности течения КЭ у человека.

Материалы и методы

Были исследованы образцы ДНК не родственных между собой русских жителей г. Новосибирска, перенесших КЭ и проходивших лечение в стационарах (преимущественно в 2002-2007 гг.). Всего было изучено 142 образца ДНК пациентов, перенесших различные формы КЭ, из которых 38 человек – перенесших лихорадочную форму (ЛФ) КЭ, 64 – менингеальную форму (МФ) КЭ и 40 – тяжелые формы (ТФ) КЭ, включая менинго-энцефалитическую, полиоэнцефалитическую и менинго-энцефало-полиомиелитическую. Для минимизации влияния внешних факторов на фенотипические проявления заболевания (клиническую форму) использовали образцы ДНК только тех лиц, которые не подвергались вакцинации до начала заболевания или введению гамма-глобулина после укуса клещом. В качестве контрольной группы использовали популяционную выборку русских жителей г. Новосибирска (265 человек).

Выделение ДНК из крови проводили с помощью депротеинизации фенолом и хлороформом. Для определения генотипов использовали метод дискриминации аллелей с помощью TaqMan-наборов (Applied Biosystems, США), а также ПЦР и последующий рестрикционный анализ.

Сравнение частот генотипов и аллелей между выборками по каждому из изученных ОНП проводили по критерию χ^2 с помощью программы SPSS 11.0. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $P < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Первичный скрининг для определения возможной связи выбранных ОНП с особенностями течения КЭ был проведен с использованием образцов ДНК перенесших КЭ в 2002-2005 гг. (91 человек, из которых 31 – ЛФ, 34 – МФ и 26 – ТФ). Были определены частоты генотипов и аллелей по каждому из 23 ОНП у больных ТФ по сравнению с больными ЛФ, МФ и объединенной группой больных ЛФ+МФ. Далее по тем из ОНП, для которых были выявлены статистически достоверные различия ($P < 0.05$) по частотам определенных генотипов и/или аллелей между группами, для подтверждения полученных результатов были дополнительно изучены образцы ДНК перенесших КЭ в 2006-2007 гг. (51 человек, из которых 7 – ЛФ, 30 – МФ и 14 – ТФ).

Поскольку все исследованные пациенты не были иммунизированы, то лиц, перенесших ТФ с поражением структур спинного и головного мозга, мы рассматриваем как генетически предрасположенных к КЭ, а лиц, перенесших более легкие лихорадочную и менингеальную формы - как относительно генетически устойчивых к КЭ.

В образцах ДНК пациентов 2002-2007 гг. статистически достоверных различий по частотам генотипов и аллелей ОНП генов *OAS1* и *OAS-Like* между больными ТФ и больными ЛФ, МФ, ЛФ+МФ, а также контролем выявлено не было. Достоверные различия были обнаружены для 5-ти ОНП, локализованных в пределах генов *OAS2* и *OAS3*: 3-м ОНП гена *OAS2* - rs1293762, rs15895 и rs1732778, и 2-м ОНП гена *OAS3* - rs2285932 и rs2072136. При этом для ОНП rs1732778 гена *OAS2* и rs2072136 гена *OAS3* были выявлены высокодостоверные различия ($P < 0.01$) по определенным генотипам или аллелям.

ОНП rs1293762 гена *OAS2* располагается в середине 2-ого интрона, вдали от сайтов сплайсинга мажорных изоформ мРНК. ОНП rs1732778 располагается в 3'-фланкирующей области гена *OAS2*. Поэтому их возможная роль не ясна. Возможно, что эти ОНП входят в состав каких-то регуляторных элементов; не исключено также, что они могут быть сцеплены с каким-то иным функционально значимым полиморфизмом. ОНП rs15895 гена *OAS2*, локализованный в 11-ом экзоне гена *OAS2*, в случае аллеля А приводит к образованию стоп-кодона трансляции, а в случае аллеля G – к триптофану в позиции 720 изоформы p71 белка и к удлинению его на 8 аминокислот.

ОНП rs2285932 (Ple438Ile) и rs2072136 (Ser567Ser) располагаются соответственно в 6-ом и 8-ом экзонах гена *OAS3*; замены являются синонимичными. Вопрос о значении таких ОНП до конца не ясен. Можно предположить, что синонимичная замена в

кодирующей части гена оказывает влияние на регуляцию пост-транскрипционных событий с предшественниками мРНК.

Выводы

Таким образом, для 5-ти из 23 изученных ОНП *OAS*-генов выявлены статистически достоверные различия по определенным генотипам и/или аллелям между больными ТФ и больными ЛФ, МФ, ЛФ+МФ и/или контролем. Эти результаты с увеличением выборки образцов ДНК больных сохраняются. Выявленные генетические различия среди больных с различными клиническими формами КЭ свидетельствуют о влиянии этих 5-ти ОНП *OAS*-генов на формирование индивидуальной восприимчивости к вирусу КЭ у русских.

Литература

1. Бархаш А.В., Кобзев В.Ф., Пилипенко П.И., Богданова Ю.О., Морозова О.В., Ромащенко А.Г., Воевода М.И. Изучение возможной связи полиморфизмов интерферон-индуцируемых генов человека *OAS1*, *OAS3*, *EIF2AK2* и *RNASEL* с особенностями течения клещевого энцефалита // Информационный вестник ВОГиС.- 2006.- Т.10, №3.- С.565-571.
2. Гончарова И.А., Фрейдин М.Б., Рудко А.А., Напалкова О.В., Колоколова О.В., Ондар Э.А., Дунаева Л.Е., Белобородова Е.В., Пузырев В.П. Геномные основы подверженности к инфекционным заболеваниям // Информационный вестник ВОГиС.- 2006.- Т. 10, №3.- С.540-552.
3. Иерусалимский А.П. Клещевой энцефалит (Руководство для врачей). - Новосибирск: Государственная медицинская академия МЗ РФ.- 2001.- 360с.
4. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Пакскина Н.Д. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом и меры по его профилактике в Российской Федерации // Вопросы вирусологии.- 2007.- Т. 52, № 5.- С.8-10.
5. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis // Antiviral Research.- 2003.- Vol. 57, № 1-2.- P.129-146.
6. Hovanessian A.G., Justesen J. The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: Unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation // Biochimie.- 2007.- Vol. 89, Issues 6-7.- P.779-788.
7. Justesen J., Hartmann R., Kjeldgaard N.O. Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family // Cellular and Molecular Life Sciences.- 2000.- Vol. 57, № 11.- P.1593-1612.
8. Kindberg E., Mickiene A., Ax C., Akerlind B., Vene S., Lindquist L., Lundkvist A., Svensson L. A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis // Journal of Infectious Diseases.- 2008.- Vol. 197, № 2.- P.266-269.
9. Mashimo T., Lucas M., Simon-Chazottes D., Frenkiel M.P., Montagutelli X., Ceccaldi P.E., Deubel V., Guenet J.L., Despres P. A nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice // PNAS.- 2002.- Vol.99, № 18.- P.11555-11557.
10. Pereygin A.A., Scherbik S.V., Zhulin I.B., Stockman M., Li. Y., Brinton M.A. Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene // PNAS.- 2002.- Vol. 99, № 14.- P. 9322-9327.
11. Samuel C.E. Antiviral actions of interferons // Clinical Microbiology Reviews.- 2001.- Vol. 14, № 4.- P.778-809.

Резюме

Определены частоты генотипов по 23-м ОНП 4-х *OAS*-генов у неиммунизированных больных различными формами клещевого энцефалита. Обнаружены статистически достоверные различия между больными тяжелыми и легкими формами по частотам генотипов 5-ти ОНП генов *OAS2* и *OAS3*; вероятно, эти ОНП оказывают влияние на формирование предрасположенности к вирусу клещевого энцефалита у русских.

Genotypic frequencies for 23 SNPs of *OAS*-genes were estimated in samples of the nonimmunized tick-borne encephalitis patients with different clinical manifestations. Statistically significant differences of genotype frequencies for 5 *OAS3* and *OAS2* gene SNPs between patients with severe and mild forms of the disease were detected; we suggest that these SNPs may influence on the susceptibility to tick-borne encephalitis virus at Russians.

**БЛОШИЦЬКА А.В.,¹ ПІСКУН Р.П.,¹ ГОРБАТЮК С.М.,¹ МРИХ Н.М.,¹
БЛОШИЦЬКИЙ В.В.,² ПІСКУН І.І.,¹ РОМАШКІНА О.А.,¹ ЦИБА Л.О.,³ ШЕВЧУК
Т.І.¹**

*1- Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова
Україна, 21018, Вінниця, вул. Пирогова, 56, e-mail: piskyn2006@mail.ru*

2- Інститут нейрохірургії АМН України

*3- Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного, 150*

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ

Загальновідомий тісний взаємозв'язок між розвитком серцево-судинних розладів, дисліпідемій і проявами змін у внутрішніх органах. Так, дисліпідемії та атеросклероз є важливими етіологічними факторами порушення мозкового кровотоку та причиною виникнення інсульту [2;7]; атеросклероз – ключовий елемент в розвитку ішемічної хвороби серця і окклюзивних захворювань судин, що є причиною порушення коронарного кровообігу та виникнення інфаркту міокарда [1;5]; дисліпідемії часто зустрічаються у хворих хронічною нирковою недостатністю, а ліпідний профіль сироватки крові в значній мірі залежить від рівня клубочкової фільтрації і ступеня протеїнурії [4]; ожиріння, артеріальна гіпертензія і дисліпідемії проявляються неалкогольною жировою хворобою печінки і в даний час розглядаються як печінкова маніфестація метаболічного синдрому [10]; дисліпідемія викликає ендотеліальну дисфункцію, що погіршує обмінні процеси в щитоподібній залозі, що проявляється зниженням її функціональної активності [11]. Профілактика атеросклерозу входить в загальнодержавні медичні рекомендації більшості країн, а програмою корекції дисліпідемій, прийнятою ВООЗ, керується весь світ. До арсеналу терапії дисліпідемій відносяться препарати різних фармакологічних груп: ентеросорбенти, статини, фібрати, похідні ксантинів тощо, але, на жаль, жоден з них не задовольняє потреби практичної медицини, бо кожен діє лише на одну певну ланку патогенезу дисліпідемій та атеросклерозу. При прояві клінічних ознак атеросклерозу можна загальмувати його прогресування, а в деяких випадках, і викликати зворотній розвиток атеросклеротичних змін. Для цього використовують засоби, які знижують вміст холестерину ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) і підвищують рівень ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) сироватки крові.

Відомо, що атеросклероз відноситься до мультифакторіальної патології, до розвитку якої, поряд з впливом навколишнього середовища, призводить спадковість. Ось чому чисельні клінічні та експериментальні способи профілактики та лікування цієї хвороби при використанні фармакологічних препаратів, що знижують рівень холестеролу, тригліцеридів та ЛПНЩ у крові, виявили, що це лише тимчасовий ефект - тільки під час прийому ліків [9]. В той же час немає надійних засобів, що збільшували б рівень антиатерогенних ЛПВЩ [3].

Результати великої кількості популяційних, клінічних та експериментальних досліджень свідчать, що існує зв'язок між наявністю мутацій окремих генів та порушеннями ліпідного обміну. Завдяки успіхам молекулярної біології було доведено, що однією з причин порушень ліпопротеїдного обміну є мутації гена Апо-Е – гена головного

білка ЛПВЩ [6], які мають антиатеросклеротичні функції. Аполіпопротеїн Е – одноланцюговий білок, що складається з 299 амінокислотних залишків. Апо-Е входить до складу різноманітних класів ліпопротеїнів плазми. Апо-Е відіграє важливу роль в метаболізмі, транспорті та регуляції рівня холестеролу та тригліцеридів. Попередник Апо-Е підлягає внутрішньоклітинному протеолізу і глікозилюванню (сіалізації), а також позаклітинній десіалізації. Наслідком цих пострасляційних змін є утворення головної асіало-форми Апо-Е протеїну, яка циркулює в плазмі у складі ліпопротеїнових комплексів. В складі ліпопротеїнів, що містять високі рівні тригліцеридів, таких як ЛПНЩ та хіломікрони, Апо-Е виконує функцію ліганда, що забезпечує ефективне зв'язування ліпопротеїнів з рецепторами та захоплення клітинами печінки, внаслідок чого досягається видалення надлишку тригліцеридів з плазми. Результати досліджень вказують на значення цього білка в регуляції синтезу ЛПДНЩ-тригліцеридів в печінці [8]. Головне місце синтезу Апо-Е – печінка.

Метою нашого дослідження стало встановлення особливостей змін структури і функції серця, щитоподібної залози, печінки і нирок при експериментальному атеросклерозі під впливом генної терапії направленої на експресію гена Апо-Е.

Матеріал та методи

Експеримент проводився на білих лабораторних щурах-самцях з вихідною масою тіла 150-170 грамів, які утримувались на стандартному раціоні в умовах науково-експериментальної клініки ВНМУ ім. М.І. Пирогова. Щурі були розділені на три групи: перша – інтактні, друга – тварини, яким моделювався атеросклероз, третя – щурі, яким з профілактичною метою в перший день моделювання атеросклерозу вводили ген апо-Е. Атеросклероз моделювався за методом Анічкова, шляхом згодовування щурам холестеролу в дозі 0,5г на кг з соняшниковою олією протягом 30 діб. По закінченню досліду евтаназію тваринам проводили під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Після розтину тіла кров для біохімічного дослідження забирали з черевної аорти, а щитоподібна залоза, серце, печінка і нирки забирались для морфологічного дослідження. Макрометричні параметри нирки (довжина, ширина, товщина) та воріт (висота, ширина) вимірювались за допомогою штангенциркуля. В серці вимірювали наступні макроморфометричні показники: абсолютну масу правого (ПШ) і лівого (ЛШ) шлуночків, площу стінок ЛШ і ПШ, а також площу правої та лівої стінок міжшлуночкової перегородки (МШП). Крім того розраховували планіметричний індекс, питому вагу міокарда ЛШ і ПШ, індекс питомої ваги, індекс Фултона, шлуночковий індекс. Проводились розрахунки індексів всіх органів.

Створення векторних конструкцій для генної терапії

В роботі були використані кДНК гена Апо-Е людини, субклонована в вектор pUC18, представлена професором G.Dickson і дослідником T.Athanasopoulos (факультет біохімії Королівського Лондонського університету, Великобританія) і вектор pCMV•SPORT6 («Invitrogen», США), який має цитомегаловірусний промотор і сигнал поліаденілування SV40, що дозволяє експресувати клоновану в ньому послідовність ДНК в еукаріотичних клітинах. кДНК гена Апо-Е переклонували у вектор pCMV•SPORT6, по сайтах рестриктаз SmaI і Sall, вектор обробляли рестриктазами HindIII і Sall, при цьому кінці ДНК після обробки рестриктазою HindIII затуплювали за допомогою фрагмента Кленова. Отриману конструкцію pCMV•SPORT6-Апо-Е виділяли в препаративних кількостях методом лужного лізису, використовуючи реактиви і колонки тір 500 фірми «Qiagen» (США).

Оцінка ефективності трансфекції

Ефективність трансфекції оцінювалась із застосуванням методу зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) в зразках тканини печінки, отриманих на 10 добу експерименту. Оскільки RT-PCR являється методом діагностики наявності відповідної мРНК, а присутність мРНК відображає експресію відповідного гена, то по наявності в тканині печінки Апо-Е-мРНК можна оцінити

ефективність його експресії в клітинах печінки перенесеного вектором гена аполіпротеїну Е. Підбір праймерів для ампліфікації гена, якого вивчали, проводився з обліком їх видової унікальності, тобто при забезпеченні мінімального співпадання послідовності ДНК людини і щура на ділянці гена, якого вивчали. Аполіпопротеїни людини і щура відрізняються послідовністю з приблизно 30% амінокислот з карбоксильного кінця. Нуклеотидні послідовності відповідної ділянки людського гена Апо-Е були відібрані як мішені для ампліфікації при проведенні ПЛР. Були використані дві пари праймерів для ампліфікації Апо-Е-гена з метою посилення специфічності реакції і виключення випадкової контамінації вивченими продуктами. Візуалізація продуктів ампліфікації (295 п.н. і 180 п.н. відповідно для першої в другій пари праймерів) проводилась за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі.

Результати та обговорення

Отримані результати біохімічного дослідження ліпідного спектра крові сироватки щурів з експериментальним атеросклерозом без корекції, порівняно з показниками групи інтактних тварин (таблиця), показали зростання вмісту загального холестеролу – більше, ніж в 3 рази, холестеролу бета-ліпопротеїнів – в 10 разів, загальних ліпідів – майже в 2 рази, індексу атерогенності – майже в 8 разів; зниження величини холестеролу альфа-ліпопротеїнів на 26,1%, холестеролу пре-бета-ліпопротеїнів на 57,2%, тригліцеридів на 42,7%.

Таблиця.

Показники ліпідного обміну сироватки крові щурів (M±m)

Показники	Групи тварин		
	Інтактні	Атеросклероз	Профілактика
Загальний холестерол, Ммоль/л	1,435±0,025	4,563±0,203	3,282±0,444
Холестерол α-ліпопротеїнів Ммоль/л	0,680±0,025	0,503±0,026	0,655±0,105
Холестерол пре-β-ліпопротеїнів Ммоль/л	0,451±0,029	0,193±0,008	0,226±0,025
Холестерол β-ліпопротеїнів, Ммоль/л	0,309±0,03	3,866±0,02	2,400±0,02
Індекс атерогенності	1,127±0,042	8,280±0,641	4,084±0,117
Тригліцериди, Ммоль/л	0,985±0,065	0,421±0,017	0,493±0,055
Загальні ліпіди, Ммоль/л	3,64±0,08	6,26±0,06	5,48±0,20

В групі щурів, яким проводилась корекція змодельованої патології, вміст холестеролу альфа-ліпопротеїнів тільки на 3,5% відрізнявся від аналогічного показника інтактних тварин, а всі інші показники ліпідного обміну сироватки крові, що вивчались, проявили тенденцію до нормалізації. Результати електрокардіографічних досліджень засвідчили, що у більшості щурів другої групи на електрокардіограмах переважають реакції тахікардічного типу: порівняно з інтактними тваринами збільшується на 5, 01% частота серцевих скорочень на 15,38% скорочується тривалість інтервалу PQ, на 16,0% - інтервалу QRS, на 5,6% - інтервалу R-R. Змінюється амплітуда зубців: збільшується на 1,53% у зубця R, на 2,9% у зубця T, та зменшується на 22,69% у зубця S. У щурів третьої групи дані електрокардіографії показали менше відхилень від аналогічних значень інтактних тварин. Знижувались біохімічні показники функціональної активності щитоподібної залози, печінки і нирок.

Органна макроморфометрія показала, що в серцях щурів другої групи збільшується абсолютна маса серця на 3,7%, абсолютна маса ЛШ – на 7,12%, ПШ – на 4,7%, зростає питома вага міокарду ЛШ, серцевого індексу, знижується планіметрично-ваговий індекс,

що свідчить про гіпертрофію. За умов генної терапії, направленої на індукцію синтезу аполіпропротеїну-Е в третій групі тварин більшість макрометричних показників серця проявляли тенденцію до нормалізації. Стереометричні дослідження нирок засвідчили зменшення більшості її параметрів у щурів другої експериментальної групи та тенденцію до нормалізації у щурів третьої групи. Аналогічна закономірність була виявлена у відношенні печінки і щитоподібної залози.

Висновки

При експериментальному холестеринівому атеросклерозі у щурів виявляються дисліпопротеїдемія сироватки крові та явища метаболічного синдрому: в серцевому м'язі виявлені порушення, що свідчать про наявність ішемії, гіпоксії, порушеннях коронарного кровообігу і структури кардіоміоцитів. В щитоподібній залозі, печінці та нирках наявні ознаки гіпофункції. Введення гена Апо-Е, викликаючи синтез відповідного продукту, забезпечує транспорт і регуляцію рівня холестеролу і ліпопротеїнів сироватки крові, і як наслідок тенденцію до нормалізації структури і функції вивчених органів.

Література

1. *Akishita M.* Artherosclerosis and hyperlipidemia // *JMAJ: Jap. Med. Assoc. J.* - 2004. - Vol. 47, № 4. - P. 175 - 178.
2. *Коваленко В.М., Дорогой А.П.* Смертність та інвалідність населення внаслідок серцево-судинних та серцево-мозкових захворювань - проблеми сучасності // *Укр. кардіол. журн.* - 2003. - №6. - С.9 - 13.
3. *Кордюм В.А.* Генотерапія атеросклерозу//*Теоретична медицина*, 10, 2, 2004. – С.121.
4. *Курята А.В., Фролова Е.А.* Влияние омега-3 ПНЖК на липидный обмен и функцию эндотелия сосудов у пациентов с хронической болезнью почек. // *Здоров'я України.* – 2009. - № 3(208). – С.35.
5. *Лутай М.И.* Нарушения липидного спектра: клиническое значение // *Doctor.* - 2004. - №1. - С. 54 - 58.
6. *Machlej R.W.* Apolipoprotein E cholesterol transport protein with expanding role in cell biology // *Science.* – 1988. – V. 240, № 4852. – P.622-630.
7. *Stegmayr B., Asplund R.* Stroke in Northern Sweden. *Scand // Public Health Supple.* - 2003. - Vol. 61, № 7. - P. 60 – 69
8. *Teusink B., Mensenkamp A.R., van der Boom H.* et al. Stimulation of the in vivo production of very low density lipoproteins by apolipoprotein E is independent of the presence of the low density lipoprotein receptor // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276, №44. – P. 10693-40697.
9. *Терещенко О.С.* Крестор – нова ера в лікуванні атеросклерозу//*Українська Медичинська Газета*, №5, 2006, с. 28-29.
10. *Ткач С.М.* Распространенность, течение, диагностика и стратегии лечения неалкогольной жировой болезни печени// *Здоров'я України.* – 2009. - № 1-2 (206-207). – С.63-65.
11. *Федченко Н.Н., Бондаренко А.А., Гарец В.И.* Современные аспекты структурно-Функциональной организации щитовидной железы.// *Український морфологічний альманах.* – 2008. – Том 6, №1. – С. 161-164.

Резюме

В роботі представлені результати біохімічного дослідження ліпідного спектру крові, електрокардіографії та макроморфометричного вивчення серця, щитоподібної залози, печінки та нирок при експериментальному холестеринівому атеросклерозі у щурів-самців в умовах генної корекції. Виявлено, що корекція дає позитивні результати.

В работе представлены результаты биохимического исследования липидного спектра крови, электрокардиографии и макроморфометрического изучения сердца, щитовидной железы, печени и почек при экспериментальном холестеринивом атеросклерозе у крыс-самцов в условиях генной коррекции. Обнаружено, что коррекция дает положительные результаты.

The results of the biochemical study of lipid spectrum of blood, thyroid gland, liver and kidneys in the male-mice in the experimental cholesterol atherosclerosis under the conditions of the gene correction are evaluated in this article. This correction is discovered to have the positive results.

БОДНАР Л.С., ГОРБУЛІНСЬКА С.М., ЩЕРБАКОВ С.М., БОДНАР І.В.

Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, Львів, вул. Грушевського 4, e-mail: Gorbulinska@mail.ru

ДОЦІЛЬНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ПРИРОДНИХ СОРБЕНТІВ ДЛЯ ЗНЯТТЯ МУТАГЕННИХ ФОНІВ ВОДНИХ ЗРАЗКІВ, ВІДБРАНИХ ПОБЛИЗУ СМТ.СОСНІВКА ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Забруднення мутагенами ґрунтових і поверхневих вод, які є джерелами водопостачання, не може не впливати на якість питної води. Об'єктом дослідження були водні стоки породних відвалів Центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ), яка знаходиться приблизно в 3-х км від смт. Соснівка Сокальського району Львівської області. На ЦЗФ збагачується бідне вугілля з усіх шахт району, тому в породі представлені практично всі елементи таблиці Менделєєва, причому в різних формах. Ситуація ускладнена великою наявністю піриту (біля 1%) і сильною кислотністю стоків (рН 3,4 – 4,6). В зв'язку з цим спостерігається досить різкий сплеск захворювання серед населення смт. Соснівка та оточуючих сіл, зокрема на флюороз, гіпоплазію та ін.[1].

В роботі проаналізовані такі зразки водних стоків породних відвалів ЦЗФ:

- стік з терикону ;
- вода з дренажної канами ;
- вода з ставку біля терикону ;
- вода з озера біля с. Межиріччя ;
- питна вода смт. Соснівка;
- технічна вода;

Генотоксичне забруднення зразків вивчали в тесті Еймса на *Salmonella typhimurium* для виявлення індукції генних мутацій[4], методом соматичних мутацій та рекомбінацій на *Drosophilla melanogaster* [3] та методом домінуючих летальних мутацій на *Drosophilla melanogaster*[5].

При обстеженні води з території смт. Соснівка виявлено індукцію мутагенної активності на різних штаммах *Salmonella typhimurium* в тесті Еймса. Результати подані у таблиці 1.

Таблиця 1.

Індукція генних мутацій в тесті Еймса на штамі TA-98 *Salmonella typhimurium*

Зразки	Кількість колоній ревертантів			\bar{X}	$\frac{\bar{X}_g}{\bar{X}_k}$	Мутагенність, бали
	X1	X2	X3			
Стік з терикону	389	365	310	354,7	10,7	2
Ставок біля терикону	180	211	223	205	4,2	1

Вода з дренажної канави	207	359	402	323	7,0	1
Озерце біля с. Межиріччя	520	832	783	712	15,3	2
Контроль	36	40	25	33,6		

На штамі ТА 98 рівень мутагенної активності води дренажної канави і ставка біля терикону можна оцінити 1 балом, реверсія до прототрофності здійснювалась від 4 до 7 разів більше в порівнянні з контролем. Найвищі показники індукції генних мутацій виявлено при дослідженні води з озера біля с. Межиріччя та стоку з терикону, показники реверсії сягали від 10 до 15 разів в порівнянні з контролем, мутагенність в цьому випадку оцінюється 2 балами (табл. 1). Таким чином, виходячи з результатів генотоксикологічних досліджень на штамі ТА 98 *Salmonella typhimurium* в досліджених зразках містяться хімреагенти, які здатні викликати мутації за механізмом зсуву рамки зчитування.

Результати на штамі ТА 100 показали, що генотоксикологічною активністю володіє лише зразок з стоку з терикону. Мутагенність оцінюється 1 балом, індукція генних мутацій іде за механізмом заміни пар основ. Всі інші зразки на штамі ТА 100 показали мутагенність на рівні контролю.

Таблиця 2

Вплив природного сорбенту глауконіту на мутагенну активність водних зразків на штамі ТА-100 *Salmonella typhimurium*

Зразки	Кількість колоній ревертантів			\bar{X}	$\frac{\bar{X}_g}{\bar{X}_k}$	Мутагенність, бали
	X1	X2	X3			
Стік з терикону	108	89	58	85,0	0,87	0
Ставок біля терикону	99	79	65	81,0	0,83	0
Вода з дренажної канави	102	100	93	98,0	0,61	1
Озерце біля с. Межиріччя	98	101	86	95,0	0,84	1
Контроль	101	97	96	98		

При обстеженні генотоксикологічної активності зразків води відібраних поблизу смт. Соснівка виявлена їх мутагенна активність і на об'єкті *Drosophila melanogaster*. В тесті на домінуючі летальні мутації враховувались яйця з пізніми ембріональними летелями (кольорові), з домінуючими летальними мутаціями (матові) та ті, що не

розвинулись (прозорі). Зразки, взяті з с. Межиріччя та ставку біля терикону індукували число яєць з пізніми ембріональними летальними у 10 разів більше порівняно з контролем, та яєць з доміантними летальними мутаціями в кількості 13 з 810 досліджуваних яєць. При аналізі води зі ставка біля терикону виявлено 15яєць з доміантними летальними мутаціями з 935 проаналізованих. Інші зразки в даному досліді не проявляли генотоксичних ефектів

Позитивний генотоксичний ефект виявлений при обстеженні всіх водних зразків відібраних біля смт. Соснівка, що розташоване у районі вугільної промисловості. Для зменшення/зняття мутагенних фонів зразків використовували природний сорбент глауконіт, який має сорбційні та іоннообмінні властивості [2]. Виходячи з результатів досліджень можна зробити висновок, що глауконіт знімає мутагенний ефект приблизно у 2 рази (табл.2)

Таблиця 3

Індукція рекомбінації у соматичних клітинах *Drosophilla melanogaster*

№ п/п	Зразки	Загальна кількість досліджуваних самок	Кількість соматичних мозаїків	% соматичні мозаїки	p
1	Біля терикону б/с	856	15	1,76	>0,05
2	Біля терикону з/с	910	8	0,87	>0,05
3	с. Межиріччя б/с	936	21	2,24	>0,05
4	с.Межиріччя з/с	1020	13	1,27	>0,05
5	Біля канави б/с	628	3	0,47	>0,05
6	Біля канави з/с	734	2	0,27	>0,05
7	Стік з терикону б/с	631	21	2,06	>0,05
8	Стік з терикону з/с	825	16	1,93	>0,05
9	Питна вода с. Соснівка б/с	648	5	0,77	>0,05
10	Питна водас. Соснівка з/с	650	3	0,46	>0,05
11	Технічна вода б/с	995	9	0,90	>0,05
12	Технічна вода з/с	828	6	0,72	>0,05
13	Контроль	865	-	-	

Відомо, що з вугільної промисловості у навколишнє середовище потрапляє велика кількість різноманітних хімрегентів. Найбільш розповсюдженими є солі важких металів, фосфор, сірка, феноли, які несуть мутагенний вплив на біоту. Крім появи доміантних летальних мутацій виявлена індукція соматичних мутацій і рекомбінацій у *D. melanogaster* з появою мозаїчних особин. Найвищі показники індукції виявлено при дослідженні води з стоку з терикону - 1,76%, з с. Межиріччя – 2,24% та з ставку біля терикону – 2,06%. Добова експозиція досліджуваних зразків з природним сорбентом глауконітом показала

значне зменшення появи мозаїчних особин. У випадку зразка води до 0,87%, у випадку зразка з озера с. Межиріччя – 1%.

Таким чином, в результаті генотоксикологічних досліджень у тесті Еймса на *Salmonella typhimurium* показано, що водні стоки поблизу смт. Соснівка здатні індукувати генні мутації за механізмом зсуву рамки зчитування та заміни пар основ. На штамі ТА 98 найвищі показники індукції генних мутацій виявлено при дослідженні води з озера біля с. Межиріччя та стоку з терикону. На штамі ТА 100 мутагенність виявлена була лише на зразку з стоку з терикону. Методом індукції домінантних летальних мутацій на *Drosophilla melanogaster* показано, що досліджувані водні зразки здатні індукувати достовірне збільшення числа яєць з пізніми ембріональними летелями. В результаті виявлення індукції соматичних мутацій та рекомбінації на *Drosophilla melanogaster* показано, що дані водні зразки володіють мутагенною властивістю і здатні викликати появу мозаїчних особин. Найбільш мутагенними виявилась вода біля с. Межиріччя та стоку з терикону. Проведене дослідження щодо доцільності використання природного сорбенту глауконіту для зняття або зменшення мутагенних фонів водних стоків смт. Соснівка, показало, що глауконіт у співвідношенні 1: 1 здатний зменшувати мутагенність досліджуваних зразків на 50 - 60%. Отже, даний природний сорбент можна використовувати з метою покращення якості води завдяки своїм сорбційним та іоннообмінним властивостям.

Література

1. Екологія Львівщини 1944.М.: Держуправління екобезпеки Львівської області, 1995. - 43с.
2. *Тарасевич Ю.И.* Природные сорбенты в процессах очистки воды. - К.: Наукова думка, 1981. - 207с.
3. *Худорлей В. В.* Характеристика современных мутагенных тестов для выявления канцерогенов окружающей среды. // Успехи современной биологии – 1984 - 1989, 2(5). – С.177 - 183.
4. *Ames B.N* bacterial system for detecting mutagens and cancerogens // Mutagenis Effectof Evironmental Contaminats. Academic Press, New York, 1972. - P.56
5. *Литвинова Е. М., Шварцман П. Р.* Индукция поздних эмбриональных летелей в половых клетках дрозофилы при действии этиленимина. – В сб.: Химический мутагенез. – Л.: Мысль, 1974, С. 117 – 120.

Вивчена генотоксична активність водних стоків породних відвалів Центральної збагачувальної фабрики смт. Соснівка Львівської області та виявлена доцільність використання природного сорбенту глауконіту для зняття мутагенної активності.

Изучена генотоксическая активность водных стоков породных отвалов Центральной обогатительной фабрики пгт. Сосновка Львовской области, а также показана целесообразность использования естественного сорбента глауконита для снятия мутагенной активности.

The genotoxic activity of water samples from Central plant of Sosnivka, Lviv was investigated. The effectivity of exploitation of natural sorbent, glauconit, for reducing of mutagenic activity was shown.

ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О.

ДУ «Інститут спадкової патології АМН України»,

Україна, 79000, м.Львів, вул.Лусенка 31а, e-mail: berezovska.s@gmail.com

ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ ДІЇ РАДІАЦІЇ ДЛЯ СІМЕЙ ЛІКВІДАТОРІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС, ЯКІ ПРОЖИВАЮТЬ В ЕКОЛОГІЧНО СПРИЯТЛИВОМУ РЕГІОНІ

Проблему Чорнобиля в першу чергу потрібно розглядати як проблему збереження здоров'я та генофонду нації за останні післяаварійні роки. Відомо, що іонізуюча радіація є причиною непліддя, невиношування вагітності, виникнення вроджених вад розвитку (ВВР), розумової відсталості, онкозахворювань і скорочення тривалості життя. Особливу увагу необхідно зосередити на стані репродуктивного здоров'я жінок, які зазнали впливу іонізуючого опромінення внаслідок аварії [1].

Інтегральним показником пошкоджуючої дії іонізуючого випромінювання, найбільш важливим для популяції, може бути порушення репродуктивної функції. Особливої уваги вимагають питання репродуктивного здоров'я жіночого організму, оскільки обмежена кількість яйцеклітин закладається у внутрішньоутробному періоді і генотоксичні впливи на них у цей період можуть призводити до необоротної втрати фертильності [2].

За даними авторів в Україні фіксується високий рівень частот вад невральної трубки у північно-західному регіоні (Рівненська та Волинська області), а найвищий рівень частоти вроджених вад розвитку спостерігається в усіх регіонах з підвищеним рівнем забруднення радіаційного та хімічного факторів [3,4].

У Білорусії, значна частина якої піддалася радіаційному забрудненню після катастрофи на ЧАЕС, спостерігалось статистично вірогідне збільшення випадків синдрому Дауна в січні 1987 року, але не підтвердились прогнози довготермінових трендів у підвищенні частоти цієї патології у забруднених регіонах [5].

Однією із найважливіших проблем прийдешніх років, на які потрібно буде звернути увагу є проведення серйозних наукових досліджень стану здоров'я дітей учасників ліквідації аварії, зокрема частоти вроджених вад розвитку та репродуктивного здоров'я жінок [6].

Матеріали і методи

В матеріал дослідження ввійшли дані щодо 134 сімей ліквідаторів та евакуйованих після катастрофи на ЧАЕС, що в даний час проживають у м. Львові. Мета роботи – оцінити додатковий генетичний ризик мутагенного впливу радіації для сімей учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС та евакуйованих в екологічно сприятливий регіон. Досліджувані сім'ї на даний час проживають у відносно екологічно сприятливому регіоні - м. Львові. Завданням роботи було порівняти репродуктивні характеристики, поширеність вроджених вад розвитку (ВВР) та антропометричні показники новонароджених із 134 сімей після переселення із радіоактивно забрудненого регіону до і після мутагенного навантаження.

У досліджуваних сім'ях батьки цих дітей були поділені на дві групи. До першої групи відносились учасники ліквідації наслідків аварії, до другої – евакуйовані із радіоактивно забруднених областей: Житомирська область – м. Коростень, м. Народиці, м. Овруч, м. Олевськ та Київська область – м. Поліське. Батьки першої групи працювали на ЧАЕС в 1986-1988 рр. та отримали хронічне опромінення в малих дозах. Сім'ї, які на момент аварії проживали у м. Прип'ять були евакуйовані протягом двох діб з моменту аварії. Загальна кількість дітей у сім'ях, які прийняли участь в дослідженні станом на 01.03.2009 року становила 237.

Дослідження проводилися із застосуванням клініко-генеалогічного, генетико-епідеміологічного та медико-статистичного методів.

Аналізувались наступні генетико-репродуктивні характеристики:

- фонові генетичні обтяженості в сім'ях внаслідок наявного сегрегаційного вантажу за допомогою клініко-генеалогічного методу;
- поширеність репродуктивних втрат в обох групах визначалась за коефіцієнтом репродуктивних втрат – співвідношення кількості самовільних викиднів та пізніх викиднів

до загальної кількості вагітностей (пологи, аборти, самовільні та пізні викидні, мертво народження, позаматкові та завмерлі вагітності);

- поширеність ВВР визначалась в % по відношенню до загальної кількості дітей із порівнянням спектру ВВР в обох групах;
- медико-статистичний метод застосовувався для визначення і порівняння групових антропометричних характеристик маса тіла (г) та довжина (см) окремо для хлопчиків і дівчаток у контрольній та тест-групі.

Результати та їх обговорення

Дітей у сім'ях ліквідаторів і потерпілих після аварії на ЧАЕС поділено на дві групи:

- контрольна група – діти, народжені до 26 квітня 1986 року;
- тест-група – діти, народжені після 01.02.1987 року по теперішній час – для можливості спостереження мутагенних ефектів.

Можливі тератогенні ефекти могли б спостерігатися у дітей, народжених в період від 01.11.1986 року до 31.01.1987 року. В обстежених сім'ях, дітей народжених у цей період не було. До контрольної групи віднесено 127 практично здорових дітей. З них – 65 хлопчиків і 62 дівчинки. До тест-групи віднесено 110 дітей, з них 64 хлопчики і 46 дівчаток.

Проведене клініко-генеалогічне обстеження сімей виявило таку генетичну обтяженість: у трьох сім'ях по одному випадку ВВР серцево-судинної системи у родичів першого ступеня; в одній сім'ї – сирингомелія у родича першого ступеня. У обстежених сібсів із цих сімей вроджених вад розвитку та спадкових захворювань не виявлено.

Вроджені вади розвитку в контрольній групі були виявлені в 5-ти випадках, а саме: один випадок вродженої вади аортального клапану, одна вроджена пупкова кила, один випадок збіжної альтернуючої косоокості поєднаної із ювенільним остеохондрозом, та дві полідактилії. Проте було зареєстровано тільки два випадки полідактилії, які відносяться до вад строгого обліку та в першу чергу спричиняються мутаціями *de novo*.

Вроджені вади розвитку в тест-групі були виявлені у 13-ти випадках: один випадок синдактилії, два випадки щілини губи, одна щілина піднебіння, один випадок вродженого пилеростенозу, два випадки гідроцефалії, із яких один поєднаний із вродженою аномалією розвитку головного мозку у вигляді аневризми перехрестя синусів, один випадок атрезії стравоходу, один випадок атрезії тонкого кишківника, один випадок двобічної клишоногості із правобічною кривошиєю та гемангіомою, один випадок природженого стенозу слъозової протоки та два випадки синдрому Дауна.

Із них дев'ять випадків вад строгого обліку – дві гідроцефалії, одна щілина піднебіння, дві щілини губи, одна атрезія стравоходу, одна атрезія тонкого кишківника та два випадки синдрому Дауна.

В результаті проведеного дослідження встановлено статистично вірогідну різницю по рівню ВВР у двох досліджуваних групах - 3,9% (контрольна група) та 11,8 % (тест-група) ($P < 0,05$). Стосовно кількості репродуктивних втрат, то обидві групи відрізнялися недостовірно (6,4% та 3,5%) відповідно (таблиця 1).

Таблиця 1

Вроджена патологія і репродуктивні втрати до і після додаткового мутагенного навантаження внаслідок аварії на ЧАЕС

Групи дітей	Кількість Дітей	Кількість ВВР	Частота ВВР	Кількість вагітностей	Коефіцієнт репродуктивних втрат
Контрольна	127	5	3,9	201	6,4
Тест-група	110	13	11,8	196	3,5
P			<0,05		>0,05

Аналіз даних свідчить про достовірне збільшення кількості випадків ВВР серед новонароджених в досліджуваних сім'ях до і після радіаційного опромінення в малих дозах.

Такі результати повинні насторожувати, так як їх можна оцінювати як індикатор впливу на гамети батьків додаткового мутагенного фактора.

Якщо статистично вірогідне збільшення рівня ВВР свідчить про вплив низькодозового радіаційного опромінення на реалізацію додаткового мутагенного вантажу, то відсутність статистично вірогідного збільшення кількості репродуктивних втрат серед сімей ліквідаторів та евакуйованих дозволяє передбачити, що оцінка мутагенної дії радіації в малих дозах залишається складною та вимагає достатньої бази даних і високонадійних реєстрів.

При проведенні статистичної обробки за програмою “Statgraphics” антропометричних показників – ваги та довжини тіла при народженні окремо для хлопчиків та дівчаток в контрольній та тест-групах не виявлено статистично достовірної різниці з $P > 0,05$ порівнюючи періоди до і після радіаційного мутагенного навантаження (таблиці 2, 3).

Таблиця 2

Значення антропометричних показників двох досліджуваних груп новонароджених хлопчиків

Групи дітей	Кількість дітей	Вага новонароджених хлопчиків, г, $M \pm m$	Довжина тіла новонароджених хлопчиків, см, $M \pm m$
Контрольна	65	3425±550,50	51,6±2,95
Тест-група	64	3342±548,20	52,2±2,55
P		$P > 0,05$	$P > 0,05$

Таблиця 3

Значення антропометричних показників двох досліджуваних груп новонароджених дівчаток

Групи дітей	Кількість дітей	Вага новонароджених дівчаток, г, $M \pm m$	Довжина тіла новонароджених дівчаток, см, $M \pm m$
Контрольна	62	3432±554,22	51,85±2,88
Тест-група	46	3335±536,25	52,35±2,75
P		$P > 0,05$	$P > 0,05$

Висновки

При медико-генетичному консультуванні сімей учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС та евакуйованих виявлено статистично вірогідне збільшення рівня вроджених вад розвитку серед новонароджених після впливу низькодозового радіаційного опромінення. Не зафіксовано статистично вірогідного збільшення кількості репродуктивних втрат до і після радіаційного опромінення в малих дозах.

Дані дослідження необхідно продовжувати для з'ясування чи негативні зрушення в генетичному здоров'ї досліджуваних сімей будуть виражені у майбутньому та для оцінки додаткового генетичного ризику у випадку проживання у відносно екологічно сприятливому регіоні.

Література

1. *Wertelecki*. Birth defects surveillance in Ukraine: a process. J. Appl. Genet, 2006; 47:143
2. <http://www.ukraine3000.org.ua/img/forall/u-Rezol.rtf>
3. *Неумержицька Л.В., Баріляк І.Р., Шкарупа В.М. та інші* Частота вроджених вад розвитку в радіоактивних забруднених регіонах України.- Збірник наукових праць «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології Том 1., 2007.- с.486-489.

4. *Вертелецький В.Є., Баріляк І.Р., Афанасьєва Н.О. та інші* Моніторинг вроджених вад розвитку за міжнародними стандартами в Україні.- Збірник наукових праць «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології Том 1., 2007.- с.430-434.
5. Down syndrome time-clustering in January 1987 in Belarus: Link with the Chernobyl accident? Ivan Zatsepin, Pierre Verger, Elisabeth Robert-Gnansia, Bertrand Gagnière, Margot Tirmarche, Rostislav Khmel, Irina Babicheva and Gennady Lazjuk *Reproductive Toxicology* Volume 24, Issues 3-4, November-December 2007, Pages 289-295
6. <http://www.moz.gov.ua/ua/main/press/docID=7865>

Резюме

Виявлено докази впливу малих доз іонізуючого опромінення у сім'ях учасників ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС та евакуйованих на реалізацію додаткового мутагенного вантажу через збільшення кількості вроджених вад розвитку серед новонароджених.

Обнаружено доказательства влияния малых доз ионизирующего облучения в семьях участников ликвидации последствий аварии на ЧАЭС и эвакуированных на реализацию дополнительной мутагенной нагрузки в отношении увеличения врожденных пороков развития среди новорожденных.

The study results indicated evidence of low-dose radiation exposure impact on realization of additional mutagenic burden in the liquidators and evacuees families through the extent of congenital malformations level among newborns.

ГОРОВА А.І., ПАВЛИЧЕНКО А.В.

Національний гірничий університет, Дніпропетровськ

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ НАСЛІДКИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ГІРНИЧОДОБУВНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ ДНІПРОПЕТРОВСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Високий рівень забруднення об'єктів довкілля в Україні призводить до деградації екосистем, підвищення рівня захворюваності населення та погіршення демографічних показників. Ці проблеми особливо актуальні для техногенно-навантажених регіонів України, у тому числі Дніпропетровської області, яка є однією з найбільших індустріально-розвинених, з високим рівнем урбанізації. На території області створена потужна енергетична база, яка стала основою розвитку гірничодобувного комплексу [1, 2].

Тому намітилася цілком обґрунтована тенденція необхідності оцінки екологічного стану довкілля не тільки традиційними фізико-хімічними методами, що встановлюють фактичні значення концентрацій різноманітних забруднювачів, але й шляхом використання цитогенетичних методів біоіндикації [3]. Останні, як відомо, дають відповіді на питання про загальну токсичність і мутагенність забруднених об'єктів довкілля та ступінь їх небезпеки для біоти та людини, тобто сприяють розв'язанню низки актуальних екологічних проблем у системі сталого розвитку гірничопромислового регіону і держави в цілому [4, 5].

В Україні проведений ряд біоіндикаційних досліджень для визначення екологічного стану окремих об'єктів довкілля або окремих територій, натомість майже не проводилися дослідження комплексного впливу забруднювачів окремих гірничо-промислових виробництв на стан компонентів довкілля.

Тому **метою роботи** є розв'язання актуальної науково-практичної задачі, яка полягає у

встановленні кількісних і якісних закономірностей деградаційного впливу різних видів гірничої промисловості на стан довкілля і біоти з використанням цитогенетичних методів біоіндикації.

Об'єкти та методи дослідження

Для дослідження була вибрана територія Дніпропетровської області, на якій були виділені різні за видом гірничої промисловості міста: Вільногірськ (видобуток поліметалічних руд), Жовті Води (уранові руди), Павлоград (вугільна промисловість), Нікополь (гірничо-металургійна промисловість). В якості контролю була використана територія курорту ЛОК "Солоний Лиман" Новомосковського району Дніпропетровської області. На території кожного міста були вибрані від двох до чотирьох тест-полігонів, які охоплювали як промислові, так і селітебні зони. На кожному з них виділяли від 4 до 8 моніторингових точок, на яких проводився відбір зразків ґрунтів та рослин. Всього досліджено 52 моніторингові точки.

Комплексна біоіндикаційна оцінка впливу діяльності гірничої промисловості на стан об'єктів навколишнього середовища проведена за цитогенетичними тестами "Стерильність пилку рослин-фітоіндикаторів", "Частота аберантних хромосом", "Мітотичний індекс" (рис. 1) [6].

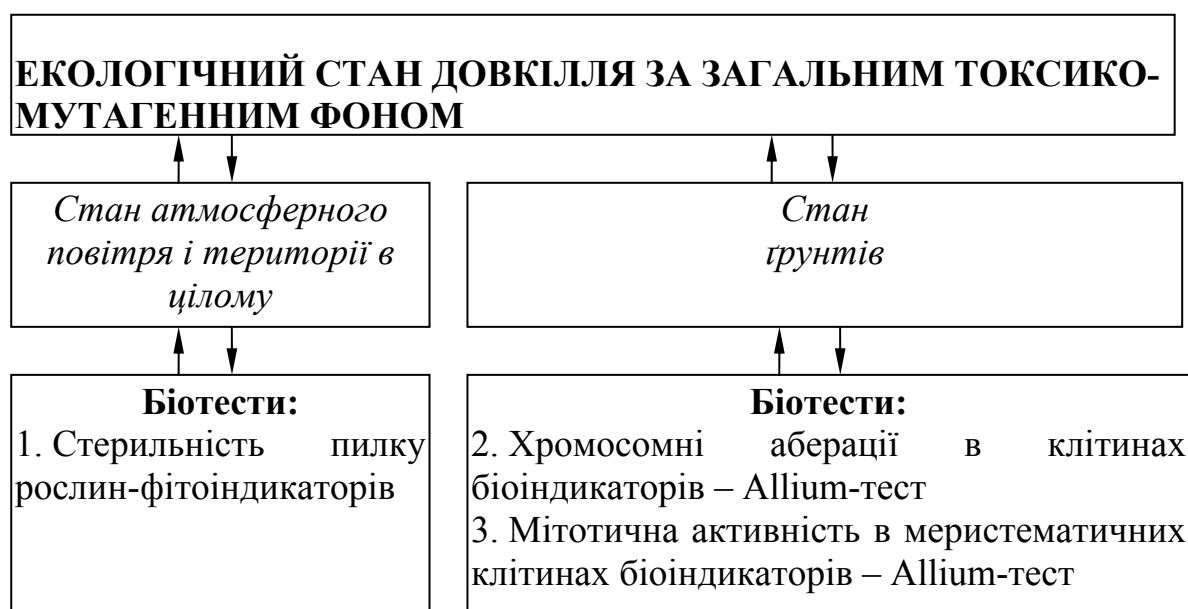


Рис. 1 – Структурна схема цитогенетичних показників, які характеризують екологічний стан території за токсико-мутагенним фоном

Біоіндикаційні показники було переведено в єдину безрозмірну систему умовних показників ушкоджуваності біосистем:

$$УПУ_i = \frac{|P_{реал} - P_{комф}|}{|P_{крит} - P_{комф}|}, \quad (1)$$

де $УПУ_i$ – i -ий умовний показник ушкоджуваності біопараметру, спричинений несприятливими умовами довкілля; $P_{комф}$. і $P_{крит}$. – експериментально встановлені значення біопараметру в комфортних та критичних для організму умовах, відповідно; $P_{реал}$ – значення біопараметру у досліджуваному варіанті.

Усереднений умовний показник ушкодження біоіндикаторів визначали за формулою:

$$ІУПУ_j = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n УПУ_i = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left[\frac{|P_{реал} - P_{комф}|}{|P_{крит} - P_{комф}|} \right]_i, \quad (2)$$

Інтегральний показник, що характеризує стан довкілля за загальним токсикомутагенним фоном ($IУПУ_{\text{біоінд.}}$), передбачає паритетність складових і обчислювався за формулою:

$$IУПУ_{\text{біоінд.}} = \frac{1}{m} (УПУ_1 + УПУ_2 + УПУ_3 + \dots + УПУ_m), \quad (3)$$

де $УПУ_1, УПУ_2, УПУ_3, \dots, УПУ_m$ – інтегровані показники біоіндикації токсикомутагенної активності атмосфери та педосфери (m – число вибраних тест-показників).

Для оцінки стану довкілля використовували уніфіковану шкалу приведену в табл. 1.

Таблиця 1

Шкала оцінки екологічного стану довкілля і рівнів ушкодженості біоіндикаторів

Діапазон чисельних значень УПУ	Рівень ушкодженості біосистем	Стан біосистем	Оцінка екологічної ситуації
0,000 – 0,150	низький	сприятливий	еталонна
0,151 – 0,300	нижче за середній	насторожуючий	задовільна
0,301 – 0,450	середній	конфліктний	незадовільна
0,451 – 0,600	вище за середній	загрозливий	незадовільна
0,601 – 0,750	високий	критичний	катастрофічна
0,751 і вище	максимальний	небезпечний	катастрофічна

Результати досліджень

Результати оцінки токсичності атмосферного повітря за тестом "Стерильність пилку рослин-фітоіндикаторів" на території гірничопромислових центрів Дніпропетровської області приведено на рис. 1 і табл. 2.

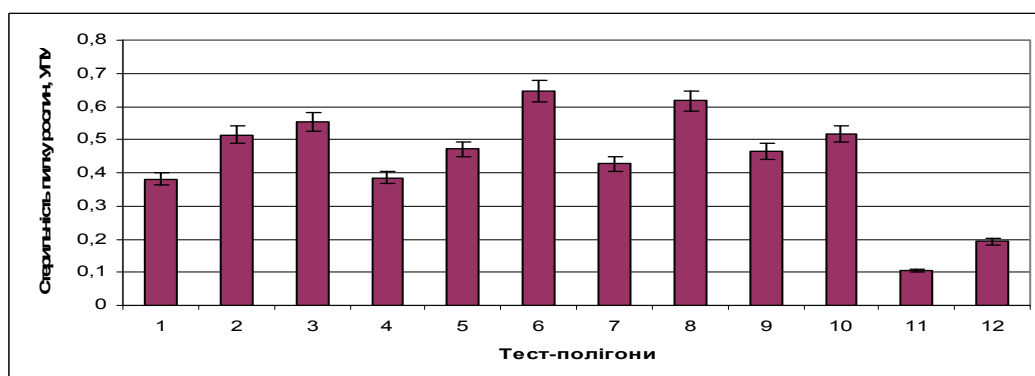


Рис. 1. Порівняльна оцінка токсичності атмосферного повітря за тестом "Стерильність пилку рослин-фітоіндикаторів" на досліджуваних тест-полігонах

Тест-полігони: 1 – район південного трубного заводу, м. Нікополь; 2 – район феросплавного заводу м. Нікополь; 3 – центр міста Нікополь; 4 – район ж/м Новопавлівка та Лапінка м. Нікополь; 5 – сельбщна зона м. Жовті Води; 6 – промислова зона м. Жовті Води; 7– сельбщна зона м. Вільногірськ; 8 – промислова зона м. Вільногірськ; 9 – сельбщна зона м. Павлоград; 10 – промислова зона м. Павлоград; 11 – рекреаційна територія ЛОК "Солоний лиман"; 12 – сільськогосподарські угіддя с. Новотроїцьке.

З рис. 1 видно, що на території полігонів, які розташовані у промислових зонах спостерігається підвищена токсичність атмосфери у порівнянні з сельбщними зонами. Найбільша токсичність атмосфери спостерігається у промзонах міст Жовті Води та Вільногірськ, а на території ЛОК "Солоний лиман" вона найнижча.

Таблиця 2

Порівняльна оцінка токсичності атмосферного повітря на території гірничопромислових центрів Дніпропетровської області

Місто	$IУПУ\pm m$	Екологічна ситуація
м. Нікополь	0,454±0,039	Незадовільна
м. Жовті Води	0,533±0,040	Незадовільна
м. Вільногірськ	0,509±0,068	Незадовільна
м. Павлоград	0,491±0,033	Незадовільна
ЛОК "Солоний Лиман"	0,145±0,031	Еталонна - Задовільна

Аналіз даних табл. 2 свідчить про те, що умовний показник ушкодженості біоіндикаторних систем на досліджуваній території промислових міст змінюється від 0,454 до 0,533 у.о., що вказує на "незадовільний" стан атмосферного повітря та "загрозливий" стан біоіндикаторів. Найбільша токсичність атмосферного повітря спостерігається у мм. Жовті Води та Вільногірськ, $УПУ$ дорівнює 0,533 і 0,509, відповідно. Що стосується території ЛОК "Солоний Лиман", то екологічний стан атмосфери оцінюється як "еталонний" з "низьким" рівнем ушкодженості біоіндикаторів. Слід відмітити, що рівень ушкодженості біоіндикаторів, що характеризує токсичність атмосферного повітря в 3–3,6 раз більше на території гірничопромислових міст Дніпропетровської області в порівнянні з контрольною територією.

Таким чином, на території досліджених гірничопромислових центрів Дніпропетровської області загальна токсичність атмосферного повітря за тестом "Стерильність пилку рослин-фітоіндикаторів" у 3–3,6 раз вища, ніж на контрольній території ЛОК "Солоний Лиман". Найбільша токсичність атмосферного повітря спостерігається на територіях міст Жовті Води та Вільногірськ.

Результати оцінки токсико-мутагенної активності ґрунтів на досліджуваних тест-полігонах приведені на рис. 2 і табл. 3. Аналіз даних рис. 2 виявив високі значення токсичності та мутагенності ґрунтів на території тест-полігонів розташованих у гірничопромислових центрах. Висока токсичність та мутагенність ґрунтів визначена на території промислових зон міст Жовті Води та Вільногірськ. Найкраща ситуація на території гірничопромислових центрів спостерігається у сельбійській зоні м. Павлоград. На контрольній території виявлена найменша токсичність і мутагенність ґрунтів.

Аналіз даних табл. 3 свідчить про те, що умовний показник ушкодженості, який характеризує токсичність ґрунтів у гірничопромислових центрах змінюється від 0,544 до 0,732 у.о. Це свідчить про "катастрофічний" екологічний стан ґрунтів у мм. Жовті Води та Вільногірськ і "незадовільний" у мм. Нікополь і Павлоград. На території ЛОК "Солоний Лиман" стан ґрунтів за показником токсичності оцінений як "еталонний". Токсичність ґрунтів на території гірничопромислових міст Дніпропетровської області в 8,2-11 раз більше ніж на території ЛОК "Солоний Лиман".

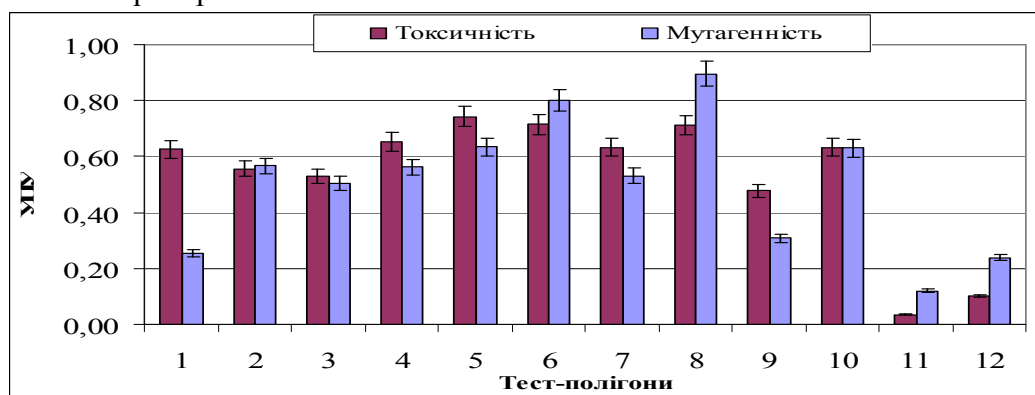


Рис. 2. Порівняльна оцінка токсичності та мутагенності ґрунтів на досліджуваних тест-полігонах за тестами "Мітотичний індекс" і "Частота аберантних хромосом"

Таблиця 3

Порівняльний аналіз токсико-мутагенної активності ґрунтів на досліджуваній території за результатами Allium-тесту

Досліджувана територія	Токсичність, ІУПУ±m	Мутагенність, ІУПУ±m	Токсико-мутагенна активність, ІУПУ±m	Екологічна ситуація
м. Нікополь	0,596± 0,026	0,497± 0,060	0,546±0,035	Незадовільна
м. Жовті Води	0,732± 0,023	0,701± 0,068	0,716±0,011	Катастрофічна
м. Вільногірськ	0,660± 0,021	0,652± 0,077	0,656±0,003	Катастрофічна
м. Павлоград	0,544± 0,045	0,446± 0,068	0,495±0,035	Незадовільна
ЛОК "Солоний Лиман"	0,066± 0,054	0,174± 0,029	0,138±0,040	Еталонна - Незадовільна

Що стосується мутагенності ґрунтів, то на території міст Жовті Води та Вільногірськ відмічається їх "катастрофічний" стан за цією ознакою. У містах Нікополь і Павлоград стан ґрунтів оцінений як "незадовільний". На території контролю відмічається "задовільний" стан ґрунтів з "сприятливим" станом біоіндикаторів. Мутагенність ґрунтів у мм. Жовті Води, Вільногірськ, Нікополь і Павлоград у 2,5–4 рази вище ніж на контрольній території. Слід відмітити, що оцінки стану ґрунтів за їх токсичністю та мутагенністю збігаються практично в усіх досліджуваних містах, виключенням є контрольна територія де відмічене незначне збільшення мутагенності ґрунтів у порівнянні з токсичністю. Загальна токсико-мутагенна активність ґрунтів за інтегральним показником, змінюється від "еталонної" на території ЛОК "Солоний лиман" (УПУ=0,138 у.о.) до "катастрофічної" у м. Жовті Води (УПУ=0,716 у.о.).

"Катастрофічний" стан ґрунтів відмічений на території м.Вільногірськ, біоіндикатори знаходяться в "критичному" стані. На територіях міст Нікополь і Павлоград стан ґрунтів за їх токсико-мутагенною активністю оцінений як "незадовільний" з "загрозливим" станом біосистем. Екологічний стан ґрунтів на контрольній території оцінений як "еталонний" і рівень ушкодженості біосистем менший в 3,5–5,2 раз у порівнянні з промисловими центрами Дніпропетровської області.

Таким чином, токсичність ґрунтів на території міст Жовті Води, Вільногірськ, Нікополь і Павлоград у 8,2–11 раз, а мутагенність у 2,5–4 рази вище ніж на контрольній території ЛОК "Солоний Лиман". Найбільша токсико-мутагенна активність ґрунтів спостерігається на території міст Жовті Води та Вільногірськ.

Результати комплексної оцінки токсико-мутагенної активності об'єктів довкілля на досліджуваній території приведені в табл. 4 і на рис. 3.

Таблиця 4

Порівняльна оцінка токсико-мутагенної активності ґрунтів та атмосферного повітря на територіях гірничопромислових центрів Дніпропетровської області за результатами біоіндикації

Показник стану довкілля		Місто				
		Нікополь	Жовті Води	Вільно-гірськ	Павло-град	Солоний лиман
Атмосфера	Токсичність	0,454± 0,039	0,533± 0,040	0,509± 0,068	0,491± 0,033	0,145± 0,031
	Токсичність	0,596± 0,026	0,732± 0,023	0,660± 0,021	0,544± 0,045	0,066± 0,054
Ґрунти	Мутагенність	0,497± 0,060	0,701± 0,068	0,652± 0,077	0,446± 0,068	0,174± 0,029

Загальний токсико-мутагенний фон	0,515± 0,034	0,655± 0,050	0,607± 0,040	0,493± 0,023	0,128± 0,026
----------------------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

З даних табл. 4 видно, що на території двох досліджуваних міст Дніпропетровської області – Жовті Води та Вільногірськ за результатами трьох біотестів виявлена "катастрофічна" екологічна ситуація. На території міст Нікополь і Павлоград вона "незадовільна". Інтегральна екологічна оцінка території ЛОК "Солоний лиман" за комплексом біотестів виявила "еталонний" стан об'єктів довкілля з "сприятливим" станом біосистем. Токсико-мутагенна активність об'єктів навколишнього середовища на територіях гірничопромислових міст у 3,8-5 раз більша ніж на контрольній території, яка має мінімальний рівень техногенного навантаження.

Інтегральна екологічна оцінка території ЛОК "Солоний Лиман" за комплексом цитогенетичних біотестів підтвердила "еталонний" стан об'єктів навколишнього середовища з "низьким" рівнем ушкоджуваності біосистем, що вказує на можливість використання даної території у якості контролю в системі комплексного моніторингу Дніпропетровської області.

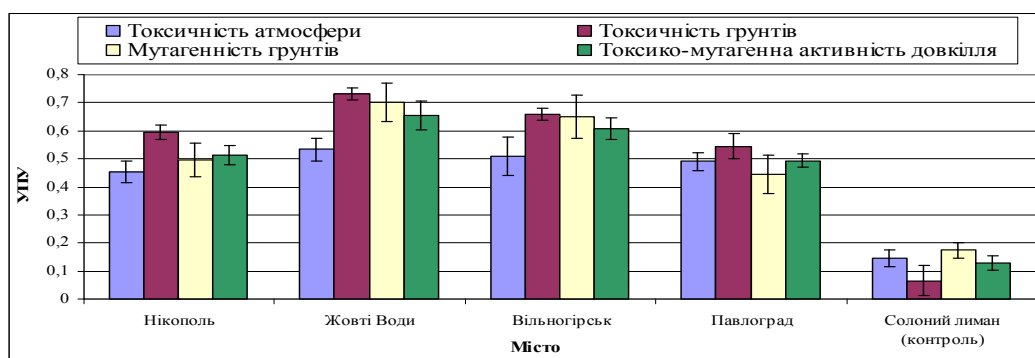


Рис. 3. Порівняльна характеристика токсико-мутагенної активності об'єктів довкілля на територіях гірничопромислових центрів Дніпропетровської області

З рис. 3 видно, що на території всіх гірничопромислових міст Дніпропетровської області найгірша ситуація спостерігається за показником токсичність ґрунтів. Найкраща ситуація виявлена за показником токсичності атмосферного повітря.

Токсико-мутагенна активність об'єктів навколишнього середовища на територіях гірничопромислових міст у 3,8 – 5 раз вища ніж на контрольній території, яка має мінімальний рівень техногенного забруднення. Проводячи зіставлення результатів еколого-генетичної оцінки стану об'єктів довкілля за допомогою трьох біотестів, було встановлено, що найбільш чутливим з них є біотест "Мітотичний індекс" у кореневих меристемах *Allium cepa* L.

Аналіз результатів комплексних досліджень стану довкілля на території гірничопромислових міст Дніпропетровської області за результатами біоіндикаційних досліджень (рис. 4), вказує на значне перевищення (у 2,5–11 разів) умовних показників ушкодженості біоіндикаторів у всіх досліджуваних містах в порівнянні з контролем. Виявлено, що більшість використаних біоіндикаційних показників мають високі рівні ушкодженості. Найбільш чутливим є показник, що характеризує токсичність ґрунтів (Мітотичний індекс), за яким на території досліджуваних міст спостерігається найбільше перевищення аналогічних показників на контрольній території.

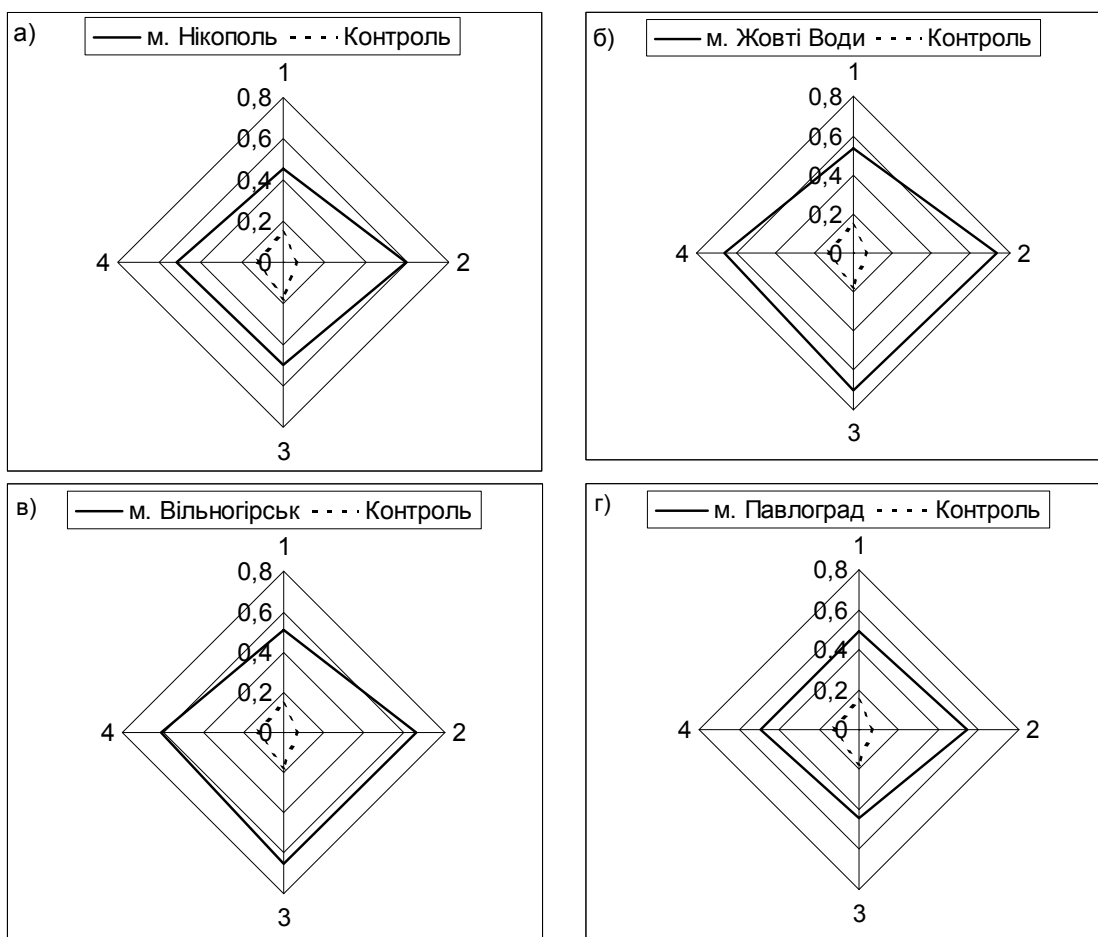


Рис. 4. Порівняльна характеристика екологічного стану досліджуваних міст Дніпропетровської області за результатами біоіндикаційних досліджень. 1 – Токсичність атмосферного повітря за тестом "Стерильність пилку рослин-фітоіндикаторів", ІУПУ; 2 – Токсичність ґрунтів за тестом "Мітотичний індекс", ІУПУ; 3 – Мутагенність ґрунтів за тестом "Частота аберантних хромосом", ІУПУ; 4 – Загальний токсико-мутагенний фон довкілля,

Найбільші рівні ушкодженості біоіндикаторів спостерігаються на територіях видобутку та збагачення уранових руд (м. Жовті Води), а також видобутку поліметалічних руд (м. Вільногірськ). Менші рівні ушкодженості біоіндикаторів спостерігаються на територіях розробки вугільного родовища (м. Павлоград) та марганцевого родовища (м. Нікополь). Слід відмітити, що у м. Жовті Води спостерігається найгірша ситуація за всіма біоіндикаційними показниками. На території інших міст рівень ушкодженості біоіндикаторів менший, ніж у м. Жовті Води, але відмічено перевищення показників на контрольній території.

Таким чином, на досліджуваних територіях Дніпропетровської області було встановлено наступне:

1. На території досліджуваних міст за допомогою тесту "Стерильність пилку рослин-фітоіндикаторів" виявлено "незадовільний" стан атмосферного повітря та "загрозливий" стан біоіндикаторів. Екологічний стан атмосферного повітря на території мм. Жовті Води, Вільногірськ, Павлоград і Нікополь приблизно однаковий і оцінюється як "загрозливий". На території ЛОК "Солоний лиман" спостерігається найнижча токсичність атмосферного повітря, у 3-3,6 раз менше, ніж на території досліджуваних міст Дніпропетровської області.

2. Загальна токсико-мутагенна активність досліджених ґрунтів, визначена з використанням Allium-тесту, змінюється від "еталонної" на території ЛОК "Солоний лиман" до "катастрофічної" у м. Жовті Води. Також "катастрофічний" стан ґрунтів

відмічено на території м. Вільногірськ, у містах Нікополь і Павлоград стан ґрунтів за їх токсико-мутагенною активністю оцінено як "незадовільний" з "загрозливим" станом біосистем. Екологічний стан ґрунтів на контрольній території оцінено як "еталонний" і рівень ушкодженості біосистем менше в 3,5–5,2 раз у порівнянні з промисловими центрами Дніпропетровської області.

3. За загальною токсико-мутагенною активністю об'єктів навколишнього середовища, оціненою за комплексом біотестів, виявлено на території міст Жовті Води і Вільногірськ "катастрофічну" екологічну ситуацію, у містах Нікополь і Павлоград - "незадовільну". Інтегральна еколого-генетична оцінка території ЛОК "Солоний лиман" виявила "еталонний" стан об'єктів навколишнього середовища з "сприятливим" станом біосистем. Токсико-мутагенна активність об'єктів навколишнього середовища на територіях промислових міст у 3,8-5 раз більша ніж на контрольній території, яка має мінімальний рівень техногенного навантаження.

Література

1. Сердюк А. М. Навколишнє середовище і здоров'я населення / А. М. Сердюк // Довкілля та здоров'я. – 1998. – № 4(7). – С. 2–6.

2. Екологічний паспорт Дніпропетровської області. – Д., 2007. – 112 с.

3. Дуган А.М., Баріляк І.Р., Журков В.С. Выявление и оценка суммарной мутагенной активности аэрозольной части химических загрязнений атмосферного воздуха некоторых промышленно развитых городов Украины // Цитология и генетика. – 1993. – 27, №4, С.34–39.

4. Методологические аспекты оценки мутагенного фона и генетического риска для человека и биоты от действия мутагенных экологических факторов / А.И. Гороя, Л.Ф. Бобырь, Т.В. Скворцова и др. // Цитология и генетика. – 1996. – №6(30). – С.78–86.

5. Гороя А.И., Павличенко А.В. Методология эколого-социального мониторинга горно-промышленных регионов, как составляющая устойчивого развития Украины // Гігієна населених місць: Зб. наук. праць. Київ, 2004. – Вип. 43. – С. 552–559.

6. МР 2.2.12-141-2007. Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об'єктів довкілля з використанням інтегральних цитогенетичних методів оцінки. // Упоряд.: Горова А. І., Риженко С. А., Скворцова Т. В.// – Київ: „Полімед”, 2007.

Резюме

Визначені рівні токсико-мутагенної активності ґрунтів та атмосферного повітря за допомогою цитогенетичних методів біоіндикації. Проведена екологічна оцінка стану об'єктів навколишнього середовища на території гірничопромислових центрів Дніпропетровської області.

The levels of toxic and mutagenic activity of soils and atmosphere air by means of cytogenetic methods of bioindication are defined. The ecological assessment of environmental objects state at the territories of mining and industrial centers of Dnipropetrovsk region is conducted.

ГРА О.А.^{1,2}, КОЖЕКБАЕВА Ж.М.^{1,3}, ГРА Д.В.⁴, ФЕДОРОВА М.Д.⁴, СКОТНИКОВА О.И.⁵, КИСЕЛЕВА Н.П.⁴, КИСЕЛЕВ Ф.Л.⁴, НАСЕДКИНА Т.В.², ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.¹

¹Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Россия, Москва, Ул. Губкина 3. 119991,

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,

³University of Miami Miller School of Medicine Institute for Human Genomics,

⁴НИИ канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,

⁵Московский научно-практический центр борьбы с туберкулезом

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ В ЭТИОЛОГИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Инфекционные заболевания – это группа заболеваний, вызываемых проникновением в организм патогенов (бактерий, вирусов и др.). Восприимчивость организма к инфекционным заболеваниям зависит от множества факторов: от возраста, перенесенных и сопутствующих заболеваний, питания, социальных и экологических условий, иммунного статуса.

Наиболее распространенной и социально-значимой бактериальной инфекцией является туберкулез (ТБ), которая занимает первое место среди причин смерти от инфекционных заболеваний. ТБ представляет собой острое или хронически протекающее инфекционное заболевание, вызываемое микобактериями туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*, МБТ) и характеризующееся развитием клеточной аллергии и специфических гранул в различных тканях и органах. В мире ежегодно регистрируется около 8 млн. новых случаев заболевания ТБ органов дыхания, и прогноз дальнейшей динамики эпидемической ситуации остается неблагоприятным. В России эпидемиологическая ситуация по ТБ также остается напряженной: заболеваемость по итогам 2007 года составила 83.2 на 100 000 населения, распространенность – 194.5 на 100 000 населения, смертность – 21.3 на 100 000 населения. Предполагается, что МБТ инфицировано около 2/3 населения планеты. Однако у большинства инфицированных никогда не развивается туберкулез: считается, что инфицированный человек обладает ~10% риском развития активной формы туберкулеза. Это происходит только у людей с ослабленной иммунной системой, при этом на развитие ТБ влияют как неблагоприятные условия внешней среды, так и индивидуальные характеристики организма индивида [Сельцовский, 2004; Lin, 2007].

Среди вирусных инфекций особое место занимают онкогенные вирусы, которые инфицируют клетки и, тем самым, нарушают нормальные клеточные сигнальные связи и обеспечивают условия для активной клеточной пролиферации. Ярким примером онкогенных вирусов являются вирусы папиллом человека (HPV), которые составляют группу ДНК-содержащих вирусов, характеризующихся тропизмом к эпителию и вызывающих субклинические формы инфекции, способные индуцировать развитие такого социально-значимого заболевания как рак шейки матки (РШМ). В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями женского населения РШМ занимает 6-е ранговое место, что соответствует 5.2% от общего числа заболевших онкологическими заболеваниями. В России доля РШМ в структуре заболеваемости максимальна в возрастной группе 15–39 лет (19.2%). В возрастной группе 40–54 года она составляет 8.9% и занимает 2-е ранговое место после рака молочной железы, при этом смертность от РШМ составляет 4.2% от общего числа умерших от злокачественных новообразований. Женщина может одновременно заражаться несколькими типами папилломавирусов, при этом для папилломавирусной инфекции характерно латентное течение. Интересно отметить, что у 90% женщин HPV инфекция исчезает самостоятельно через год после инфицирования под воздействием иммунной системы организма и лишь у незначительного числа инфицированных под влиянием различных факторов происходит активация вируса, его усиленное размножение и переход болезни в стадию клинических проявлений [Хансон, 2002; Киселев, 2004].

На сегодняшний день подтверждена гипотеза, что предрасположенность к инфекционным заболеваниям зависит от эффективности активации клеточного иммунитета и определяется генетическим статусом. Также есть данные, что факторами

риска развития ТБ и РШМ помимо сниженных показателей иммунного статуса являются курение и неблагоприятные условия окружающей среды. В связи с этим, помимо уже известных генов кандидатов предрасположенности к данным социально-значимым многофакторным заболеваниям становится актуальным изучение генов, белковые продукты которых участвуют в метаболизме ряда ксенобиотиков (в том числе компонентов табачного дыма), то есть анализ полиморфизма генов системы биотрансформации.

Материалы и методы

Для выяснения роли генов системы биотрансформации в развитии ТБ в настоящей работе с помощью аллель-специфичной гибридизации на биологическом микрочипе определены частоты полиморфных вариантов генов *CYP1A1*, *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR*, *MTRR*, *NQO1*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и *NAT2* у 73 больных ТБ (возраст от 19 до 82 лет) и проведено сравнение с частотами полиморфных вариантов данных генов у 352 здоровых индивидов (возраст от 20 до 65 лет). Для выявления генетических факторов риска развития РШМ определены частоты полиморфных вариантов данных генов системы биотрансформации у 85 женщин с диагнозом РШМ (возраст от 24 до 72 лет), и проведено сравнение с частотами полиморфных вариантов данных генов у 82 здоровых доноров женского пола (возраст от 43 до 102 лет).

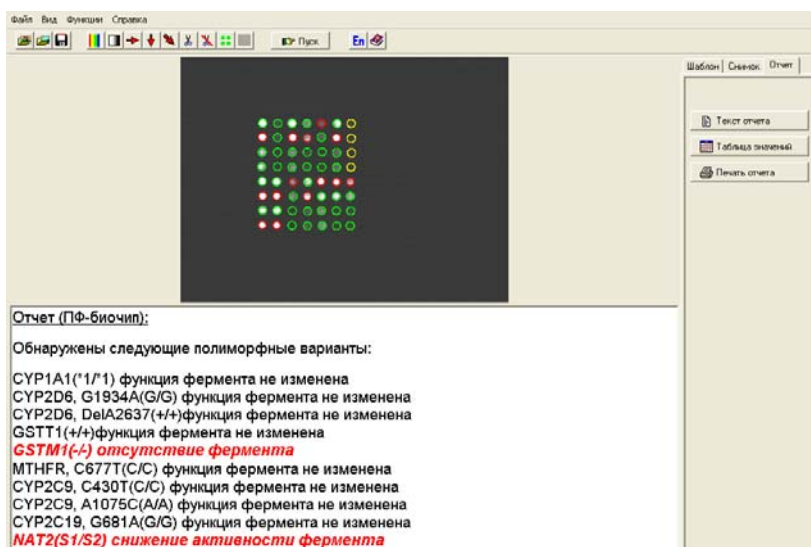


Рис.1. Пример гибридизационной картины, полученной на биочипе для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации, и интерфейс программы «ImageWare» для определения полиморфизма в данных генах.

ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора Wizard genomic DNA purification system («Promega», США). ДНК из опухолей шейки матки выделены стандартным гуанидинизотиоционатным методом с разделением ДНК и РНК центрифугированием в плотной среде CsCl [Sambrook, 1989]. Статистический анализ был проведен с применением прикладной программы GraphPad InStat (США).

Результаты и обсуждение

С помощью биочипа для анализа полиморфизма в генах системы биотрансформации *CYP1A1* (4887C>A, 4889A>G, 6235T>C), *CYP2D6* (1934G>A, 2637delA), *GSTT1* (делеция), *GSTM1* (делеция), *MTHFR* (677C>T, 1298A>C), *MTRR* (66A>G), *NQO1* (609C>T), *CYP2C9* (430C>T, 1075C>T), *CYP2C19* (681G>A) и *NAT2* (341T>C, 481C>T, 590G>A, 857G>A) были изучены ассоциации полиморфных вариантов данных генов с риском развития ТБ и РШМ во взрослом возрасте.

У больных ТБ обнаружено статистически значимое увеличение частоты «нулевого» *GSTT1* генотипа (OR = 3.26, p = 2.8E-5) и двойного «нулевого» *GSTT1/GSTM1*

генотипа ($OR = 4.05$, $p = 3.4E-5$), по сравнению с группой здоровых доноров. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым «нулевые» генотипы генов *GSTT1* и *GSTM1* чаще обнаруживали у пациентов с различными заболеваниями легких. Известно, что глутатион-S-трансферазы участвуют в детоксикации полициклических ароматических углеводородов, а именно бензопирена и других компонентов табачного дыма, катализируя конъюгацию промежуточных метаболитов с восстановленным глутатионом и, тем самым, предотвращая образование ДНК-аддуктов. Наличие двух «нулевых» аллелей гена *GSTT1* и/или *GSTM1* приводит к отсутствию ферментативной активности кодируемых данными генами ферментов и способствует развитию окислительного стресса и деструкции, что обуславливает повышение уровня аддуктов ДНК и может потенцировать развитие различных заболеваний многофакторной этиологии.

При анализе распределения частот у больных ТБ обнаружено увеличение частоты генотипа *NAT2* *5/*5 по сравнению с группой здоровых индивидов ($OR = 1.58$, $p = 0.163$). При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что у больных ТБ генотип *NAT2* *5/*5 в комбинации с «нулевым» *GSTT1* генотипом и двойным «нулевым» *GSTT1/GSTM1* генотипом встречается достоверно чаще, чем в популяционном контроле ($OR = 5.56$, $p = 0.0216$ и $OR = 12.21$, $p = 0.0135$, соответственно). Известно, что ариламин-N-ацетилтрансферазы играют важную роль в детоксикации и метаболической активации ксенобиотиков, катализируя перенос ацетильной группы с ацетил-СоА к концевому атому азота арилгидразинов и ариламин-содержащих канцерогенов, аллергенов и токсинов. Полученные в данной работе результаты позволяют предположить, что преобладание «медленного» генотипа *NAT2* в сочетании с «нулевым» *GSTT1* и/или *GSTM1* генотипом приводит к элиминации активности основных ферментов II фазы биотрансформации, отвечающих за окончательный метаболизм ксенобиотиков и трансформацию их в неактивные водорастворимые соединения. Подобный дисбаланс в работе системы биотрансформации может приводить к аккумуляции реактивных и цитотоксичных метаболитов, и тем самым провоцировать развитие различных многофакторных заболеваний, а также обуславливать снижение иммунного статуса.

У больных РШМ обнаружено статистически значимое увеличение частоты гетерозигот по *7 аллелю гена *NAT2* ($OR = 4.08$, $p = 0.0316$), по сравнению с группой здоровых женщин. Наличие данного аллеля соответствует замене G на A в позиции 857 (Gly286Glu) и определяет фенотип «промежуточного» или «медленного» ацетилирования *NAT2*, приводя к образованию менее стабильного фермента.

При анализе сочетанных взаимодействий впервые показано, что аллель *NAT2**7 в сочетании с генотипом *CYP2D6* 1934G/G достоверно чаще встречается у женщин, больных РШМ, чем в контрольной группе ($OR = 20.49$, $p = 0.0032$). Ген *CYP2D6* является самым полиморфным геном суперсемейства CYP, при этом большинство полиморфных аллелей данного гена характеризуются сниженной активностью. Фермент *CYP2D6*, кодируемый данным геном, участвует в биотрансформации большого количества субстратов, включая полициклические ароматические углеводороды, метаболиты которых характеризуются выраженным канцерогенным действием. Полученные в настоящей работе результаты позволяют предположить, что преобладание быстрых метаболизаторов по гену *CYP2D6* в сочетании с носительством «медленного» аллеля *NAT2**7 может приводить к высокоэффективной активации проканцерогенов с последующим образованием генотоксичных интермедиатов, способных вызывать повреждения ДНК, и, как следствие, индуцировать развитие РШМ у инфицированных HPV женщин.

Выводы: Анализ полиморфизма генов системы биотрансформации методом аллель-специфичной гибридизации ДНК на биочипе позволяет точно определять генотипы и аллели, а также распределение частот аллелей и генотипов в популяционных выборках больных и здоровых индивидов, и может быть эффективно использован для ассоциативных исследований генетического полиморфизма с целью установления

кореляції передисположеності к захворюванням данного індивіда в залежності от генетического статусу.

Робота виконана при підтримці Російського Фонду Фундаментальних Исследований (грант № 07-04-00708-а и № 08-04-12225-офи).

Литература

1. *Сельцовский П.П., Литвинов В.И.* Социальные аспекты эпидемиологической ситуации по туберкулезу. – Москва: МНПЦБТ.- 2004.- 224с.
2. *Lin H.H., Ezzati M., Murray M.* Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis: a systematic review and meta-analysis // PLoS Med.- 2007.- vol. 4, № 1.- P.173-189.
3. *Хансон К.П., Имянитов Е.Н.* Современные представления о канцерогенезе рака шейки матки // Практическая онкология.- 2002.- т. 3, № 3.- С.145-155.
4. *Киселев Ф.Л., Мазуренко Н.Н., Волгарева Г.М., Киселева Н.П.* Взаимодействие вирусных и клеточных генов в опухолях шейки матки // Молекулярная биология.- 2004.- т. 38, № 2.- С.224-232.
5. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* Molecular Cloning: A Laboratory manual. – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press.- 1989.

Резюме

Проведен сравнительный анализ полиморфизма генов системы биотрансформации с риском развития туберкулеза легких и рака шейки матки с помощью биочипов. Показано, что полиморфные варианты генов *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1* и *NAT2* могут служить прогностическими факторами риска развития данных многофакторных патологий у жителей Европейской части России во взрослом возрасте.

The comparative analysis of polymorphism in xenobiotic-metabolizing genes with the risk of development of pulmonary tuberculosis and cervical cancer was done using microarray. It was shown that polymorphic variants of genes *CYP2D6*, *GSTT1*, *GSTM1* and *NAT2* may consider as predictive markers for risk of development of the given multifactorial pathologies in residents of European part of Russia at adult age.

ГУЛЕЮК Н.Л.

ДУ "Інститут спадкової патології АМН України"

Україна, 79003, Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: huleyuk@yahoo.com

МОЗАЙЦИЗМ В КУЛЬТУРАХ АМНІОЦИТІВ: АНАЛІЗ ВИПАДКІВ У ЛЬВІВСЬКОМУ ММГЦ

Мозаїцизм є характерною рисою живих організмів. Цитогенетики під мозаїцизмом мають на увазі присутність у обстежуваного декількох клітинних ліній з різним каріотипом. При істинному (генералізованому) мозаїцизмі різні клони клітин зустрічаються у всіх досліджуваних тканинах організму. При обмеженому мозаїцизмі клітини з хромосомними аномаліями зустрічаються тільки в одній тканині.

Вважається, що мозаїцизм є наслідком нерозходження хромосом на доімплантаційній стадії розвитку зиготи. Частка різних клонів клітин та їх локалізація залежить від того, на якій стадії розвитку ембріона відбулось нерозходження, від проліферативних властивостей та життєздатності клітин з аномальним каріотипом [1].

Останні дослідження показують, що ~5% людей мають декілька цитогенетично відмінних клітинних ліній. Відомі синдроми, для яких характерний хромосомний мозаїцизм. Зокрема, до хвороб з обмеженим мозаїцизмом, належить с.Паллістера-Кілліана (тетрасомія по коротким плечам 12-ї хромосоми, переважно у вигляді i12p) [2]. Тканинно обмежений мозаїцизм описаний для тетрасомій 5p [3], 8p [4], 9p та 18p [5]. Зафіксовані

рідкісні випадки істинного мозаїцизму по хромосомам 2, 5, 16 та 22 [6]. Все частіше висловлюється думка, що чиста моносомія по X-хромосомі елімінується на різних стадіях внутріутробного розвитку, а всі народжені дівчатка з встановленою на культурі лімфоцитів гоносомною моносомією мають клітини з нормальним набором хромосом в інших тканинах. Існує припущення, що всі живонароджені діти мають різну кількість клітин з моносомією по статевій хромосомі [7].

Виявлення хромосомного мозаїцизму у матеріалі, отриманому під час інвазивної пренатальної діагностики створює проблеми при трактуванні цитогенетичного результату [8-10, 12,13]. Обмежений плацентою мозаїцизм зустрічається ~2% випадків від всіх пренатальних діагностик, виконаних на хоріоні/плаценті. Саме в цих органах формуються і довго зберігаються клони з трисомією, тоді як у клітинах власне ембріона/плода спостерігається нормальний каріотип [1, 7]. Ще однією проблемою є встановлення хромосомних змін виключно у власне ембріональних/плодових тканинах – амніоцитах, фетальних лімфоцитах, фібробластах [7, 11]. Деколи встановлена в амніоцитах хромосомна патологія не фіксується після народження в лімфоцитах – стандартній культурі для каріотипування. В таких випадках необхідне каріотипування інших тканин, наприклад, фібробластів [1, 7, 11,12].

Зростаюча кількість досліджень із використанням FISH-зabarвлення на інтерфазних ядрах дозволяє виявити невелику кількість клітин із хромосомними змінами. Тому все частіше постає питання, яка кількість клітин є критичною для коректного встановлення мозаїцизму [2, 14].

Отже, питання взаємозв'язку між генералізованим/обмеженим мозаїцизмом та вродженими вадами розвитку у більшості випадків є невирішене. Удосконалення методів дослідження свідчить про тенденцію до підтвердження мозаїцизму навіть при незначній кількості клітин з відмінним від основного каріотипом.

Матеріал та методи

Амніотичну рідину отримували шляхом трансабдомінального амніоцентезу. Культивування амніоцитів виконували на флаконах та слайд-флаконах фірми Nunc (кат. № 163371 та №170920) з додаванням середовища AmnioMAX C100 фірми Gibco [15]. В кожному випадку ставили дві-три незалежні культури. З метою отримання якісних середньомітотичних та ранньомітотичних хромосом одночасно з коліцином вводили бромистий етидій в концентрації 10 мкг/мл. Цитогенетичні дослідження проводили згідно стандартної методики та загальноприйнятим положенням [16, 17].

Результати та обговорення

Проаналізували результати цитогенетичного дослідження 460 культур амніоцитів, отриманих від жінок з групи ризику по народженню дітей з хромосомною патологією. У 7-ми випадках (1,52%) встановлений мозаїцизм (табл.1), причому у 3-х культурах - по статевим хромосомам, у двох – по маркерній хромосомі, у 2-х – делеція та інверсія аутосом. У більшості випадків основним показом до проведення пренатальної діагностики було відхилення показників біохімічних маркерів 1-го та/або 2-го триместру в сироватці крові вагітної. Неоднозначне трактування викликав випадок 45,X[3]/46,XY[27], так як мозаїцизм спостерігався тільки в одній з двох незалежних культур і міг бути наслідком дії препаратів, застосованих з метою зберігання вагітності у першому триместрі. А, як відомо, мозаїцизм по Y-хромосомі викликає зміни гормону росту та дисгенезію гонад у осіб чоловічої статі [18], що, в кінцевому результаті, приводить до непліддя.

Таблиця 1 – Характеристика мозаїчних випадків та основних показів до проведення інвазивної пренатальної діагностики

№п/п	Каріотип	Покази до проведення амніоцентезу
1	45,X[9]/46,XX[21]	зміни біохімічних маркерів в сироватці крові вагітної
2	45,X[18]/47,XXX[2]46,XX[2]	зміни біохімічних маркерів в сироватці крові

		вагітної
3	45,X[3]/ 46,XY[27]	зміни біохімічних маркерів в сироватці крові вагітної
4	46,XX[27]/47,XX+mar[3]	ускладнений генетичний анамнез
5	46,XX[17]/ 47,XX+mar[9]	ускладнений генетичний анамнез
6	46,XX[24]/ 46,XX,inv(4)(pterq31)[3]	зміни біохімічних маркерів в сироватці крові вагітної, ускладнений акушерський анамнез
7	46,XY[24]/46,XY,del(11)(q14)[3]	зміни біохімічних маркерів в сироватці крові вагітної

Поодинокі колонії з аномальним каріотипом виявили у 4-х випадках при аналізі препаратів, отриманих на слайд-флаконах (табл.2). У 3-х випадках зафіксували делеції аутосом, в одному – додаткову маркерну метацентричну бісателітну мікро хромосому. Вона по розмірам та структурі відповідала коротким плечам акроцентричних хромосом і, скоріш за все, утворилась внаслідок робертсонівської транслокації, діагностованої у вагітної. Можна припустити, що при каріотипуванні різних тканин із застосуванням FISH-забарвлення на прицентромєрні ділянки 13-ї та 22-ї хромосом її виявили б і у матері. Такі маркери не асоціюються з вродженими вадами розвитку та мають властивість з часом втрачатись [1]. Тому цей випадок можна трактувати і як низькодозовий мозаїцизм з тенденцією до елімінації аномального клону.

Таблиця 2 - Характеристика культур амніоцитів, у яких виявлені поодинокі колонії з відмінними від основного каріотипом

№ п/п	Основний каріотип	Каріотип аномальних колоній	Частка метафаз з різними каріотипами
1	45,XX,der(13;22)(p10;p10)mat	46,XX,der(13;22)(p10;p10) +mar	30 : 3
2	45,XX,der(14;21)(p10;p10)mat	45,XX,der(14;21)(p10;p10), del (12) (p12)	33 : 2
3	46,XY	46,XY, del (11) (q14)	33 : 2
4	46,XY	46,XY,del(13)(q31)	27:3

Висновки. Отже, отримані результати свідчать про неоднозначність трактування результатів пренатальної діагностики при виявленні декількох цитогенетичних різних клонів клітин і вимагають додаткових обстежень з метою коректних рекомендацій щодо даної вагітності. Для уникнення псевдопозитивних/псевдонегативних результатів необхідне пренатальне/постнатальне хромосомне обстеження декількох різних тканин плоду або новонародженої дитини.

Література

1. Баранов В.С., Кузнецова Т.В. Цитогенетика эмбрионального развития.-Санкт-Петербург.-Изд-во Н-Л.- 2007.- 639с.
2. Tissue-limited mosaicism in Pallister-Killian syndrome - a case in point / S. Choo, S.H. Teo, M. Tan, M.H. Yong, L.Y. Ho. // Journal of Perinatology.- 2002.- V.22.- P.420 – 423.
3. Tetrasomy 5p mosaicism in a boy with delayed growth hypotonia, minor anomalies, and an additional isochromosome 5p [46,XY/ 47,XY,+i(5p)]. / Sijmons R.H., Leegte B., van Lingen R.A., et al. // Am. J. Med. Genet.- 1993.- V.47.- P.559–562.
4. Rijnvos W.P., Smeets D.F., Fryns J.P. Mosaic tetrasomy 8p in two patients: clinical data and review of the literature. // Am. J. Med. Genet.- 1994.- V.50.- P.377–380.
5. Tetrasomy 9p: tissue – limited idic(9p) in a child with mild manifestations and a normal CVS result. Report and review. / Grass F.S., Parke J.C.Jr., Kirkman H.N., et al. // Am.J.Med.Genet.- 1993.- V.47.- P.812–816.

6. Rare trisomy mosaicism diagnosed in amniocytes, involving an autosome other than chromosomes 13, 18, 20, and 21: karyotype / phenotype correlations. / Hsu L.Y., Yu M.T., Neu R.L., et al. // *Prenatal. Diagn.*- 1997.- V.17.- P.201–242.
7. Ворсанова С.Г., Юров В.Б., Чернышов В.Н. Медицинская цитогенетика.-М., Медпрактика.- 2006.- 299с.
8. A case of discordant related abnormal karyotypes from chorionic villi and amniocytes / Porter S., Wilson E.et al.// *Prenatal Diagnosis.*- 1999.- V.19, №9.- P.887-890.
9. Schinzel A. Discrepancies in cytogenetic results between different tissues in two fetuses with Wolf-Hirschhorn syndrome // *Cytog.Cell Genet.*- 2000.- V.91, №1-4.- P.231-233.
10. Prenatal diagnosis of mosaicism for 11q terminal deletion. / Valduga M., Latger Cannard V., Philippe C., Romana S., Miton A., Droulle P., Foliguet B., Lecompte T., Jonveaux P. // *Eur.J.Med.Genet.*- 2007.- V.50, N6.- P.475- 481.
11. Pallister - Killian syndrome: normal karyotype in prenatal chorionic villi, in postnatal lymphocytes, and in slowly growing epidermal cells, but mosaic tetrasomy 12p in skin fibroblasts. / Horn D., Majewski F., Hildebrandt B., Korner H. // *J. Med. Genet.*- 1995.- V.32.- P.68–71.
12. Scheuerle A., Heller K., Elder F. Complete trisomy 1q with mosaic Y;1 translocation: A recurrent aneuploidy presenting diagnostic dilemmas. // *Am.J.Med.Genet.*- 2005.- V.138A.- P.166-170.
13. Clinical, cytogenetic and molecular findings in 45,X/47,XX,+18 mosaicism: clinical report and review of the literature / Schubert R., Eggermann T.et al. // *Amer.J.Med. Genet.*- 2002.- V.110, №3.- P.278-282.
14. Prenatal diagnosis of low level trisomy 15 mosaicism: review of the literature [Short Report]. / Zaslav A.L., Fallet S., Brown S., Ebert R., Fleischer A., Valderama E., Fox J. E. // *Clin.Genet.*- 1998.- V.53, №4.- P.286-292.
15. Методи культивування амніоцитів. Гулеюк Н.Л., Заставна Д.В., Безкоровайна Г.М., Гнатейко О.З. Методичні рекомендації.- Київ.- 2005.- 17с.
16. Цитогенетичні методи дослідження хромосом людини. Зерова-Любимова Т.Е., Горovenko Н.Г. Методичні рекомендації.- Київ.- 2003.- 23с.
17. ISCN (2005): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature // Shaffer L.G., Tommerup N.(eds).- Karger, Basel.- 2005.- 131p.
18. Short stature in children with an apparently normal male phenotype can be caused by 45,X/46,XY mosaicism and is susceptible to growth hormone treatment. / Unruh A.R., Fischer S.K., Kaspers S. et al. // *Europ.J.of Pediatrics.* - 2004. - 163, N4-5. - P.251-256.

Резюме

Проаналізовані 7 випадків мозаїцизму встановлених під час цитогенетичного аналізу 460 культур амніоцитів. У 3-х культурах зафіксований мозаїцизм по статевим хромосомам, у двох – мозаїцизм по маркерній хромосомі, у решті – делеції та інверсія аутосом. У більшості висвітлених випадків основним показом до проведення інвазивної пренатальної діагностики були зміни біохімічних маркерів 1-го та/або 2-го триместру в сироватці крові вагітної. Окрім того, у 4-х культурах занотовані поодинокі колонії з відмінним від основного каріотипом. Наголошується необхідність проведення каріотипування декількох тканин плода або народженої дитини з метою підтвердження істинного чи обмеженого мозаїцизму.

Проанализированы 7 случаев мозаицизма, установленных при цитогенетическом анализе 460 культур амниоцитов. В 3-х культурах зафиксирован мозаицизм по половым хромосомам, у двух – мозаицизм по маркерной хромосоме, у остальных – делеции и инверсия аутосом. Главным показанием для проведения инвазивной пренатальной диагностики в большинстве приведенных случаев были отклонения результатов биохимических маркеров 1-го и/или 2-го триместра в сыворотке крови беременной. Кроме того, в 4-х культурах отмечены единичные колонии с набором хромосом, отличающимся

от основного. Указывается на необходимость проведения кариотипирования разных тканей плода или рожденного ребенка с целью подтверждения истинного либо ограниченного мозаицизма.

Out of 460 amniocyte cultures, 7 cases of mosaicism were detected and cytogenetically analyzed. In 3 cultures sex chromosome mosaicism was detected, in 2 cultures – **marker chromosome** mosaicism, in remaining 2 cultures – deletions and inversions of autosomes. In most of the presented cases, main stimuli for performing invasive prenatal diagnostics were changes in biochemical markers of the blood serum of pregnant women in their 1-st and/or 2-nd trimester. In addition, individual colonies with a phenotype deviant from the main cell phenotype were detected in 4 cultures. Stress is laid on the strong need for performing karyotyping of several tissues from fetus or from the born child in order to confirm a true or tissue-limited mosaicism.

ГУЛЬКО Т.П., КОВАЛЬЧУК М.В.

*Институт Молекулярной биологии и генетики НАН Украины,
Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150*

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЫШЕЙ, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К СПОНТАННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ.

В экспериментальной онкологии широко используют модели грызунов, особенно, мышей со спонтанными опухолями. Более адекватными моделями онкологических заболеваний человека являются те, которые подразумевают использование животных со спонтанно возникающими новообразованиями. Такие модели широко используются для исследования механизмов возникновения и развития опухолей, т.к. в этих случаях опухоль образуется из клеток организма, подвергшихся спонтанной злокачественной трансформации [1,2].

Исследования на моделях линий мышей, предрасположенных к спонтанным новообразованиям, позволяют приблизиться к пониманию основных биологических свойств неопластических заболеваний человека, и разработать новые эффективные подходы к воздействию с целью лечения или уменьшения риска онкозаболеваний [3].

В нашей работе использовались половозрелые мыши (2-2,5 мес.) линии ICR, которая является потомством аутбредной популяции полученной в Institute of Cancer Research (США), и путем близкородственных скрещиваний животных в сочетании тщательной селекцией поддерживается с начала 80-х годов в виварии Института Молекулярной биологии и генетики НАН Украины [2,3].

Постоянное и широкое использование в экспериментах линейных животных требует регулярных и объективных сведений об их физиологических и молекулярно – генетических особенностях.

Целью данного исследования было изучение некоторых физиологических и молекулярно-генетических особенностей описанной выше популяции мышей. Работа была предпринята для оптимизации использования этих животных в изучении онкогенеза, в частности, развития рака молочной железы, который является одной из самых частых форм злокачественных новообразований у человека и животных [3,4]. Для изучения оптимальных подходов в осуществлении генетических манипуляций был проведен поиск молекулярных маркеров для изучаемой линии. Известно, что фрагменты некодирующих (а потому накапливающих мутации) повторяющихся последовательностей ДНК могут служить молекулярными маркерами как геномов линий, так и индивидуальных геномов. Микросателлитные локусы с большой частотой

встречаются в геноме и достаточно равномерно распределены по длине генома. Длина микросателлитов варьирует в популяции, но наследуется как стабильная аллель. Для генетического маркирования исследуемых мишей линии ICR использовался микросателлитный анализ локуса TNF, который находится в районе главного комплекса гистосовместимости (H-2) 17-й хромосомы, а именно, микросателлитных районов, связанных с генами *Tnfa* и *Tnfβ*. Локус *Tnfa* содержит простые прямые повторы CA, а локус *Tnfβ* – сложные нуклеотидные повторы [8]. Выбор именно этого района был связан с тем, что ген *Tnfa* кодирует противовоспалительный мультифункциональный цитокин, который вовлечен в регуляцию широкого спектра биологических процессов, а именно, воспалительных, пролиферативных, иммунной регуляции, антивирусных ответов. Лимфотоксин, продукт гена *Tnfβ*, также является цитокином, который продуцируется Т-киллерами. Полиморфизм в районах выбранных локусов может быть также полезен в исследовании процессов канцерогенеза [9].

Материалы и методы

В исследованиях использовались половозрелые животные, происходящие от исходной линии ICR, длительно поддерживаемой путем инбредного размножения в виварии ИМБиГ НАН Украины. На протяжении всего жизненного периода фиксировали ряд физиологических (поведенческие качества животных, их характер, длительность жизни животных, плодовитость, жизнеспособность потомства и многие другие), а также онкологических параметров (частота возникновения опухолей, их форма, структура и локализация). Определение вида опухоли производили путем стандартного гистологического исследования срезов ткани, получаемых оперативным путем. Изучались препараты, фиксированные формалином, а также нефиксированные замороженные препараты. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Приготовленные препараты анализировали под микроскопом при увеличении 200х и 400х. Микросателлитные локусы анализировали с помощью ПЦР. Для сравнения использовали лабораторные линии BALB/c, C57BL/6, изученные по анализируемым локусам. Тотальную ДНК из крови отдельных мышей выделяли с помощью тест-системы «BLV-test». Выявление полиморфизма в локусах *Tnfa* и *Tnfβ* проводили с использованием праймеров f(5'GGACAGAGAAGAAATGGGTTTC 3') и r(5'TCGAATCTGGGGCCAATCAGGAGGG 3') для локуса *Tnfa*, а также f(5'TTCCTGTGGCGGCCTTATCAG 3') и r(5'AGACAATGGGTAACAGAGGCA 3') для *Tnfβ* [9]. Реакционная смесь для ПЦР содержала 10х буфер, 2мМ хлорид магния, 0,20мМ нуклеотидтрифосфаты, 0,25мкМ праймеры и Taq-полимеразу «Fermentas» (Литва). Разделение продуктов амплификации проводили в 12% ПААГ с последующей визуализацией в ультрафиолетовом излучении с использованием бромистого этидия.

Результаты и обсуждение

В результате длительного и постоянного наблюдения было отмечено, что животные очень требовательны к условиям ухода, кормления и содержания. Мыши достаточно подвижны, в меру агрессивны. У них отчетливо выражен инстинкт запасаения пищи. Самки дают многочисленное потомство, заботливо относятся к своим детенышам, хорошо выкармливают мышат. Детеныши быстро растут и созревают. Отход детенышей в подсосный период очень низкий (до 3%). Животные обладают достаточно высокой интенсивностью роста и развития.

Биологические параметры изучаемых животных следующие:

Половая зрелость	30-35 дней.
Физиологическая зрелость	45-55 дней.
Продолжительность жизни	до 3 лет (у самцов) до 1,5 лет (у самок)*

Продолжительность беременности	19-21дн.
Плодовитость	6-20 детенышей/помет.
Продолжительность лактации	20-25дней
Масса новорожденных мышат	1,9-2,5г
Возраст отсадки молодняка	21-25дн.

* Причиной более ранней гибели самок является возникновение спонтанных злокачественных опухолей

График изменения веса в зависимости от возраста представлен на рисунке 1.

Эти животные являются привлекательной моделью для исследования канцерогенеза в силу возможности наблюдения за ростом и развитием опухоли на протяжении длительного периода времени. В результате наших исследований была установлена высокая частота спонтанного возникновения опухолей, 80% из которых представлена злокачественными новообразованиями молочной железы (у самок), 10% - раком прямой кишки, и 10% - лейкемией (у самцов). Анализ литературных данных показал, что исследуемые животные по частоте развития спонтанных опухолей молочной железы занимает среди различных линий одно из первых мест [5,6].

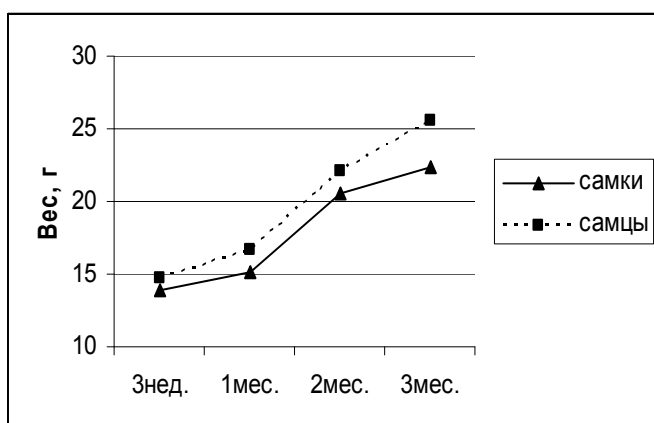


Рис. 1. Изменение веса у мышей различного возраста исследованной популяции, восходящей к линии ICR

Даже у виргинных самок, принадлежащих к этой популяции, частота спонтанного возникновения опухолей превышает аналогичный показатель высокораковой линии A/Sn (39% по сравнению с 22%), что может быть обусловлено генетически детерминированным гормональным

профилем [7]. Частота злокачественных новообразований у рожавших самок еще выше, и составляет более 80%. Предположительно, предрасположенность к злокачественным новообразованиям может наследоваться потомством во время кормления молоком, что позволяет говорить о возможной вирусной природе этих новообразований.

Часто опухоли сопровождаются многочисленными метастазами. Срок появления и развития метастазов у каждого отдельного животного может быть различным. В большинстве случаев у появившихся одиночных или множественных метастазов, расположенных рядом с основной опухолью, определяются те же особенности морфологии и биологические характеристики, что и у первичной опухоли [5]. Возникновение рака молочной железы у самок обычно наблюдается в возрасте 6-8 месяцев, при этом имеет значение возраст самки в момент первых родов. Многие исследователи связывают образование и рост опухоли с генетической нестабильностью, которая повышается с возрастом и сопряжена со способностью неопластических клеток к интенсивной пролиферации [6].

Как и следовало ожидать, опухоли, особенно при длительном существовании, оказывают резко выраженное влияние на организм, вызывая глубокие нарушения обмена веществ, ведущие к всеобщему истощению организма – кахексии и дистрофии. Было отмечено, что опухоли в процессе роста меняют форму и структуру. На начальных этапах развития опухоль определяется в виде маленького плотного узелка, который по мере роста опухоли может видоизменяться, приобретая плотную или рыхлую структуру. Поскольку у мышей 5 пар сосков, то часто спонтанные опухоли бывают множественными с различными местами локализации.

В результате гистологического анализа было установлено, что опухоль молочной железы представляет собой типичную аденокарциному и по своей морфологической характеристике не отличается от описанных ранее опухолей у других линий мышей. Как и в человека, эта опухоль относится к высоко агрессивным злокачественным опухолям вследствие высокой потенции к метастазированию [5]. Метастазы чаще встречаются в подмышечных лимфатических узлах (60%), подключичных (20%) и парастернальных (20%). Безусловно, что на рост и структурную выраженность опухоли сильно влияют индивидуальное состояние животного и индивидуальные биологические особенности организма.

Изучалась также зависимость частоты возникновения опухолей различной локализации опухолей от времени года (рис.2). Путем проведения статистического анализа (критерий χ^2) было показано наличие достоверной разницы между распределением частот опухолей различной локализации в зимне-осенний и весенне-летний период. Летом преобладают опухоли, локализованные в области задних конечностей и гениталий, тогда как в остальное время года частоты таких опухолей сравнимы с частотой опухолей, локализованных в области передних конечностей. Что касается опухолей всех прочих локализаций, то они возникают практически исключительно в зимне-осенний период. Предположительно, это может быть связано или с сезонными колебаниями гормонального фона животных – или же с их возрастными особенностями.

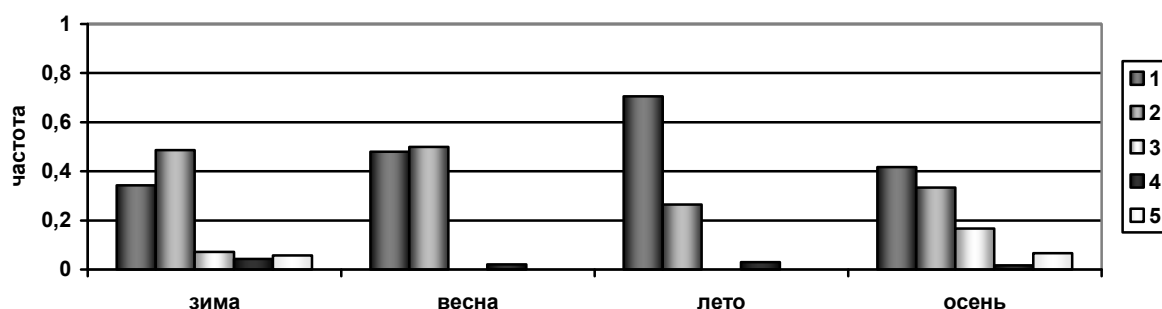


Рис. 2. Локализация спонтанно возникающих опухолей у мышей исследованной популяции, восходящей к линии ICR

1 - область задних конечностей и гениталий; 2 - область передних конечностей; 3 - вентральная поверхность туловища; 4 - латеральная поверхность туловища; 5 - другие локализации

Сравнительный анализ с использованием микросателлитных маркеров показал, что TNFa микросателлиты отличаются по размеру в пределах трех тестируемых лабораторных линий. Для животных линии ICR характерен самый короткий повтор. По локусу *Tnfβ* у линий не обнаружено явной гетерогенности.

Гель-электрофореграмму продуктов ПЦР, полученных с помощью праймеров к вариабельным последовательностям локуса TNFa и *Tnfβ* представлено на рисунке 3.

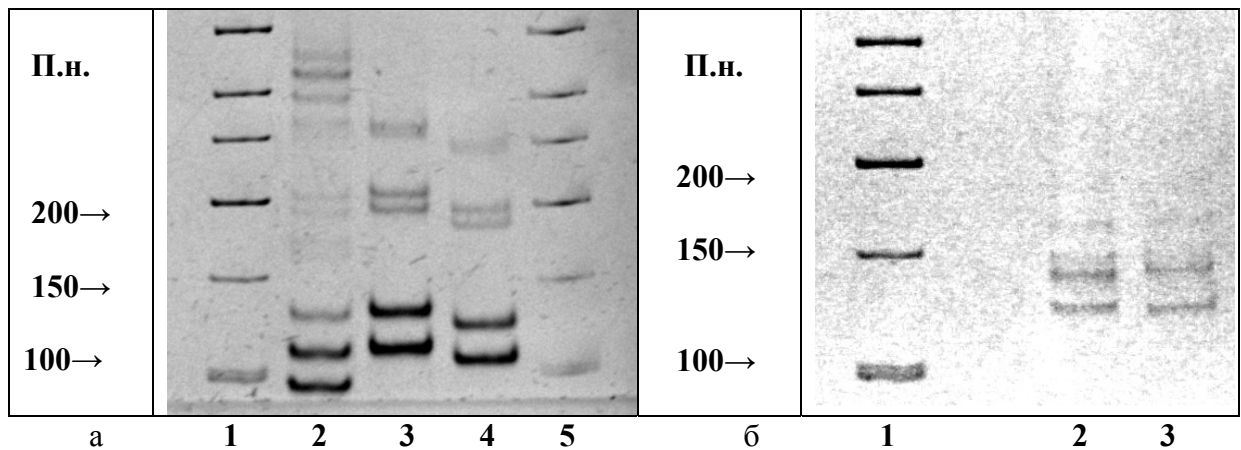


Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации, полученных с помощью праймеров к переменным последовательностям локуса TNF α (а) и TNF β (б): 1, 5 – маркер 50 bp DNA Ladder (Fermentas); 2 – линия ICR; 3 – линия BALB/c; 4 – линия C57BL/6

Литература

1. *Медведев Н.И.* Линейные мыши // Ленинград:— Медицина.— 1964.—С.180.
2. *Бланцова З.К., Душкин В.А., Малащенко В.М.* Линии лабораторных животных для медико –биологических исследований //—М. Наука.— 1983.—С.190.
3. *Лобанова З.И., Бланцова З.К.* Онкологическая характеристика мышей инбредных линий // Биология лабораторных животных.—М.1971.—Вып.3.— С.20-22.
4. *Литвинов С.В., Крюкова И.Н.* Молекулярно-генетические основы онкогенного действия вируса рака молочной железы мышей // Эксп. Онкол.— 1985.—Т.7, № 1.—С. 3-10.
5. *Мартынова Р.П., Роничевская Г.М., Диденко В.И.* // Морфологическая характеристика спонтанных опухолей молочных желез, возникших у мышей высококорактовых линий А и СЗН // В. Лабораторные животные в медицинских исследованиях. Тез. конф.— Москва.— 1974.—С. 35-39.
6. *Ковалева О.А., Вагина И.Н., Морозова Л. М., Глазко Т.Т., Глазко В. И.* Генетическая нестабильность и предрасположенность к развитию опухолей у лабораторных линий мышей // Доп. НАН України. — 2007. — № 2. — С. 158-162.
7. *Kharkovskaya N.A., Krasnova N.N., Klepicov N.N., Khrustalev S.A.* Oncologic and genetic characteristics of A/Sn mice // Exp.Oncol. – 2000. – Vol.22. – P. 157 – 159.
8. *Love J.M., AM Knight A.M., McAleer M. A.* Towards construction of a high resolution map of the mouse // Nucleic Acids Research. — 1990. — Vol.18, № 14. — P.4123 - 4130.
9. *Abdolhossein Rezaeian, Mohammad hossein Alimohammadian, Sirous Zeinali.* Microsatellite analysis of mouse TNF and Cypla2 loci for polymorphism: detection and evaluation of genetic contamination // Scand. J. Lab. Anim. Sci. — 2003. — Vol. 30, № 3. - P.143-149.

Резюме

Представлены некоторые характеристики исследуемых мышей линии ICR, предрасположенных к опухолям. Выявлена высокая и стабильная частота возникновения спонтанных новообразований, из которых 80% представляют рак молочной железы у самок. Показана возможность использования гетерогенности по локусу TNF α для генетических манипуляций и микросателлитного маркирования линии.

Представлено окремі характеристики досліджуваних мишей лінії ICR, схильних до утворення пухлин. Виявлена висока і стабільна частота появи новоутворень різної локалізації і гістогенезу, із яких 80% являють рак молочної залози у самок. Показана можливість використання гетерогенності локусу TNF α для генетичних маніпуляцій та микросателітного маркування лінії.

The biological and oncologic characteristics of mice line ICR predisposed to swellings were introduced. The high and stable frequency of appearing of spontaneous neoplasms different localization and histogenesis was detected; 80 % of malignant swellings are breast cancer. The possibility of using locus TNF α heterogeneity for genetic manipulations was shown.

ГУЛЬКО Т.П., ЛИХАЧЕВА Л.И., МАЦЕВИЧ Л.Л., КОРДИУМ В.А.

Институт Молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03143, Киев, ул. Заболотного, 150

ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ СМЕСИ (БАС) НА ЧАСТОТУ СПОНТАННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У МЫШЕЙ

Профилактика онкологических заболеваний является актуальной задачей. Многочисленные исследования показали сходство многих аспектов канцерогенеза у человека и животных. Особенно это просматривается в выяснении вопросов этиологии, патогенеза, процесса роста опухолей у животных. Поэтому современная экспериментальная онкология активно использует разнообразные животные модели. Для каждого конкретного исследования экспериментатор выбирает модель, учитывая ее особенности и адекватность поставленной задачи, достоинства и недостатки. Классическими объектами экспериментальной онкологии являются линии грызунов, прежде всего, мышей, характеризующиеся повышенной частотой спонтанного возникновения опухолей [1-3].

В данной работе использовались мыши отечественного разведения линии ICR с высокой частотой возникновения спонтанных опухолей (рак молочной железы), содержащиеся на базе вивария Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины. Эти животные были впервые выведены в Institute of Cancer Research (ICR) и завезены к нам, как аутбредная популяция мышей со спонтанным возникновением опухоли – рака молочной железы у самок.

В результате длительного близкородственного скрещивания и тщательного отбора животных по таким признакам, как выживаемость, жизнеспособность потомства и опухоленосительство, получена и стабильно поддерживается нами высоко инбредная и высокоракочная так называемая сублиния мышей отечественной разводки линии ICR [3,4].

Для животных этой линии характерна высокая частота спонтанного возникновения опухолей молочной железы различной локализации у самок 6 - 8-месячного возраста. А к 1,5 годам от опухолей погибают все самки. Так как у мышей 5 пар сосков, проявление опухолей может быть множественным. Опухоленосительство, как свойство этих мышей, передается по наследству потомству, возможно, при кормлении молоком, что не происходит у человека[5].

Целью наших исследований было изучение влияния скармливания биологически активной смеси (БАС) в качестве добавки к ежедневному рациону на здоровье и физические параметры животных со спонтанно возникающими опухолями молочной железы, как до возникновения опухоли, так и в процессе ее роста.

Материалы и методы

В наших исследованиях использовались самки репродуктивного возраста (на момент начала эксперимента – 2-2,5 мес.), характерным свойством которой является повышенная частота спонтанного возникновения опухолей молочной железы в более позднем возрасте. Из половозрелых мышей были сформированы семьи; эти семьи были разделены на две группы – опытную и контрольную. Экспериментальные животные ежедневно получали дополнительно к стандартному рациону постоянную дозу биологически активной смеси (БАС), которая представляла собой комплексную биодобавку, состоящую из применяемых в медицинской практике витаминов и

антиоксидантов. Состав добавки в данной статье не раскрывается, поскольку в будущем предполагается оформить его как объект авторского права. Чтобы обеспечить равное поступление добавки в организм каждой мыши, БАС скармливалась каждой самке индивидуально, в форме фиксированной дозы двух концентрированных растворов – масляного и на основе молока – нанесенных на хлеб. Животные поедали добавку охотно.

В течение опытного периода времени изучали изменение биологических и физиологических параметров мышей: фиксировали количество родов, величину помета, отмечали возраст появления опухолей у самок, исследовали динамику темпов роста опухоли и длительность жизни животных с онкозаболеваниями. Регулярно способом пальпации анализировали плотность опухоли, визуально наблюдали за изменением ее формы и консистенции. Изменение размеров опухоли оценивали по изменению ее объема. Ежедневно контролировали внешний вид и поведение животных, наличие аппетита к пище с соответствующей добавкой.

Результаты и обсуждение

Основной причиной гибели животных обеих групп в позднем возрасте были злокачественные опухоли. Остальные случаи смерти связаны с неидентифицированными причинами. Однако анализ полученных данных показал, что регулярное употребление биологически активной смеси привело к значительному продлению периода физиологического здоровья самок, т.е. появление спонтанных опухолей наблюдалось у самок из экспериментальной группы в среднем на 35-37 дней позже по сравнению с контрольными животными (табл. 1).

Таблица 1

Влияние скармливания БАС на онкологические характеристики мышей высокоракковой линии ICR

Показатели	Опыт (N=50)	Контроль (N=34)
Возраст появления опухолей у самок (в днях)	300±9,2	263±10,6
Продолжительность жизни самок с опухол. (в днях)	70,7±6,7	54,8±12,2
Доля заболевших самок, %	84,0±1,4	81,6±1,9

Содержание животных до естественной смерти (заболевших – до появления признаков кахексии) позволило определить естественный отход животных, а также долю животных, у которых развилось онкозаболевание, и установить общую продолжительность жизни заболевших самок, которая колебалась в пределах от 11 до 28 мес. Отмечено, что заболевшие самки в опытной группе жили в среднем на 2-2,5 недели дольше, чем в контрольной. Доля заболевших животных в обеих группах достоверно не различалась, что, скорее всего, может свидетельствовать о том, что возникновение опухолей наследственно предопределено.

Иногда у животных отмечалось одновременное образование нескольких опухолей (множественные новообразования). Множественные опухоли не всегда располагались рядом, иногда они появлялись на значительном расстоянии друг от друга. Интересно, что в опытной группе количество животных с множественными опухолями составляло 28% (14 из 50 животных), что меньше, чем в контрольной группе, где такие опухоли образовывались в 38% случаев (13 из 34 животных). Это различие, однако, не носит достоверного характера (использовался критерий χ^2).

В ходе эксперимента было выявлено, что скармливание БАС животным значительно влияло также на репродуктивные свойства самок, в частности, на их плодовитость. В ходе исследования фиксировали следующие показатели: величину

помета и развитие детенышей в постнатальный период. В результате было показано, что у самок экспериментальной группы увеличилось количество больших пометов (9-14 детенышей на момент родов) по сравнению с контрольными. Такое увеличение произошло за счет снижения доли средних пометов (6-8 детенышей), которые у самок этой линии обычно преобладают. При этом доля пометов с малым количеством детенышей (3-5) оставалась практически неизменной. Увеличение размера пометов, по-видимому, происходило в результате лучшей эмбриональной выживаемости и жизнеспособности плодов, о чем свидетельствует не только количество жизнеспособных новорожденных мышат, но и темпы их роста вплоть до отъема детенышей от матери. В среднем, вес мышат, полученных от самок экспериментальной группы, по достижении возраста 4 недель был на 2-3 г больше, чем у детенышей самок из контрольной группы. Мышата от самок опытных групп были более крепкими и жизнеспособными: отход мышат из больших пометов в подсосный период был в 3-3,5 раза ниже, чем среди их сверстников из пометов того же размера, принадлежащих самкам контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2

Плодовитость самок ICR при скормливания им БАС, и постнатальное развитие их потомков.

ПОКАЗАТЕЛИ	ОПЫТ	КОНТРОЛЬ
Количество пометов:		
Большие (9-14)	50±1,2	30,4±1,8
Средние (6-8)	36,1±0,98	56,5±1,1
Малые (3-5)	13,9±0,34	13,1±0,73
Вес мышат при отъеме от матери в больших пометах, г	13,87±0,31 N=101	11,17±0,23 N=31
Отход детенышей в подсосный период в больших пометах, (%)	3,91±0,98 N=128	13,8±1,03 N=58

Многие исследователи связывают появление опухолей и их рост с генетической нестабильностью и повышением пролиферативного потенциала клеток [6,7]. В результате сравнительного анализа динамики роста исследуемых новообразований у животных из опытной группы было установлено значительное замедление роста опухоли до достижения ею объема 1 см³, что может быть причиной лучшего общего состояния здоровья и повышенной сопротивляемости животных, регулярно получавших БАС в качестве добавки к ежедневному рациону. При достижении опухолью объема 1 см³ и более, мы зафиксировали ускорение темпов роста опухоли, наблюдавшееся как у опытных, так и контрольных групп, хотя при этом у экспериментальных животных рост новообразований оставался более медленным и продолжительным, чем в контроле. (рис.1).

Прогрессирующий рост опухоли, как правило, сопровождается возрастанием пролиферативной активности клеток. Этот фактор рассматривается, как основополагающий критерий опухолевой прогрессии. Продолжительное скормливание БАС мышам, возможно, через укрепление иммунной системы, либо же иных защитных систем организма, сдерживает рост опухоли и миграцию клеток. Анализ полного жизненного периода опытных животных выявил значительно большую продолжительность жизни экспериментальных животных, которые получали БАС. К тому же в данном случае у опытных животных рядом с основной опухолью метастазов не наблюдалось. В контроле напротив, появлялись множественные метастазы такой локализации.

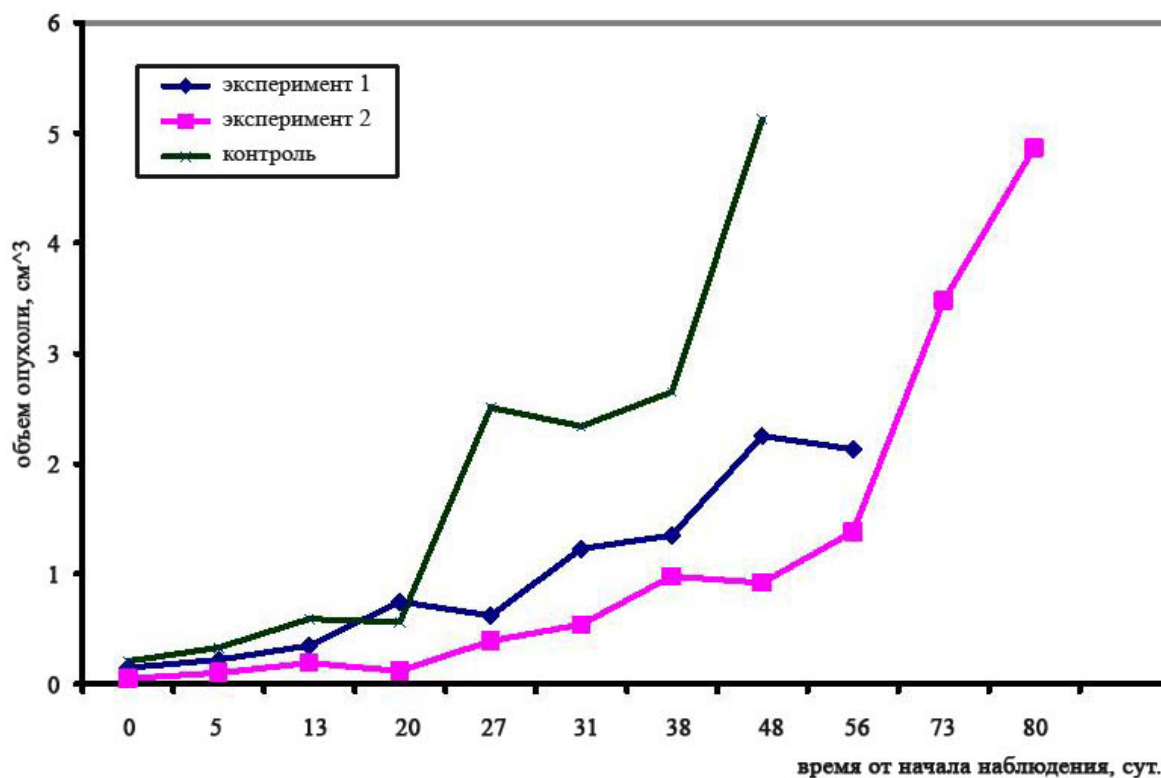


Рис. 1. Динамика роста опухоли у мышей, получавших и не получавших БАС.

Выводы

Скармливание биологически активной смеси (БАС) мышам на протяжении длительного времени положительно влияло на общее состояние здоровых и онкобольных животных, аналогичный эффект замечен также в отношении их размножения и жизнеспособности их потомства. Использование БАС в качестве добавки к ежедневному рациону мышей способствует продлению фазы медленного роста опухоли и уменьшению частоты возникновения метастазов. Это дает основание рекомендовать препарат для клинических испытаний в качестве добавки для укрепления организма человека и снижения риска онкозаболеваний.

Препарат может быть рекомендован также для применения в сельскохозяйственной практике с целью улучшения биологических и физиологических параметров, в том числе, и плодовитости, сельскохозяйственных животных.

Литература

1. Шевченко И.Н. Модели для изучения ранних показателей предопухолевого состояния организма // Материали III наук-практ.конф. "Проблеми онкогенетики: наукові та прикладні аспекти".—2002.—№4.—С.50—51.
2. Бланцова З.К., Душкин В.А., Малащенко В.М. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. — М. Наука.— 1983.—С190.
3. Медведев Н.И. Линейные мыши. — Ленинград: Медицина.— 1964.—С18с.
4. Kharkovskaya N.A., Krasnova N.N., Klepicov N.N., Khrustalev S.A. Oncologic and genetic characteristics of A/Sn mice // Exp. Oncol. — 2000. — Vol.22. — P. 157 – 159.
5. Лобанова З.И., Бланцова З.К. Онкологическая характеристика мышей инбредных линий — Москва.—1971.—3.—С.20—22.
6. Cahill D.P., Kinzler K.W., Vogelstein B., Lengauer C. Genetic instability and darvian selection in tumors // Trends in Biology Science, Millenium issue.—2000.—P.57—60.
7. Foulds I. Multiple etiologic factors in neoplastic development// Ibid—1980.—40.—P.725—733.

Резюме

Исследована частота возникновения спонтанных опухолей рака молочной железы в процессе длительного скармливания исследуемым мышам биологически активной смеси (БАС). Установлено, что БАС, использованная в качестве добавки к ежедневному рациону животным, оказывает положительное влияние на биологические, физиологические параметры животного и может быть профилактической мерой снижения частоты спонтанного возникновения опухолей и метастазов.

Вивчено частоту виникнення спонтанних новоутворень - раку молочної залози у дослідних мишей на протязі тривалої годівлі біологічно-активної суміші (БАС). Встановлено, що БАС, яка використовувалась як добавка до щоденного раціону мишам, справляла позитивний вплив на здоров'я та фізіологічні параметри тварин, і може розглядатись як перспективний профілактичний захід з точки зору зменшення частоти спонтанного виникнення новоутворень, та метастазування.

The frequency of appearing of spontaneous swellings of mice breast cancer under conditions of long-lasting feeding with biologically active mixture (BAM) was investigated. It was shown that the BAM used as a component of a daily diet for experimental animals had positive effect on physiological characteristics and could be recommended for decreasing of frequency of spontaneous appearing swelling and metastasises.

ДЬОМІНА Е. А., ДЕМЧЕНКО О. М., САВКІНА М. Ю

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 45, e-mail: demchenko_e@mail.ru
Інститут математики НАН України, Україна, 01601, Київ-4, вул. Терещенківська, 3*

ХАРАКТЕР КАЛІБРУВАЛЬНИХ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ КРИВИХ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ІНДИВІДУАЛЬНОЇ РАДІОЧУТЛИВОСТІ ЛЮДИНИ

Невизначеність характеру дозової залежності цитогенетичних ефектів в області малих доз радіації ускладнює біологічну дозиметрію та оцінку канцерогенного ризику в даному інтервалі доз [1]. Новим методичним підходом до побудови калібрувальних кривих є урахування радіочутливості індивідуума [2] на формування якої впливають спадковість, функціональний стан клітини під час опромінення, репаративний потенціал, тощо [3].

Мета роботи: визначити вплив індивідуальної радіочутливості на характер дозових цитогенетичних залежностей.

Матеріали і методи

Дослідження виконано на культурі лімфоцитів периферичної крові донорів з метафазним аналізом аберацій хромосом [2]. Індивідуальну радіочутливість (IP) донорів визначали за допомогою G_2 radiosensitive assay, як рівень радіаційно-індукованих хроматичних делецій на 100 клітин [3]. Тестуюче опромінення виконано на терапевтичному апараті "Рокус", джерелом яких є ^{60}Co ; потужність дози - 0,9 Гр/хв; діапазон досліджених доз 0,1 – 1,0 Гр. Характер дозових кривих вивчали на основі оцінки параметрів лінійної, лінійно-квадратичної та сплайнової моделей.

Результати та обговорення

На дозовій кривій, що отримана для найбільш радіочутливого донора (23 делеції / 100 клітин) в діапазоні 0,1 - 0,3 Гр спостерігається плато, тобто дозозалежна ділянка; калібрувальна крива має високий нахил (при дозі 1,0 Гр - 42 аберації, 0,1 Гр. – 19,6 відповідно) (рис.1).

Для дозової кривої, отриманої для більш радіорезистентного донора (IP становить 6,8 на 100 проаналізованих метафаз) плато починається з дози 0,3 Гр; калібрувальна крива характеризується більш низьким нахилом (при 1,0 Гр – 15 аберацій; 0,1Гр – 4,5 відповідно) (рис.1)

Для променевиx маркерів - дицентричних хромосом – у донорів з близькими значенням IP (20 та 23/ клітин) плато реєструється в інтервалі 0,3 – 0,5 Гр, тоді як у радіорезистентного донора дицентрики виявляються, починаючи з дози 0,5 Гр (рис.2).

Аналізуючи отримані дані можна узагальнити, що характер калібрувальних кривих однозначно залежить від індивідуальної радіочутливості організму обстежених осіб, формування якої пов'язано з генетично детермінованим репараційним потенціалом [3].

Підтвержені сформульовані нами раніше висновки [2]: з метою удосконалення цитогенетичної дозиметрії в області малих доз радіації більш доцільним являється аналіз калібрувальних кривих з використанням сплайнової моделі, яка має найменші значення похибок. Наприклад, у донора 1 похибка для аберантних метафаз лінійної моделі становить 4,387; лінійно-квадратичної -2,156; а сплайнової – 0,875 відповідно (табл.1).

Таким чином, нами вперше встановлено, що при побудові калібрувальних дозових кривих необхідно враховувати індивідуальну радіочутливість людини. Запропонований методичний підхід доцільно застосовувати при реконструкції поглинених доз на основі хромосомних аберацій в лімфоцитах опромінених осіб.

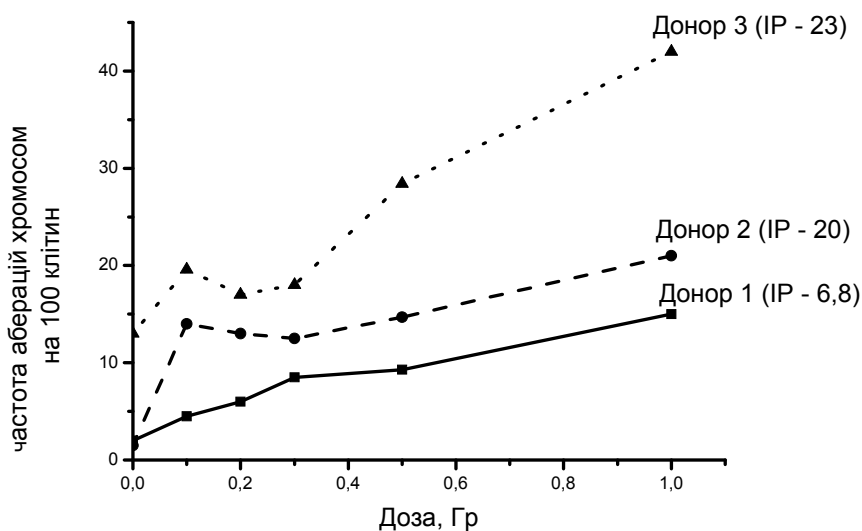


Рис. 1 Частота індукованих аберацій хромосом в залежності від індивідуальної радіочутливості донорів

Таблиця 1.

ПАРАМЕТРИ ЛІНІЙНОЇ, ЛІНІЙНО-КВАДРАТИЧНОЇ ТА СПЛАЙНОВОЇ МОДЕЛЕЙ ДЛЯ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРИ ГАММА-ОПРОМІНЕННІ КУЛЬТУРИ ЛІМФОЦИТІВ В ДІАПАЗОНІ ДОЗ (0,1 – 1,0 ГР)

№ донора	Цитогенетичні показники	Похибка моделі			Лінійна регресія		Лінійно-квадратична регресія			X_0	Сплайнова регресія			
		лінійна	лінійно-квадратична	сплайнова	a	b	a	b	c		a_1	b_1	a_2	b_2
1	Аберантні метафази, %	4,387	2,156	0,875	12,206	3,278	-6,329	18,723	2,486	0,300	19,532	2,198	21,73	5,166
	Загальна кількість аберацій хромосом	4,387	2,156	0,875	12,206	3,278	-6,329	18,723	2,486	0,300	19,532	2,198	21,73	5,166
	Дицентрики	1,695	0,112	1,240	2,977	-0,542	5,331	-2,513	0,144	0,500	0,000	-0,000	-0,000	-3,000
2	Аберантні метафази	69,868	59,652	8,731	13,992	7,786	13,602	28,000	6,035	0,100	106,05 5	1,500	107,55 5	11,226
	Загальна кількість аберацій хромосом	69,337	56,689	7,186	14,130	7,838	15,069	29,647	5,898	0,100	106,95 3	1,500	108,45 8	11,306
	Дицентрики	1,308	0,745	0,488	4,908	-0,301	3,180	1,634	0,108	0,500	2,838	0,076	2,914	-2,01
3	Аберантні метафази	87,546	80,633	74,317	18,229	16,720	11,140	6,757	18,154	0,300	4,011	18,816	22,824	13,055 4
	Загальна кількість аберацій хромосом	113,05 1	104,731	99,687	22,191	18,483	12,222	9,605	20,057	0,300	7,900	20,590	28,49	14,8
	Дицентрики	6,495	1,494	0,532	8,908	-0,968	9,475	-0,849	0,252	0,500	3,324	0,049	3,373	-5,578

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

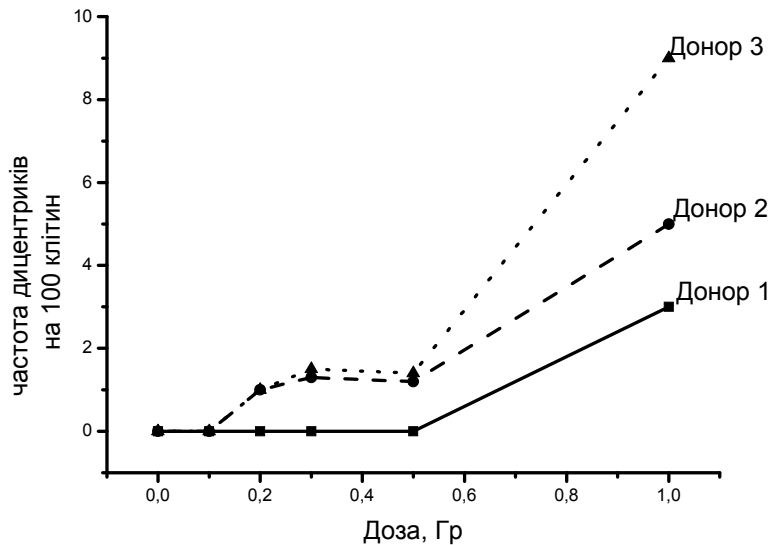


Рис. 2 Частота дицентричних хромосом в залежності від індивідуальної радіочутливості донорів

Література

1. Снигирева Г. П., Богомазова А. Н., Новицкая Н. Н., Хазинс Е. Д., Рубанович А. В. Биологическая индикация радиационного воздействия на организм человека с использованием цитогенетических методов // Метод. рекомендации. – 2007. 32 с.
2. Демченко О. М., Дьоміна Е. А., Петунін Ю. І., Савкіна М. Ю. Индукция генетических повреждений за дії малих доз іонізуючої радіації // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2009, Вип. 1-2. С. 52-63
3. Дьоміна Е. А., Дружина М. О., Рябченко Н. М. Індивідуальна радіочутливість людини. – К.:2006. 125 с.

Вперше встановлено, що при побудові калібрувальних дозових кривих необхідно враховувати індивідуальну радіочутливість людини (G_2 assay). Запропонований методичний підхід доцільно використовувати з метою удосконалення біологічної дозиметрії на основі аналізу аберацій хромосом.

Впервые установлено, для описания дозовых кривых необходимо учитывать индивидуальную радиочувствительность человека (G_2 assay). Предлагаемый методический подход целесообразно использовать с целью усовершенствования биологической дозиметрии на основе анализа абераций хромосом.

For the first be settled for description doses curves it is necessary to consider individual sensitivity to radiation (G_2 assay) of the person. The offered methodical approach is expedient for using for the purpose of improvement of biological dosimetry on the basis of the analysis of aberrations of chromosomes.

ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЕСЬВ Г.Д.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
03680 м. Київ, вул. акад. Заболотного 150,
e-mail: m.v.dybkov@imbg.org.ua

МУТАЦІЯ V617F ГЕНА *jak2* ЯК МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МАРКЕР У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ .

Одним із важливих аспектів сучасної генетики є використання генетичних маркерів у різних галузях науки і практики, зокрема, у медицині. Молекулярно-генетичні методи діагностики різних захворювань все ширше використовують як при встановленні діагнозів, так і для контролю ефективності лікування. Це значно прискорює встановлення діагнозу та підвищує його достовірність.

Хронічні мієлопроліферативні захворювання (ХМПЗ) — гетерогенна група неопластичних захворювань, які характеризуються множинною гіперплазією гемопоетичних клітин кісткового мозку. До них відносять хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), хронічну нейтрофільну лейкемію, хронічну еозинофільну лейкемію, справжню поліцитемію, есенціальну тромбоцитемію, ідіопатичний мієлофіброз та хронічні мієлопроліферативні захворювання, неklasифіковані.

Ще кілька років тому лише для хронічної мієлоїдної лейкемії було описано чіткий цитологічний маркер — Ph-хромосому [t(9; 22)(q34; q11)], та ,відповідно, молекулярний маркер – злитий ген *bcr/abl*, на виявленні якого за допомогою ЗТ-ПЛР базується переважна більшість діагностичних методик.

Оскільки для решти ХМПЗ донедавна молекулярно-генетичних маркерів не було описано то їх називали Ph-негативними хронічними мієлопроліферативними захворюваннями.

Але в 2005 році було опубліковано роботи [1–4], у яких було описано мутацію в чотирнадцятому екзоні гена *jak2* (який локалізовано на дев'ятій хромосомі), що призводила до заміни G→T і, відповідно, валіну на фенілаланін у позиції 617. Дана мутація V617F виявляється у 95% хворих на справжню поліцитемію, приблизно у 50% хворих на есенціальну тромбоцитемію та у 20% ідіопатичний мієлофіброз. Вважають, що на функціональному рівні мутації в псевдокіназному домені призводить до порушення регуляції кіназної активності. Це призводить до конститутивної активації тирозинкінази JAK2, і, як наслідок, до збільшення кількості еритроцитів, тромбоцитів та гранулоцитів.

В 2008 році було запропоновано ревізію класифікації та діагностичних критеріїв для мієлопроліферативних захворювань [5–6] в якій мутацію V617F було включено як важливий діагностичний критерій. Так у разі її виявлення виключають вторинну поліцитемію, реактивний тромбоцитоз чи вторинний фіброз кісткового мозку (secondary bone marrow fibrosis) тощо.

У дані роботі наводиться метод виявлення мутації V617F за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого секвенування.

Матеріали і методи

У роботі використовували зразки крові хворих (за інформованої згоди), що проходили лікування в гематологічних клініках м. Києва. РНК виділяли згідно [7]. Зворотну транскрипцію проводили в об'ємі 30 мкл у суміші, що містила буфер для зворотної транскриптази, 1 мМ dNTP, 0,1 мкг праймера Random Hexamer Primer, 300 од зворотної транскриптази RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 20 од РНАзіну та 1–3 мкг РНК. Реакцію проводили при 42 °С протягом 1 год і зупиняли прогріванням при 70 °С 10 хв. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об'ємі 30 мкл продовж 30 циклів (94 °С – 35 с, 55 °С – 35 с, 72 °С – 45 с.) з використанням буферу для ПЛР, 10 pmol праймерів J1F (5'–CACCAACATTACAGAGGCCTAC–3') та J1R (5'–GCCAGGATCACTAAGTTTGATG–3'), 200мкМ dNTP та 2 мкл суміші для отримання кДНК. Для проведення другого етапу ПЛР відбирали по 0,5 мкл реакційної суміші ПЛР1 і проводили синтез із використанням праймерів J2F (5' – CGGTCAACTGCATGAAACAG – 3') та J2R 5' – TTGGCACATACATTCCCATG – 3').

В якості позитивного контролю використовували праймери для 18s rRNA (5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' та 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'). Продукти ампліфікації аналізували в 2% агарозному гелі.

Отримані продукти ПЛР було очищено та сиквеновано з використанням праймерів J2F, J2R на автоматичному сиквенаторі. Отримані послідовності було проаналізовано для допомоги програм BioEdit та BLAST.

Результати та обговорення

Хоча виявлення мутації V617F можливе і без проведення зворотної транскрипції ми вважаємо за доцільне використання саме ЗТ-ПЛР, оскільки отриману на першому етапі аналізу кДНК можна також використовувати для одночасного виявлення злитого гена *bcr/abl* [8] та інших можливих змін. Тому даний підхід уніфікує початкові процедури дослідження зразків крові.

кДНК синтезували з використанням у якості затравки розсіяного праймеру d(NTP)₆, що дозволяє проводити виявлення не тільки мутації в гені *jak2*, а й інших генетичних аномалій, насамперед злитого гена *bcr/abl*.

Використання двоетапної “гніздової” ПЛР викликано двома причинами. Після першого етапу ПЛР кількість ампліфікатів недостатня для сиквенування. Але окрім примноження ампліфікату завдяки використанню внутрішніх праймерів забезпечується додаткова специфічність діагностики. Оскільки праймери підібрано на різні екзони гена *jak2*, а він має протяжні інтрони, домішки ДНК не можуть впливати на проведення ЗТ-ПЛР.

Сиквенування ампліфікатів проводили на автоматичному сиквенаторі з використанням праймерів (роздільно) J2F та J2R. Сиквенування обох ланцюгів ампліфікату слугує для високої надійності виявлення мутації та виключення випадкових артефактів при встановленні послідовності. Мутація V617F, яка як згадували вище, призводить до заміни валін та фенілаланін є наслідком точкової мутації G→T, тобто зміни кодону GTC на TTC.

На рис. 1 представлено електрофореграму продуктів ПЛР та результати сиквенування ампліфікатів хворого П., 1950 року народження, яких хворіє на справжню поліцитемію з 1998 р. Як видно з рисунку на денситограмі спостерігаються два піки, що відповідають нуклеотидам С та А в позиції 2343 (наведено сиквенс зворотного ланцюга, нумерація згідно послідовності мРНК *jak2* NM_004972.2 Homo sapiens Janus kinase 2), тобто виявляється як нормальний CAG кодон, так і мутантний AAG. Тобто було виявлено мутацію V617F, що є молекулярним підтвердженням поставленого діагнозу “справжня поліцитемія”.

Таким чином, запропонована методика виявлення мутації V617F за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого сиквенування може використовуватись для молекулярно-генетичної діагностики хронічних мієлопроліферативних захворювань.

Література

1. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // *Lancet* 2005.– V.365, N9464.– P. 1054–1061.
2. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // *N Engl J Med* 2005.– V.352, N17.– P. 1779–1790.
3. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // *Cancer Cell* 2005.– V.7, N4.– P.387–397.
4. Zhao R., Xing S., Li Z., et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // *J Biol Chem*. 2005.– V.280, N24.– P. 22788–22792.
5. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms // *Leukemia* 2008.– V.22.– P. 14–22.

6. *Spivak J.L., Silver R.T.* The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal // *Blood* 2008.– V.112, N2.– P. 231–239.
7. *Chomczynski P., Sacchi N.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.* 1987.– V.162.– P. 156–159.
8. *Телегеев Г.Д., Дибков М.В., Божко М.В. Демиденко Д.В., Малюта С.С., Третьяк Н.М., Бондар М.В.* Моніторинг хронічного мієлолейкозу за допомогою молекулярно-біологічних методів (методичні рекомендації) // Республіканський центр науково-медичної інформації., Київ, 1997, 20 стор., іл.

Резюме

Мутація V617F гена *jak2* є важливим діагностичним критерієм при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях. Запропоновано методику для її виявлення за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого секвенування.

Мутація V617F гена *jak2* является важным диагностическим критерием при диагностике хронических миелопролиферативных заболеваний. Предложена методика ее выявления с помощью ОТ-ПЦР и прямого секвенирования.

V617F mutation *jak2* gene is an important diagnostic criterion for the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders. The method of detection using RT-PCR and direct sequencing was proposed.

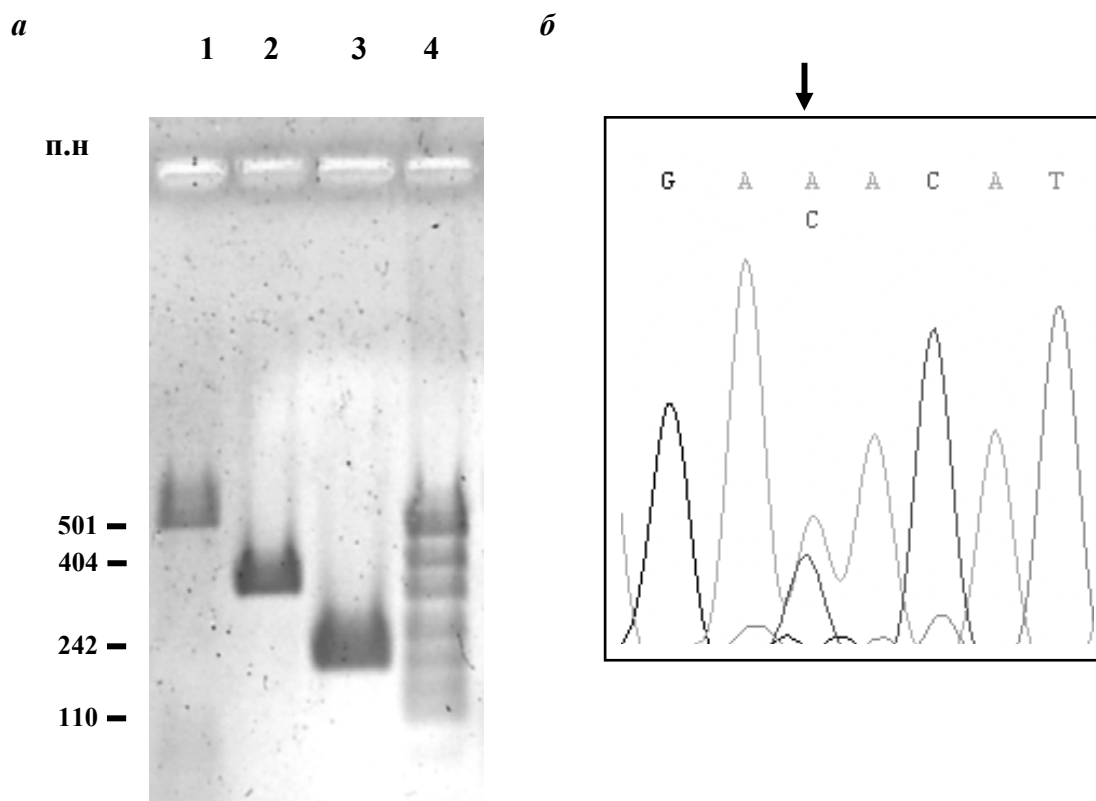


Рис. 1. Електрофореграма (а) та денситограма секвенсу послідовності (б) продукту ПЛР, що був отриманий при дослідженні крові хворого П.

а) 1 – продукт ПЛР, який отримано з використанням праймерів J1F та J1R; 2 – продукт ПЛР, який отримано з використанням праймерів J2F та J2R; 3 – ампліфікована ділянка 18s rRNA (позитивний контроль); 4 – маркер молекулярних мас pUC19/MspI.

б) Стрілкою вказано піки, що відповідають нуклеотидам С/А, які вказують на наявність мутації V617F.

ДИБСЬКИЙ С.С.

Науковий Центр радіаційної медицини АМН України, Україна, 04050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: dssdssds@rambler.ru

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ FISH ДЛЯ ВЕРИФІКАЦІЇ ДОЗ ОПРОМІНЕННЯ У 180 ЛІКВІДАТОРІВ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ

Починаючи з 1999 р., в лабораторії цитогенетики НЦРМ АМН України в рамках Українсько-Американського проекту “Лейкемія” вперше в Україні вивчались можливості методу флюоресцентної *in situ* гібридизації метафазних хромосом людини з ДНК-зондами до цільних хромосом (FISH WHP) для ретроспективної реконструкції доз опромінення у ліквідаторів Чорнобильської аварії [1 -Було підтверджено, що метод FISH WCP може бути успішно застосований у віддалені строки після опромінення людини для індикації радіаційної дії та групової біологічної дозиметрії в широкому діапазоні доз. В той же час, значна варіабільність спонтанної та радіаційно-індукованої частоти реципрокних транслокацій, а також специфіка цитогенетичного ефекту при дуже високих дозах опромінення (елімінація мультиабераантних клітин, що містять як стабільні, так і нестабільні аберації) суттєво обтяжують індивідуальну реконструкцію доз опромінення в діапазоні як малих, так і дуже великих доз. Тому на сьогоднішній день реальним залишається використання FISH аналізу для встановлення та верифікації доз опромінення у людини в діапазоні доз ~ 30 - 200 сГр [1 - 3].

Оскільки одним із нових завдань проекту “Лейкемія” у його дозиметричній частині є вибір т.з. “високодозної” групи ліквідаторів з верифікованими індивідуальними дозами опромінення, нами за допомогою методу FISH проводилося цитогенетичне обстеження учасників ліквідації Чорнобильської аварії з офіційними дозами опромінення саме у вказаному діапазоні. Необхідність таких досліджень викликана некоректністю офіційних доз опромінення у частини ліквідаторів, на що, зокрема, вказують і раніше одержані нами результати біологічної дозиметрії у реконвалесцентів після гострої променевої хвороби, українських ліквідаторів та персоналу об’єкту “Укриття”, і результати, отримані за допомогою методу FISH міжнародною групою авторів при цитогенетичному обстеженні естонських ліквідаторів [4 - 8].

Матеріал і методика

Цитогенетичну верифікацію офіційних доз опромінення проводили у 180 ліквідаторів Чорнобильської аварії 1986 р. – 76-ти осіб з Державного реєстру України осіб, постраждалих від Чорнобильської катастрофи (ДРУ), 70 осіб - з реєстру Міністерства оборони України та 34 особи з діагнозом гостра променева хвороба (ГПХ). Згідно протоколу використання методу FISH у дозиметричному розділі проекту "Лейкемія", всі цитогенетичні дослідження проводили "всліпу", на зашифрованих препаратах. Значення офіційних доз опромінення одержали після закінчення цитогенетичного аналізу.

Для одержання препаратів метафазних хромосом цільну венозну гепаринизовану кров (2 мл) культивували за полумікрометодом (0,5 мл крові для однієї культури) без контролю клітинного циклу згідно із стандартним протоколом лабораторії цитогенетики НЦРМ [3].

Культуру лімфоцитів інкубували в живильному середовищі RPMI 1640 з L-глютаміном (Sigma, USA) без ембріональної телячої сироватки та антибіотиків, з фітогемагютиніном (PHA, Difco-P, USA), протягом 48 годин (останні 3 години - з колцемідом, Colcemid, Sigma, USA), при t 37,5°C. Після гіпотонічної обробки клітинного осаду 0.075 М розчином KCl проводили трьохкратну обробку його фіксатором (абсолютним етанолом та ледяною оцтовою кислотою у співвідношенні 3:1). Фіксовані клітинні осади зберігали у морозильній камері при -20 ° С декілька місяців, до моменту приготування препаратів метафазних хромосом.

Препарати для FISH аналізу готували ~ за 7 суток до проведення флуоресцентної *in situ* гібридизації. Для гібридизації використовували набір безпосередньо мічених флуорохромом "Spectrum orange" ДНК-зондів до цілих хромосом # 1, 2 и 4 (Vysis, USA), які становлять ~22 % диплоїдного генома та дозволяють виявляти ~35 % всіх транслокацій. Обробку препаратів проводили, згідно протоколу фірми Vysis(США), успішно адаптованому для роботи в умовах України, який включає наступні стадії: специфічну предобробку препаратів, гібридизацію (24 години при температурі 37°C), промивку, контрфарбування хромосом флуоресцентним барвником DAPI-1 (4,6-діамідіно-2-феніліндол) в спеціальному розчині, який запобігає швидкому вицвітання препарату при мікроскопуванні в УФ-світлі.

Препарати аналізували під люмінесцентним мікроскопом Axioscope (Germany), який мав люмінісцентну 100-ваттну лампу (USHIO, Japan) та набір спеціальних фільтрів (DAPI/ORANGE dual pass filter set, Zeiss, Germany), що дають змогу окремо та одночасно візуалізувати обидва флуорохроми, завдяки чому хромосоми-мішені, фарбовані Spectrum orange (painted), та контрфарбовані DAPI хромосоми (unpainted), мають різний колір (рожево-оранжевий та голубий, відповідно), який залежить від використаного фільтра. Панцентромірні зонди не вживали, оскільки при використанні флуорохрому DAPI структура хромосом та положення центроміри виявляються досить чітко.

Обміни частинами між "painted" та "unpainted" хромосомами призводили до виникнення двокольорових структур, які містили одну або декілька центромір - повних (реципрокних, сбалансованих, two-way) та неповних (one-way) транслокацій, інверсій, інсерцій, поліцентриків, складних обмінів (complex exchanges), які вважали маркерами радіаційного впливу. Двокольорові безцентромірні структури приймали за ацентрики.

Ідентифікацію та облік хромосомних аберацій проводили згідно з PAINT номенклатурою [9].

Від кожного обстеженого, як правило, аналізували ~1000 метафаз (по 500 метафаз кожним з цитогенетиків). Всього проаналізували 92059 метафаз, що еквівалентно 32221 клітинам. Загальну частоту транслокацій на геном розраховували за формулою J. Lucas [10]:

$$F_g = F_p / 2.05 f_p (1 - f_p), \text{ де}$$

F_g - частота транслокацій на геном;

F_p - виявлена частота транслокацій з участю "painted" хромосом;

f_p - доля генома, яку складають хромосоми-мішені (для використаного нами хромосомного коктейля - 22 %).

Для реконструкції поглинутої дози опромінення використовували частоту тільки реципрокних транслокацій, які вважали за одну подію. Враховуючи сценарій радіаційної дії на обстежену групу ліквідаторів, розрахунок дози радіації проводили за алгоритмом, розробленим J. Lucas для хронічного рівномірного гамма-опромінення Cs¹³⁷ [11].

Результати та обговорення

Результати флуоресцентного цитогенетичного аналізу, згідно з якими було реконструйовано біологічні дози опромінення, показали що у 76-ти ліквідаторів з Державного реєстру індивідуальні офіційні дози опромінення коливались від 8 до 180 сГр, середньогрупова доза складала 64 сГр. Біологічні дози варіювали від 27 до 133 сГр, тобто за результатами FISH аналізу майже всю групу цивільних ліквідаторів можна вважати за "високодозну" із середньогруповою дозою 46 сГр. У 28-ти випадках індивідуальні офіційні та біологічні дози опромінення практично не відрізнялись; у 34-х випадках офіційні дози були вище за біологічні; у 14-ти офіційні дози були дещо нижче за FISH-дози.

Аналогічні данні (тільки при значно більш високих дозових навантаженнях) були виявлені в групі осіб з діагнозом ГПХ. Так, індивідуальні офіційні та біологічні дози опромінення коливались від 600 до 5500 та від 210 до 4040 мГр, відповідно,

завдяки чому аналогічні середньогрупові показники склали 2410 і 1460 мГр. У цій групі також переважали випадки з більш високими (у порівнянні з FISH дозиметрією) значеннями офіційних доз опромінення, які були виявлені у 24-х з 34-х обстежених. Тільки у 2-х осіб офіційні дози опромінення були нижче за біологічні дози, у 8-ми осіб біологічні та офіційні дози практично не відрізнялись.

У групі ліквідаторів з реєстру Міністерства оборони індивідуальні офіційні дози опромінення коливались від 250 до 600 мГр, біологічні - від 160 до 630 мГр. Тільки у 8-ми випадках офіційні дози були дещо вище за біологічні. У 32-х ліквідаторів FISH-дози перевищували офіційні дози. У 30-ти осіб офіційні дози відповідали біологічним. За результатами FISH аналізу групу військових ліквідаторів також можна віднести до “високодозної” із середньогруповою біологічною дозою 390 мГр, що дещо перевищувало середню офіційну дозу (330 мГр).

Таким чином, за результатами роботи встановлено, що у цивільних ліквідаторів з ДРУ та осіб з діагнозом ГПХ домінували випадки з перевищенням індивідуальних офіційних доз опромінення над FISH-дозами, завдяки чому середньогрупова FISH доза була нижча за офіційну. В той же час, у осіб з реєстру Міністерства оборони переважали випадки з деякою недооцінкою індивідуальних офіційних доз в порівнянні з біологічними дозами опромінення, тому середньогрупова FISH доза була вища за офіційну. За середньогруповими значеннями біологічних доз опромінення можна вважати, що обидві групи, які можна віднести до “високодозних”, одержали майже ідентичне радіаційне навантаження (460 та 380 мГр, відповідно).

Висновки. За допомогою методу FISH проведено реконструкцію та верифікацію групових та індивідуальних доз опромінення у 180 осіб - цивільних та військових ліквідаторів Чорнобильської аварії а також осіб з діагнозом ГПХ. Результати молекулярно-цитогенетичного аналізу дозволили віднести майже всіх обстежених до т.з. “високодозної” групи з радіаційним навантаженням, що перевищувало дозволене для аварійної ситуації (250 мГр).

Література

1. *Pilinskaya M. A., Dibskiy S. S.* FISH versus EPR dosimetry in 49 Chernobyl liquidators. Доповіді НАН України.- 2001.- N 2.- С. 185-189.
2. *Пилинская М.А., Дыбский С.С.* Частота стабильных хромосомных aberrаций, установленная с помощью метода FISH у 49 ликвидаторов Чернобыльской аварии с различными дозами облучения // Цитология и генетика, 2002.- том 35 .- № 4 , С. 50 - 54.
3. *Пилинская М.А., Дыбский С.С., Скалецкий Ю.Н и др.* Опыт использования метода FISH для реконструкции индивидуальных доз облучения у ликвидаторов Чернобыльской аварии в рамках Украинско-Американского проекта «Лейкемия». Цитология і генетика. – 2006.- том 40, N 3.- С.34-39.
4. *Пилинская М.А., Дыбский С.С., Халявка И.Г.* Использование метода FISH для обследования лиц, перенесших острую лучевую болезнь в связи с аварией на Чернобыльской АЭС // Цитология и генетика.- 1998.- том 32, № 1.- С. 22-31.
5. *Pilinskaya M.A. , Dybskiy S.S.* On the frequency of chromosome exchanges in some highly irradiated groups of Chernobyl accident victims measured by conventional chromosome analysis and whole chromosome painting // Доповіді НАН України.- 1999.- № 7.- С. 169-173.
6. *Пилинская М.А., Дыбский С.С.* Частота хромосомных обменов в критических группах жертв Чернобыльской аварии по данным традиционного цитогенетического анализа и метода FISH. Международный журнал радиационной медицины.- 2000. - № 1 (5).- С. 83-95.
7. *Littlefield L.G., McFee A. F., Salomaa S. I. et al.* Do recorded doses overestimate true doses received by Chernobyl cleanup workers? Result of cytogenetic analyses of Estonian workers by fluorescence in situ hybridization // Radiation Reserch., 1998.- vol.150.- P.237-249.

8. *Tucker J.D., Morgan W.F., Awa A.A. et al.* A proposed system for scoring structural aberrations detecting by chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995.-vol. 68.- P. 211-221,
9. *Lucas J.N., Awa A., Straume. T. et al.* Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation.// *Int. J. Radiat. Biol.*- 1992.- vol. 62, N 1.P. 53-63.
10. *Lucas J., Hill F., Burk C. et al.* Dose-response curve for chromosome translocations induced by low-dose rate 137-Cs gamma rays // *Rad. Prot. Dosimetry.*- 1995.- vol.68.- P.761-765.

Резюме

За допомогою методу FISH проведено верифікацію офіційних доз опромінення у 180-ти ліквідаторів Чорнобильської аварії. Встановлено, що середньогрупові біологічні дози опромінення у цивільних ліквідаторів та реконвалесцентів гострої променевої хвороби були дещо нижчими за офіційні внаслідок домінування випадків переоцінки індивідуальних офіційних доз. У військових ліквідаторів встановлена протилежна тенденція.

С помощью метода FISH проведена цитогенетическая верификация официальных доз облучения у 180-ти ликвидаторов Чернобыльской аварии. Показано, что среднegrupповые биологические дозы облучения у гражданских ликвидаторов и реконвалесцентоv острой лучевой болезни были несколько ниже официальных из-за преобладания случаев переоценки индивидуальных официальных доз. У военных ликвидаторов установлена противоположная тенденция.

With the help of FISH technique cytogenetical verification of the Official Dose Records (ODR) in 180 liquidators of Chernobyl accident had been fulfilled. In the civil liquidators and patients recovered from acute radiation sickness the cases with overestimated individual ODR had been predominated as well as in the liquidators from Military Register the cases with underestimation of ODR in comparison with biological radiation doses had been prevailed.

ЗАГАНЯЧ Я.Ю., ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В.

ДУ «Інститут спадкової патології АМН України»

Україна, 79000, м. Львів, вул.М.Лисенка, 31а, e-mail:root@ihp.lviv.ua

ІМУНОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РАННІХ РЕПРОДУКТИВНИХ ВТРАТ У ЖІНОК ІЗ СХИЛЬНІСТЮ ДО УРОГЕНІТАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ

Причини репродуктивних втрат у людини – різноманітні і до кінця не з'ясовані, серед яких найбільш загадковою є «поведінка» імунітету. Більше того, цілий ряд авторів взагалі вважають, що втрата плоду, особливо на ранніх термінах вагітності, має переважно імунну етіологію [1- 5].

Останнім часом при вивченні причин невиношування вагітності особливу увагу дослідників привертає наявність в організмі інфекцій, що передаються статевим шляхом, так звані інфекції TORCH-комплексу. Особливістю такого роду інфекцій є те, що в більшості випадків вони протікають безсимптомно, для них характерний рецидивуючий перебіг хвороби та відсутність стійкого імунітету, а тривала персистенція їх в організмі веде до розвитку вторинних імунодефіцитів та аутоімунних порушень[6-10].

З іншого боку, у багатьох публікаціях [2,5,8,9] передбачається, що активізація персистентних інфекцій у вагітних обумовлена посиленням загальної та локальної супресивної активності, направленої на становлення та підтримку імунної

толерантності материнського організму по відношенню до плода. Одним з найважливіших регуляторних цитокинів, який в значній мірі визначає напрямок імунної відповіді, і під час вагітності зокрема, є інтерлейкін-10 (ІЛ-10), під його впливом пригнічується клітинний імунітет, який регулюється Т-хелперами 1-го типу і стимулюється гуморальна відповідь з участю Т-хелперів 2-го типу, що власне і є необхідною умовою нормального протікання вагітності [5,10]. Зокрема, промоторна ділянка гена ІЛ-10 (пІЛ-10) містить ряд крапкових нуклеотидних варіацій, які відповідають за високу/низьку експресію ІЛ-10, ці ж SNP (single nucleotide polymorphism) формують алелі схильності до ряду захворювань, і особливо аутоімунних. Найбільш дослідженими є SNP -1082 G →A, -819 T→C та -592 A→C [11].

Отже, виходячи з вище сказаного, метою роботи було вивчення стану клітинного імунітету, особливостей розподілу поліморфних варіантів SNP -1082 G →A промоторної ділянки гена ІЛ-10 у жінок з навиковим невиношуванням вагітності на ранніх термінах під кутом зору сприйнятливості їх до уrogenітальних інфекцій.

Матеріал і методи

Всього обстежено 289 жінок з навиковим невиношуванням вагітності (ННВ) при 2-х і більше самовільних викиднях у I триместрі вагітності в анамнезі. На час обстеження жінки не були вагітними. Діагностика уrogenітальних інфекцій TORCH – комплексу проводилася при використанні методу ПЛР – полімеразної ланцюгової реакції (метод генодіагностики) за допомогою наборів ф-ми «ИнтерЛабСервис», Москва, РФ. Для досліджень використовували епітеліальні клітини, отримані за допомогою зішкрібу вагінальними щіточками із цервікального каналу. Імунофенотипування лімфоцитів периферійної крові проводили за допомогою моноклональних антитіл (в-во І-ту імунології АМН, Москва, РФ) непрямым імунофлюоресцентним методом забарвлення клітин в моношарі. Імунологічно обстежено 44 жінки із репродуктивними втратами у I -му триместрі вагітності. Контролем слугували жінки із здоровими дітьми (33 жінки). Досліджувану промоторну ділянку гена ІЛ-10, що містить SNP 1082-G→A ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) згідно методу, описаного Giordani L. at al. [12] з використанням реактивів “МВІ Fermentas”. Детекцію SNP – 1082 G→A проводили методом ПДРФ з використанням ендонуклеази рестрикції Eam1401 (“МВІ Fermentas”) згідно інструкцій фірми-виробника. Фрагменти ПЛР- продукту, отримані методом ПДРФ, розділяли у агарозному гелі (3%, 0,5 мг бромистого етидію). Всього обстежено 100 осіб. Контроль склав 73 особи без обтяженого анамнезу. Отримані дані піддавались обробці методами варіаційної статистики: визначали критерій Пірсона χ^2 [13].

Результати та обговорення

Проводили ДНК – діагностику наступних уrogenітальних інфекцій: Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealiticum, Mycoplasma hominis, HSV-2 (генітального герпесу), CMV (цитомегаловірусу), Toxoplasma gondii. Найчастіше при ННВ діагностувалася Ureaplasma urealiticum, її частота складала 56,4%, Mycoplasma hominis зустрічалася із частотою 18,6%, Chlamydia trachomatis – 11,3%. Рідше зустрічалися вірусні ураження, зокрема частота CMV складала 11%, а HSV-2 – 7,3%. Toxoplasma gondii діагностована у 3,4% обстежених жінок.

Підсумовуючи цей розділ роботи, слід зазначити, що частота інфікування інфекціями TORCH – комплексу є значною і назагал сягає 58% в групі жінок із ННВ, по структурі вона не відрізняється від групи жінок із первинним непліддям і вірогідно відрізняється у порівнянні із групою жінок із завмиранням вагітності в сенсі суттєво вищої частоти вірусних уражень цитомегаловірусною та герпетичною інфекціями.

Очевидним, на нашу думку, є те, що реакції-відповіді на інфекції є різними у різних жінок, враховуючи генетичну і, відповідно, імунну індивідуальність кожного організму. Тобто, більш повне розуміння унікальності кожного організму-господаря

приведе до розробки більш точних індивідуальних програм лікування та підвищить якість протидії хворобам жіночого статевого тракту, і як наслідок, дозволить запобігти репродуктивним втратам. Відповідно, наступним етапом даної роботи було вивчити стан клітинного імунітету у жінок з ННВ під кутом зору інфікування їх урогенітальними інфекціями. В дослідженнях використовувалися наступні моноклональні антитіла: CD3, CD4, CD8, DR, CD19, CD20, CD16, за допомогою котрих визначали субпопуляції лімфоцитів.

Отримані результати засвідчили, що при навиковому невиношуванні вагітності імунофенотипічний профіль вказує на занижений рівень В-клітинних маркерів. Зокрема, виявлено достовірно нижчий рівень експресії CD20-рецепторів. Такі зміни можуть свідчити про порушення механізмів продукції антитіл. Привертає увагу, також, занижений Т-хелперів/індукторів (CD4) при нормальній експресії Т-супресорів/цитотоксичних (CD8). Вказані імунорегуляторні Т-лімфоцити є важливою ланкою клітинного імунітету. Так, Т-хелпери/індуктори є допоміжними клітинами для В-лімфоцитів. Вони є головними індукторами в імунних реакціях, допомагають В-лімфоцитам у взаємодіях з Т-клітинозалежними антигенами.

Таким чином, в патогенезі ННВ не останню роль відіграють імунні механізми. Інфекційні агенти, на нашу думку, лише посилюють цей розбалансований імунорегуляторний процес. Підтвердженням висунутих припущень можуть бути результати інших дослідників [5], які в групі жінок з навиковим невиношуванням вагітності нез'ясованого генезу рекомендують проводити імунотерапію.

Одним з найважливіших регуляторних цитокінів, який в значній мірі визначає напрямок імунної відповіді є інтерлейкін-10, а його експресія великою мірою обумовлюється генотипом «високої», «помірної», чи «низької» експресії ІЛ-10. Відповідно, наступним етапом роботи було вивчення розподілу та частоти алелей низької (А) та високої (G) експресії гена ІЛ-10 та генотипів, які вони формують (AA-генотип «низької» експресії, GG-генотип «високої» експресії та AG-генотип «помірної» експресії в групі жінок з ННВ.

Отримані результати засвідчили, що співвідношення частот А- та G- алелей (всього обстежено 100 жінок, або 200 алелей) становило 82 : 118 (в абсолютних значеннях), або 41% до 59% алелей. Таким чином, обстежувана група жінок з ННВ характеризується підвищеною частотою алелі G (59%) SNP -1082 G→A, тобто алелі високої експресії гена ІЛ-10 в порівнянні з алеллю А (41%) – низька експресія гена ІЛ-10. Далі було проведено аналіз розподілу та частот генотипів SNP – 1082 G→A пІЛ-10, в результаті якого показано, що в обстежених осіб з групи подружніх пар з ННВ з найвищою частотою (46%) зустрічається генотип високої експресії гена ІЛ-10, а саме GG-генотип. Генотип низької експресії гена ІЛ-10, тобто AA-генотип, зустрічається з частотою 28%, а частота генотипу помірної експресії (AG-генотип) становить 25%. В той час, як в контрольній групі найвищою частотою характеризується генотип помірної експресії (AG-генотип), а найнижчою – генотип високої експресії (GG-генотип). Статистичне опрацювання отриманих результатів з використанням критерію Пірсона χ^2 показало вірогідно значиме зростання частоти GG-генотипу ($\chi^2=12$, $p<0,01$), який асоціюється з високою експресією гена ІЛ-10 в групі жінок з ННВ та вірогідно значиме зменшення генотипу помірної експресії AG-генотипу ($\chi^2=10,9$, $p<0,01$). Наші дані принципово співпадають з результатами Daher із співавт. [14], які передбачають, що саме ІЛ-10 може бути задіяний в патогенезі навикового невиношування вагітності.

Отже, отримані результати дають підстави думати, що генотип високої експресії ІЛ-10 є негативним прогностичним маркером для нормального протікання вагітності. Передбачаємо, що ІЛ-10 задіяний в патогенезі репродуктивних втрат на ранніх термінах вагітності через генетично детермінований регуляторний вплив на порушення імунного статусу у жінки. Припускається, що імунні порушення у жінок є

первинними і такими, що сприяють їх ураженню уrogenітальними інфекціями, і як результат, навиковому невиношуванню вагітності.

Висновки.

1. Генодіагностика уrogenітальних інфекцій у групі жінок із навиковим невиношуванням вагітності показала 58-відсоткове інфікування інфекціями TORCH – комплексу.

2. В групі жінок з навиковим невиношуванням вагітності порушений механізм продукції антитіл із залученням імунорегуляторних Т-лімфоцитів.

3. В групі жінок з навиковим невиношуванням вагітності достовірно найвищою частотою володіє генотип високої експресії (GG-генотип) інтерлейкіну-10.

4. Передбачаємо, що первинні генетично обумовлені особливості імунного статусу жінок сприяють їх інфікуванню, і як результат, навиковому невиношуванню вагітності.

Література

1. *Старостина Т.А., Демидова Е.М., Анкирская А.С. и др.* Современные вопросы патогенеза и терапии невынашивания беременности // Акуш. и гинекол. – 2002. – №5. – С.61–63.
2. *Chou S.W.* Cytomegalovirus and its clinical implication // *Traspl. Infect. Dis.* – 2001. – vol.5, No. – P.20–24.
3. *Emmer P.M., Nelen W., Steegers E. Et al.* Peripheral natural killer cytotoxicity CD56posCD16pos cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion // *Hum. Reprod.* – 2000. – vol.15, P.1163–1169.
4. *Ntrivalas E.I., Kwak–Kim J.Y.H., Gilman–Sachs A. Et al.* Status of peripheral blood natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortions and infertility of unknown aetiology // *Hum. Reprod.* – 2001. – vol.16. – P.855–861.
5. *Дранник Г.Н.* Клиническая иммунология и аллергология. – Москва. – 2003. – 604 с.
6. *Сидорова И.С., Макаров И.О., Воеводин С.М.* Диагностика и лечение внутриутробной инфекции в различные периоды беременности // Акуш. и гин. – 2004. – №2. – С.40–45.
7. *Маричев І.Л.* TORCH-інфекції: сучасні аспекти діагностики // Лаб. Діагн. – 2003. – №4. – С.43–46.
8. *Гаспаров А.С., Летучих А.А., Хилькевич Е.Г., Флоров Б.С.* Современные методы диагностики и лечения уrogenітального хламидиоза // Акуш. и гин. – 2003. – №3. – С.59–60.
9. *Bodeus M., M. Van Rans, Bernard P. et al.* Anticytomegalovirus IgG avidity in pregnancy: a 2-year prospective study // *Fetal Diagn. Ther.* – 2002. – Vol.17, N6. – P.362–366.
10. *Mocellin S., Panelli M.C., Wang E., Nagorsen D., Marincola F.M.* The dual role of IL-10 // *Trends Immunol.* – 2003. – vol.24, №1. – P.36–43.
11. *Brenner S., Prosch S., Schenke–Layland K., Riese U., Gausmann U., Platzer C.* cAMP-induced interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation // *J.Biol.Chem.* – 2003. – vol.278, №8. – P.–5597–5604.
12. *Giordani L., Bruzzi P., Lasalandra C., Quaranta M., Schittulli F., Ragione F. D., Iolascon A.* Association of breast cancer and polymorphisms of Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor- α genes // *Clin. Chem.* – 2003. – vol.49. – P. 1664–1667.
13. *Певницкий Л.А.* Статистическая оценка ассоциаций HLA-антигенов с заболеваниями // Вестник АМН СССР. – 1988. – №7. – С.48–51.
14. *Daher S., Shulzhenko N., Morgun A., Mattar R., Rampim GF., Camano L., DeLima M.G.* Assotiations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss // *J.Reprod. Immunol.* – 2003 – vol.58, No 1. – P.69–77.

Резюме

Вивчали стан клітинного імунітету, крапкові нуклеотидні поліморфізми промоторної ділянки гена ІЛ-10 у жінок з навиковим невиношуванням вагітності під

кутом зору сприйнятливості їх до уrogenітальних інфекцій. Встановлено, що дана група характеризується достовірно підвищеною частотою алелі G – алелі високої експресії та генотипу високої експресії ІЛ–10 (GG–генотип) та порушенням механізму продукції антитіл із залученням імунорегуляторних Т–лімфоцитів. Припускається, що імунні порушення у жінок є первинними і такими, що сприяють їх ураженню уrogenітальними інфекціями, і як результат, навиковому невиношуванню вагітності.

Изучали состояние клеточного иммунитета, точечные нуклеотидные полиморфизмы промоторного участка гена ИЛ–10 в группе женщин с привычным невынашиванием беременности с точки зрения восприимчивости их к уrogenитальным инфекциям. Установлено, что данная группа характеризуется достоверно повышенной частотой аллеля G – аллеля высокой экспрессии ИЛ–10 и генотипа высокой экспрессии (GG–генотип) и нарушением механизма продукции антител при вовлечении иммунорегуляторных Т-лимфоцитов. Допускаем, что иммунные нарушения у женщин – первичные и такие, что способствуют инфицированию уrogenитальными инфекциями, и как результат, привычному невынашиванию беременности.

Studied the condition of the cellular immunity and the SNP1082 G→A of the gene IL–10 promotor region in women with recurrent miscarriage with a view of their sensitivity to the urogenitalic infections. As a result of studying was determined statistically significant increase of both IL–10 high expression allele frequency (G–allele) and IL–10 high expression genotype frequency (GG–genotype). Studied the condition of the cellular immunity in women with recurrent miscarriage with a view of their sensitivity to the urogenitalic infections. It is established that women with recurrent miscarriage have the infringement of the antibody production mechanism. It is supposed, that immunological disfunction in women are prioritive and such that help their perception by urogenitalic infections and as a result this urogenitalic infections is the recurrent miscarriage.

КРАСНОВ М.С., *СМУТОВА В.А., **МАРГАСЮК Д.В., **БЕРЕЗИН Б.Б., **БИТКО С.А., ЯМСКОВА В.П., **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

**Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет, Россия, 119991, Москва, Воробьевы горы, 1*

***Учреждение российской академии наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, 28*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ В СВЕРХМАЛОЙ ДОЗЕ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СЕМЕННИКОВ КРЫС.

Бесплодие у мужчин возникает в результате разнообразных патологических процессов в организме, оказывающих отрицательное воздействие на внутренние органы, эндокринные железы, центральную нервную систему, приводя к дистрофическим изменениям в семенных канальцах и ткани яичка, способствуя при этом ухудшению оплодотворяющей способности сперматозоидов. Поэтому поиск и разработка новых препаратов для стимуляции и поддержания сперматогенеза является актуальным вопросом современной медицины. Ранее в различных тканях позвоночных нами была обнаружена группа биорегуляторов, действующих в сверхмалых дозах (СМД) [Borisenko et al., 2007; Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Nazarova et al., 2007; Yamskova et al., 2007a,b]. Данные биорегуляторы обладали способностью поддерживать и восстанавливать ткани после повреждения, стимулировать клеточную

пролиферацию, адгезию, миграцию. На основе некоторых биорегуляторов в настоящее время разработаны лекарственные препараты, обладающие профилактическим и лечебным эффектом [Ямсков, Ямскова, 1998]. Биорегуляторы данной группы обладают тканеспецифическим действием, но не обладают видоспецифическим действием [Ямскова и др., 1977; Borisenko et al., 2007; Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Nazarova et al., 2007; Yamskova et al., 2007a]. В настоящей работе была произведена попытка идентифицировать биорегулятор данной группы в тканях семенников крыс и изучить его протекторное действие в отношении данной ткани.

Материалы и методы

Биорегулятор был выделен из тканей семенников половозрелых крыс по разработанной методике. Ткани экстрагировали в растворе, содержащем 1мМ CaCl₂, 0,15М NaCl, 1мМ HEPES, при 4-6 °С в течение 2,5-3,0 ч. Высаливание тканевых экстрактов осуществляли, прибавляя при перемешивании сухой серноокислый аммоний до образования насыщенного раствора соли. После центрифугирования (3000 g, 10 мин) собирали фракцию надосадочной жидкости – супернатант, которую длительно диализовали до полного удаления серноокислого аммония, осуществляя многократную смену воды. Жидкостную ионнообменную хроматографию проводили на препаративной колонке (2,0 см x 30 см), используя ДЭАЭ-52-целлюлозу (“Serva”, Германия). Сорбент уравнивали 0,2М калий-фосфатным буфером (КФБ) pH 4,0. Элюцию проводили ступенчато: 0,2М КФБ pH 4,0 – 80 мин.; 0,2М КФБ pH 8,0 + 1М NaCl 120-150 мин., со скоростью 30 мл/час. Детекцию фракций белков проводили спектрофотометрически при 280 нм (“Gilson”, Франция). Для обращенно-фазовой ВЭЖХ применяли хроматограф Agilent 1100 Series (США), колонка Биохиммак С8-200 (4.6 мм x 150 мм), градиент вода (0,1% ТФА)–ацетонитрил, скорость элюции 0.5мл/мин. Размер белковых частиц в растворах определяли методом лазерного динамического светорассеивания [Stepanek, 1993]. Для биотестирования фракций РБ использовали ранее разработанный адгезиометрический метод [Ямскова, Резникова, 1991].

Протекторное действие исследуемого биорегулятора в СМД (10⁻¹⁴ мг/мл) изучали на модели органного роллерного культивирования семенников мышей. Использовали роллер RM5 (Assistant, Германия) со скоростью вращения 35 об/мин. Семенники мыши целиком помещали во флаконы с культуральной средой 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотик/антимикотик (Sigma). В контрольные флаконы ничего не добавляли, а в опытные добавляли биорегулятор, выделенный из семенников крыс. Культивирование проводили при 37⁰ С в течение 4-х суток. Далее исследовали гистологию семенников и семенных канальцев с помощью световой микроскопии.

Результаты и обсуждение

По ранее разработанной схеме нами была выделена из тканей семенников крыс фракция супернатанта. Для идентификации в ее составе биорегулятора изучаемой группы был применен метод биотестирования, который показал наличие биорегулятора в данной фракции. Было обнаружено мембранотропное действие биорегулятора семенников в СМД, соответствующих концентрациям 10⁻⁶-10⁻¹⁵ мг/мл (Рис. 1).

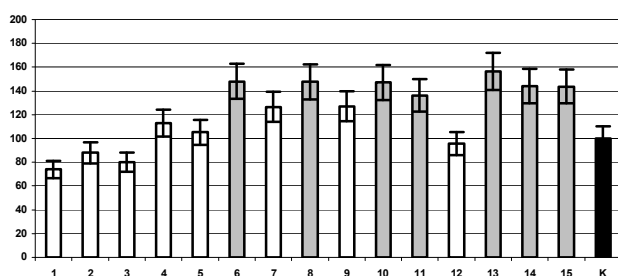


Рис. 1. Мембранотропное действие фракции супернатанта биорегулятора семенников крысы. По оси абсцисс: степень десятикратного разведения фракции (исходная концентрация 80 мкг/мл); по оси ординат - величина эффекта (%). Серые столбики – активные концентрации биорегулятора.

Далее исследовали некоторые физико-химические свойства белков, входящих в состав данной фракции: определяли вторичную структуру методом кругового дихроизма и способность к агрегации в водных растворах методом лазерного динамического светорассеивания. Было показано, что во вторичной структуре биорегулятора семенников преобладают β -структуры и статистический клубок. Такую же структуру имеют и другие биорегуляторы изучаемой группы, действующие в СМД. Ранее для всех биорегуляторов была показана способность образовывать в водных растворах крупные наноразмерные ассоциаты [Krasnov et al., 2007; Margasyuk et al., 2007; Nazarova et al., 2007; Vorisenko et al., 2007; Yamskova et al., 2007a]. Для биорегулятора семенников также была обнаружена такая способность. Было показано, что в водных растворах молекулы биорегулятора образуют частицы размером около 90 нм. По совокупности физико-химических свойств и мембранотропной активности исследуемый биорегулятор можно отнести к группе биорегуляторов, действующих в СМД. Далее была изучена специфическая активность биорегулятора семенников крысы на модели роллерного органного культивирования целых семенников мыши. Данная модель была нами разработана и применена впервые. В контрольных культурах, после 4-х дней культивирования наблюдали процессы деградации интерстиции семенных канальцев, разрушения внеклеточного матрикса и гематотестикулярного барьера, а также выраженную гибель клеток и сперматозоидов. В опыте наблюдали протекторное действие биорегулятора, которое выражалось в поддержании структуры канальцев, адгезионных взаимодействий между канальцами, предотвращении деградации интерстиции. Кроме того, поддерживалась жизнеспособность и дифференцировка клеток, включая сперматозоиды в семенных канальцах (Рис. 2).

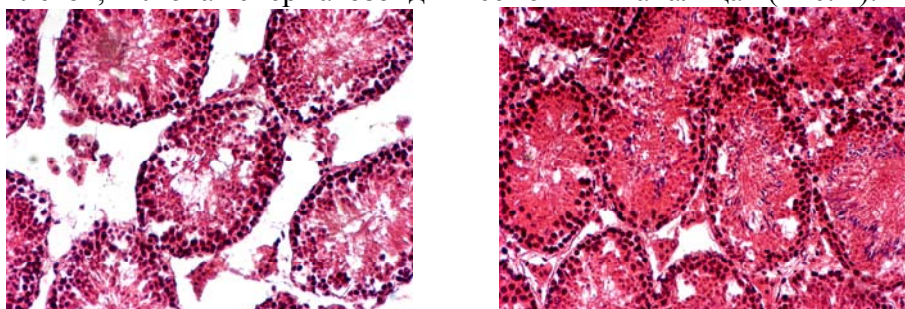


Рис. 2. Роллерное органное культивирование семенников мышей в течение 4-х суток *in vitro*. Слева – контроль, справа – опыт (добавление биорегулятора семенников). Ув. ок. $\times 10$; об. $\times 20$.

Полученные данные указывают на то, что данный биорегулятор может быть использован в качестве средства, способствующего поддержанию процессов сперматогенеза и предотвращению от деградации ткани семенников. В дальнейшем мы подтвердим данные, полученные нами в экспериментах *in vitro*, экспериментами *in vivo*. Также для получения более очищенной фракции биорегулятора нами были использованы методы хроматографии. Сначала, фракцию супернатанта разделяли методами ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе, в результате чего получили 4 фракции (Рис. 3).

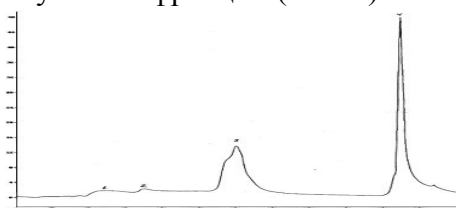


Рис. 3. Жидкостная ионообменная хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе. Фракционирование супернатанта семенников крыс (1 пик – основная фракция белков; 4 пик – кислая фракция белков). По оси абсцисс – время элюции, мин; по оси ординат – D_{280} .

В дальнейшей работе исследовали кислую фракцию, которая элюировалась с колонки последней. Выбрали данную фракцию в связи с тем, что ранее было показано для

биорегуляторов других тканей, что именно кислые фракции обладали наибольшим эффектом биологического действия. Кислую фракцию разделяли далее методом обращено-фазовой ВЭЖХ (Рис. 4).

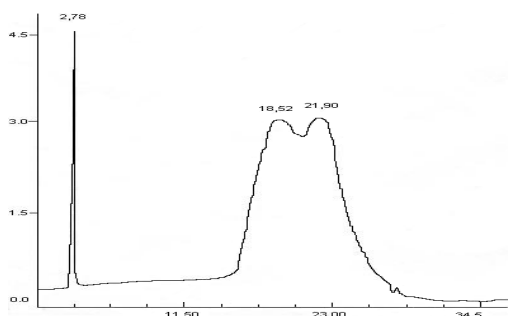


Рис. 4. Обращено-фазовая ВЭЖХ (вода-ацетонитрил) кислой фракции биорегулятора семенников крысы. По оси абсцисс – время элюции (мин). По оси ординат – детекция при длине волны 280 нм.

В результате получили гидрофильную (время удерживания 2,78 мин) и гидрофобные фракции (времена удерживания 18,52 и 21,90 мин). Сходную картину разделения мы получали и для биорегуляторов выделенных из других тканей. В связи с этим предполагается в дальнейшем использовать гидрофильную фракцию, наиболее гомогенную и обладающую более выраженным эффектом.

Выводы

Нами был идентифицирован в ткани семенников крыс биорегулятор, действующий в сверхмалых дозах. По совокупности физико-химических свойств и мембранотропного действия его можно отнести к группе биорегуляторов, действующих в СМД. Данный биорегулятор обладал протекторным действием в отношении тканей и клеток семенников мыши в процессе их переживания в условиях органного роллерного культивирования *in vitro*.

Литература

1. Ямскова В.П., Модянова Е.А., Резникова М.М., Маленков А.Г. Высокоактивные тканевоспецифические адгезионные факторы печени и легкого // Молекулярная биология. -1977. -т.11. N5. -С. 1147-1154.
2. Ямскова В.П., Резникова М.М. Низкомолекулярный полипептид сыворотки крови теплокровных: влияние на клеточную адгезию и пролиферацию // Журнал общей биологии. -1991. -т.52, N2, -С. 181-191.
3. Ямсков И.А., Ямскова В.П. Фармакологические препараты нового поколения на основе ранее неизвестных биорегуляторов-гликопротеинов клеточного микроокружения // Рос. хим. ж. (ЖРХО им. Д.И. Менделеева). -1998. -Т.42. N3. -С.85-90.
4. Borisenko A.V., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Vecherkin V.V., Yamskov I.A. “Regulatory proteins from the mammalian liver that display biological activity at ultra low doses” pp. 35-45 // In the book “[Biochemical Physics Frontal Research](#)”, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.
5. Krasnov M.S., Gurmizov E.P., Yamskova V.P., Yamskov I.A. “Analysis of a Regulatory Peptide from the Bovine Eye Lens: Physicochemical Properties and Effect on Cataract Development in vitro and in vivo” pp. 21-33 // In the book “[Biochemical Physics Frontal Research](#)”, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.
6. Margasyuk D.V., Krasnov M.S., Blagodatskikh I.V., Grigoryan E.N., Yamskova V.P., Yamskov I.A. “Regulatory Protein from Bovine Cornea: Localization and Biological Activity”, pp. 47-59 // In the book “[Biochemical Physics Frontal Research](#)”, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.
7. Nazarova P.A., Yamskova V.P., Krasnov M.S., Filatova A.G., Yamskov I.A. “Regulatory proteins biologically active in ultralow doses from mammalian glands and their

secretions” In: New Trends in Biochemical Physics Research, Editors: S.D. Varfolomeev et al., pp. 73-82, NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 128.

8. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V. and Yamskov I.A. “Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 1. Isolation, purification and physicochemical properties.”, pp. 61-70 // In the book “Biochemical Physics Frontal Research”, Ed. by Varfolomeev S.D., Burlakova E.B., Popov A.A. and Zaikov G.E., Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.

9. Yamskova V.P., Krasnov M.S., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Borisenko A.V., Yamskov I.A. “Analysis of regulatory proteins from bovine blood serum that display biological activity at ultra low doses: 2. Tissue localization and role in wound healing”, pp. 71-78 // In the book “[Biochemical Physics Frontal Research](#)”, Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov, Hauppauge NY, Nova Science Publishers Inc. -2007. -p. 127.

10. Stepanek P. Dynamic Light Scattering. The method and some applications // Ed. By Brown W. Oxford: Clarendon Press. 1993. P. 177

Резюме

В ткани семенников крыс был идентифицирован биорегулятор, действующий в сверхмалых дозах на поддержание структуры семенных канальцев и препятствие гибели клеток семенников в условиях переживающей органотипической культуры *in vitro*.

In a tissue of rats testis have been identified a bioregulator active in ultra low dozes on maintenance of structure of tubuli seminiferi and an obstacle of destruction of testis cells in conditions of experiencing organotypic culture *in vitro*.

ПЛІНСЬКА М.А., ДИБСЬКИЙ С.С., ДИБСЬКА О.Б., ПЕДАН Л.Р.

*Науковий Центр радіаційної медицини АМН України,
Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: pww@ukr.net*

РЕАЛІЗАЦІЯ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ У ВІДДАЛЕНІ СТРОКИ ПІСЛЯ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ

Оцінка прихованої хромосомної нестабільності є перспективним напрямком цитогенетичних досліджень, які впродовж останніх 10-ти років проводяться в різних цитогенетичних лабораторіях світу, переважно, для визначення ризику виникнення спонтанної чи індукованої онкопатології за гіперчутливістю хромосом лімфоцитів периферичної крові людини до кластогенної дії т. з. мутагенів-провокаторів, одним з яких є радіоміметик блеоміцин [1]. Встановлено, що індивідуальна чутливість хромосом соматичних клітин до тестуючої мутагенної дії блеоміцину *in vitro* не залежить від статі, віку людини та повсякденного навантаження мутагенними факторами довкілля і є генетично детермінованою, що обумовлено певними молекулярно-генетичними механізмами та доведено відповідними дослідженнями на близнюках [2 - 6].

Питання щодо модифікації генетично детермінованої міжіндивідуальної чутливості геному людини до дії мутагенів довкілля, включаючи іонізуюче випромінювання, досі залишається відкритим. Разом з тим, враховуючи актуальність цієї проблеми в зв'язку з медичними наслідками Чорнобильської аварії, метою нашого дослідження було саме визначення можливості реалізації прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини у віддалені строки після радіаційного впливу різної інтенсивності.

Для досягнення цієї мети нами було удосконалено модельну систему для дослідження прихованої хромосомної нестабільності в лімфоцитах периферичної крові людини за допомогою тестуючого мутагенного навантаження блеоміцином *in vitro* - «G₂ bleomycin sensitivity assay» [7]. Проведена робота дозволила розробити алгоритм для оцінки ступеню індивідуальної чутливості хромосом соматичних клітин людини до кластогенної дії блеоміцину.

Удосконалений нами тест “G₂ bleomycin sensitivity assay” було апробовано в культурах лімфоцитів периферичної крові, одержаних від осіб з групи порівняння із вихідною частотою хромосомних аберацій, що не перевищувала спонтанний рівень, і виявлено 30% індивідів, гіперчутливих до дії мутагена-провокатора [8]. Виходячи з анамнезу цих осіб (відсутність контакту із знаними чи потенційними мутагенами), одержані результати підтвердили дані інших авторів про те, що індивідуальна гіперчутливість до генотоксичного впливу, як і резистентність до нього, у інтактних індивідів обумовлюється генетичними факторами.

Матеріал та методи

Провели добровільне цитогенетичне обстеження 9-ти осіб з групи порівняння (умовно здорові донори, 3 жінки, 6 чоловіків у віці 18–64 роки), які заперечували свідомий контакт із знаними чи потенційними мутагенами, та 44-х осіб з радіаційним впливом різної інтенсивності в анамнезі. Серед опромінених осіб сформували наступні групи:

- реконвалесценти гострої променевої хвороби (ГПХ) (через ~20 років після Чорнобильської аварії на момент обстеження) – 19 осіб, всі чоловіки віком 41–73 роки, середній вік – 57 років;
- ліквідатори наслідків аварії на ЧАЕС (через ~ 19 років після Чорнобильської аварії на момент обстеження) – 10 осіб, всі чоловіки віком 40–73 роки, середній вік – 56 років;
- робітники, які працювали в 30-км зоні відчуження у 2006–2007 рр. – 12 осіб, всі чоловіки віком 24–58 років, середній вік – 41 рік.

У вищезазначених групах визначали фонові та індуковані блеоміцином частоти всього спектру хромосомних аберацій в культурі лімфоцитів периферичної крові. Умови культивування лімфоцитів і приготування препаратів метафазних хромосом, принципи проведення цитогенетичного аналізу та обліку хромосомних аберацій, особливості обробки культур блеоміцином відповідали таким, що були викладені в попередній публікації [8].

Фоновий цитогенетичний ефект в інтактних культурах, одержаних від обстежених осіб, використовували як критерій факту та інтенсивності опромінення за цитогенетичними індикаторами радіаційної дії (нестабільними та стабільними абераціями хромосомного типу) [9].

Визначення осіб, гіперчутливих до дії блеоміцину, проводили аналогічно виявленню індивідів з підвищеною чутливістю до дії іонізуючої радіації [9, 10] обчисленням коефіцієнту прихованої хромосомної нестабільності ($K_{ПХН}$) за спрощеною нами формулою :

$K_{ПХН} = M_{ПХН}/M$, де $M_{ПХН}$ – індивідуальні значення частоти аберацій хромосом при тестуючій дії блеоміцину в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл; M – середньогрупові значення частоти аберацій хромосом при тестуючій дії блеоміцину в концентраціях 0,05 та 5,00 мкг/мл. Прийняли, що для гіперчутливих осіб цитогенетичний ефект, індукований блеоміцином, перевищує середньогруповий рівень хромосомних аберацій і тому $K_{ПХН}$ в них завжди буде > 1 .

Результати та обговорення

За результатами фонового цитогенетичного обстеження найменш обтяженою з експонованих груп виявилася група осіб, яка працювала в 30-км зоні відчуження у 2006–2007 рр. (хронічний радіаційний вплив малої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення, суворий радіологічний контроль). Середньогрупова частота радіогенних

маркерів в цій групі ($0,07 \pm 0,03$ на 100 метафаз) не перевищувала такий в групі порівняння ($0,22 \pm 0,08$ на 100 метафаз). Далі йдуть групи ліквідаторів наслідків Чорнобильської аварії (продовжений радіаційний вплив середньої інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення у 1986–1987 рр.) та осіб, які перехворіли на ГПХ (гостра радіаційна дія значної інтенсивності; переважно зовнішнє опромінення у 1986 р.), в яких навіть у віддалені строки після опромінення спостерігали вірогідно ($p < 0,05$) підвищені частоти як залишкових (неелімінованих) нестабільних хромосомних маркерів радіаційної дії ($0,31 \pm 0,08$ та $0,41 \pm 0,08$ на 100 метафаз, відповідно), так і первинних радіаційно-індукованих стабільних хромосомних аберацій ($0,17 \pm 0,07$ та $0,48 \pm 0,09$ на 100 метафаз, відповідно).

Після дії блеоміцину в концентрації 0,05 мкг/мл середньогрупова частота аберацій хромосом в групі реконвалесцентів ГПХ складала $16,80 \pm 0,50$ на 100 метафаз, що достовірно ($p < 0,01$) відрізнялось від такої в інтактних культурах ($3,33 \pm 0,22$ на 100 метафаз). Додаток до фонові середньогрупові частоти хромосомних аберацій (надспонтанна частота) зріс до 13,47 на 100 метафаз, що перевищувало такий в групі порівняння (9,14 на 100 метафаз). При аналізі індивідуальних цитогенетичних параметрів встановили суттєву міжіндивідуальну варіабельність індукованої блеоміцином частоти хромосомних аберацій, яка, як правило, не залежала від величин фонових даних, одержаних в інтактних культурах. Так, розмах коливань частоти аберацій хромосом варіював в межах 8,7 - 38,2 на 100 метафаз. В 14-ти випадках цей показник вкладався в діапазон 8,3 – 15,5 на 100 метафаз і не перевищував середньогруповий рівень (16,8 на 100 метафаз). У 5-ти обстежених осіб частота аберацій хромосом складала 22,5; 35,7; 38,2; 30,0; 25,0 на 100 клітин при 1,50; 1,67; 2,20; 3,00; 4,00 в інтактних культурах. Таким чином, використання блеоміцину як мутагена-провокатора в концентрації 0,05 мкг/мл дозволило ідентифікувати 5 осіб з підвищеною чутливістю до тестуючої дії блеоміцину.

При дії блеоміцину в концентрації 5,0 мкг/мл в групі реконвалесцентів ГПХ зросли як індивідуальні частоти хромосомних аберацій, так і їх середньогруповий рівень (до $28,04 \pm 0,63$ на 100 метафаз). Надспонтанна (індукована) частота хромосомних аберацій також вірогідно підвищилась і по групі в середньому становила 24,71 на 100 метафаз. Реакція хромосомного апарату на дію мутагена-провокатора в концентрації 5,0 мкг/мл суттєво відрізнялась у різних осіб. Окрім трьох гіперчутливих індивідів, виявлених при навантаженні культури лімфоцитів блеоміцином в концентрації 0,05 мкг/мл, при використанні препарату в концентрації 5,00 мкг/мл було ідентифіковано ще 6 осіб із прихованою хромосомною нестабільністю. Частота хромосомних аберацій у цих індивідів становила 45,5; 53,0; 50,0; 33,5; 48,0; 36,5 на 100 клітин, тоді як у інших осіб з цієї ж групи вона коливалась від 6,6 до 16,5 на 100 метафаз і була нижче за середньогруповий рівень. Таким чином, з використанням двох тестуючих концентрацій блеоміцину в групі реконвалесцентів ГПХ виявлено 11 осіб (57,9 %), гіперчутливих до дії мутагена-провокатора ($K_{ПХН}$ в яких перевищували 1), що, виходячи з їх анамнезу, може бути обумовлено дією високих доз опромінення.

В групі ліквідаторів частота хромосомних аберацій на 100 метафаз коливалась від 2,34 до 34,00 при концентрації 0,05 мкг/мл та від 3,00 до 34,50 при концентрації 5,0 мкг/мл і в середньому становив $11,26 \pm 0,63$ та $15,10 \pm 0,79$, відповідно. Середньогруповий надспонтанний (індукований) рівень хромосомних аберацій складав 7,95 та 11,79 на 100 клітин, відповідно, що було навіть менш ніж в групі порівняння (9,14 та 14,31 на 100 клітин, відповідно). При концентрації блеоміцину 0,05 мкг/мл виявлено одну особу з підвищеною чутливістю до дії препарату, частота аберацій хромосом в якій була максимальною - 34,0 на 100 метафаз, тоді як у решти обстежених вона коливалась в межах 2,3 – 13,7 на 100 клітин. При дії блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл, окрім того ж індивіда, ідентифіковано ще дві гіперчутливі особи з рівнем хромосомних аберацій 20,00 та 19,33 на 100 клітин, відповідно при міжіндивідуальному розкиді у решти осіб 3,0 – 15,3 на 100 метафаз. Таким чином, всього серед ліквідаторів

виявлено 3 особи з прихованою хромосомною нестабільністю (30,0%), що не відрізняється від групи порівняння.

Працівники 30-км зони, як і особи з інших обстежених груп (експонованих та контрольної), суттєво відрізнялись за індивідуальною частотою хромосомних аберацій, індукованою обома тестуючими концентраціями блеоміцину. Так, міжіндивідуальний розкид цього показника становив 6,00 – 73,67 на 100 метафаз при концентрації 0,05 мкг/мл та 10,00 – 81,50 на 100 клітин при концентрації 5,0 мкг/мл. Середньо-групові рівні хромосомних аберацій складали $23,70 \pm 0,67$ та $34,04 \pm 0,80$ на 100 клітин; додатки до спонтанного рівня – 22,00 та 32,34 на 100 метафаз, відповідно (максимальні серед усіх обстежених груп). При концентрації блеоміцину 0,05 мкг/мл ідентифіковано 3 особи із прихованою хромосомною нестабільністю, частота хромосомних аберацій в яких складала $61,5 \pm 3,44$, $73,67 \pm 2,54$, $59,00 \pm 2,84$ на 100 метафаз. При дії блеоміцину в концентрації 5,00 мкг/мл, окрім вищезазначених осіб, виявили ще одного гіперчутливого індивіда; частота хромосомних аберацій в якого становила $40,33 \pm 2,83$ на 100 метафаз. Таким чином, при обох концентраціях блеоміцину у 33,3% обстежених спостерігали підвищену чутливість до тестуючої мутагенної дії, що не відрізняється від такої в групах порівняння та ліквідаторів. Разом з тим, саме в цій групі, особливо яскраво виявилася відсутність позитивної кореляції між фоновими та індукованими частотами хромосомних аберацій (наприклад, у випадку № 1 з нульовою фоновією частотою та максимальним індукованим цитогенетичним ефектом).

Висновки. Отримані результати підтвердили реальність радіаційно-індукованої модифікації генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження, яка залежить від інтенсивності та характеру опромінення.

Література

1. Spitz M. Mutagen sensitivity as a marker of cancer susceptibility. // *Cancer Detect. and Prevention*. – 2005. – Vol. 19, № 1. – P. 35.
2. Bleomycin test sensitivity in healthy children / S. Zajaczek, G. Krzanowska-Michalska, E. Pikula et al. / Abstracts of 4th Europ. Cytogenetics Conf., Bologna. – 2003. – P. 43.
3. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity / Jarno Tuimala, Gabor Szekely, Sharolta Gundy et al // *Mutagenesis* 2006. - V. 21, №4.- P:261-264.
4. Mutagen sensitivity has high heritability : Evidence from a twin study/Xifeng Wu; Spitz M. R.; Amos Ch. et al. // *Cancer Research*, 2006.- V.66, №12.- P.5993-5996.
5. Mutagen Sensitivity and Genetic Variants in Nucleotide Excision Repair Pathway: Genotype-Phenotype Correlation/ Jie Lin, Gary E. Swan, Peter G. Shields et al //, *Cancer Research* 2007.- V. 67, № 4.- P. 3493-3495.
6. Micronuclei frequency induced by bleomycin in human peripheral lymphocytes: Correlating BLHX polymorphism with mutagen sensitivity/ R. Maffei, F. Carbone, S. Angelini et al // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2008.- V. 639, Issues 1-2.- P. 20-26.
7. Цитогенетичний спосіб визначення прихованої хромосомної нестабільності в соматичних клітинах людини за допомогою тесту G₂- bleomycin sensitivity assay / М. А. Пілінська, С. С. Дибський, О. Б. Дибська, Л. Р. Педан: Методичні рекомендації.- К., 2008. – 23 с.
8. Пілінська М.А., Дибський С.С., Дибська О.Б., Педан Л.Р. Прихована хромосомна нестабільність, виявлена при тестуючій мутагенній дії блеоміцину *in vitro* в лімфоцитах периферичної крові контрольних донорів./ Доповіді Національної Академії Наук України, 2008.- № 8, с. 184-188.
9. Радиационная цитогенетика: Русско-английский словарь-справочник /Э.А. Дёмина, М.А. Пилинская, Ю.И. Петунин, Д.А. Ключин. – К.: Здоров'я, 2009. – 367 с.
10. Дьоміна Е.А., Дружина М.О., Рябченко Н.М. Індивідуальна радіочутливість людини / ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України. – К.: Логос, 2006. – 126 с.

Резюме

Для виявлення прихованої хромосомної нестабільності за допомогою тесту «G₂-bleomycin sensitivity assay» проведено добровільне цитогенетичне обстеження 53-х осіб з радіаційним впливом різної інтенсивності. Отримані дані підтвердили реальність модифікації генетично детермінованої чутливості хромосом соматичних клітин людини до тестуючого мутагенного навантаження внаслідок дії високих доз іонізуючого випромінювання.

Для выявления скрытой хромосомной нестабильности с помощью теста «G₂-bleomycin sensitivity assay» проведено добровольное цитогенетическое обследование 53-х лиц с радиационным воздействием разной интенсивности. Полученные данные подтвердили реальность модификации генетически обусловленной чувствительности хромосом соматических клеток человека к тестирующей мутагенной нагрузке вследствие действия высоких доз ионизирующего излучения.

For the revealing of hidden chromosome instability with the help of “G₂-bleomycin sensitivity assay” the voluntary observation of 53 persons with different intensity of radiation exposure had been fulfilled. The data received confirmed the reality of modification by high doses of ionizing radiation the inherited susceptibility of human somatic cells chromosomes to testing mutagenic exposure.

ПИЛИПЕНКО И.В.¹, ЧЕРДЫНЦЕВА Н.В.², КОБЗЕВ В.Ф.¹, ВОЕВОДА М.И.^{1,3}, РОМАЩЕНКО А.Г.¹

¹Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск,

²НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН, Томск,

³НИИ Терапии СО РАМН, Новосибирск,

Россия, 630090, Новосибирск, ул. пр. ак. Лаврентьева, 10, e-mail: myagkova_irina@rambler.ru

АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА P53 С ФОРМИРОВАНИЕМ И РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА ОПУХОЛИ

В последние годы наблюдается тенденция увеличения доли гормонозависимых опухолей органов репродуктивной системы у женщин со злокачественными новообразованиями. Это является следствием возрастания в популяции лиц с эндокринно-обменными нарушениями (ановуляция, гиперэстрогения, бесплодие, ожирение, сахарный диабет и т.д.). Кроме того, в патогенез гормонозависимых/независимых опухолей продолжают вносить существенный вклад генетические и внешние факторы (канцерогены). В результате в экономически развитых странах отмечено заметное превалирование рака молочной железы (РМЖ) над другими типами новообразований.

Молекулярные фенотипы эпителиальных клеток молочной железы различаются в норме концентрацией цитоплазматических и ядерных рецепторов женских гормонов, которые участвуют во многих клеточных процессах (экспрессии генов, дифференцировке и размножении клеток и т.д.). Малигнизированные эпителиальные клетки молочной железы, экспрессирующие рецепторы стероидных гормонов в существенном количестве, регулируются ими. Клетки опухолей, с низким содержанием этих рецепторов, перестают опознаваться циркулирующими гормонами как клетки-мишени, что приводит к утрате эндокринного контроля и нарастанию автономности. Количество рецепторов в клетках рака молочной железы может служить индикатором

гормоночувствительности и указывать на возможность регрессии опухоли в ответ на гормональное лечение.

В молекулярных механизмах возникновения трансформированной клетки значимую роль выполняют онкогены и гены опухолевой супрессии. Оценка вклада отдельных генов в формирование индивидуальной предрасположенности организма женщины к развитию РЖМ в настоящее время является сложной задачей. Один из способов состоит в установлении ассоциации между признаком (фенотипом) заболевания и генетическим маркером гена-кандидата. В настоящей работе в качестве гена-кандидата рассмотрен ген, кодирующий белок-супрессор опухолевого роста (*p53*), который участвует в регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и апоптозе [Ghosh *et al.*, 2004]. Используя данные литературы и компьютерных баз, нами были выбраны полиморфизмы из различных областей гена *p53*, потенциально способные влиять на разные этапы экспрессии. Четыре полиморфных маркера *p53*, расположены: в относительной близости от P1`-промотора, C→G; в интроне 3 на расстоянии 32 п.н. от сайта сплайсинга, дупликация 16 п.н. (-ACCTGGAGGGCTGGGG-); в экзоне 4, G→C (Arg72Pro в пролин-богатом домене белка); в 3`-фланкирующей области на расстоянии ~1500 п.н. от стоп кодона *p53*, C→T.

Материалы и методы

Неоднородность выборки пациентов РМЖ по клинико-гистологическим характеристикам опухолей предполагает необходимость группирования больных в соответствии с какой-либо особенностью патологического фенотипа. Исходя из общих сведений о клинических формах болезни и гистологических типах опухолей, размере и данных о гормональном статусе опухоли (НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН), была сформирована когорта пациентов с узловым инфильтрирующим внутримолочковым раком (УИВР) молочной железы размером 182 человека. Образцы ДНК получали из крови женщин, больных УИВР молочной железы г. Томска.

Образцы ДНК больных УИВР были разделены на подгруппы в зависимости от рецепторного статуса опухоли: рецептор-позитивные и рецептор-негативные. По рецепторам к эстрогену - «ER+» и «ER-», по рецепторам к прогестерону - «PR+» и «PR-».

Подгруппы больных УИВР по рецепторному статусу к каждому гормону сравнивались между собой по частотам аллелей и генотипов всех исследуемых полиморфизмов *p53*. В качестве контрольной выборки были взяты образцы ДНК европеоидных женщин г. Новосибирска, обследованных в ходе эпидемиологической программы ВОЗ "МОНИКА". Выделение геномной ДНК из крови осуществляли экстракцией фенолом/хлороформом по стандартной методике [Sambrook *et al.*, 1989].

Генотипирование образцов ДНК по всем полиморфизмам проводили с помощью ПЦР и ПДРФ-анализа. Сравнение частот аллелей и генотипов между выборками проводили по критерию χ^2 . Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

Оценка частот аллелей и генотипов по четырем полиморфизмам гена *p53* в подвыборках больных УИВР с опухолями, различающимися рецепторным статусом к стероидным гормонам, показала достоверное увеличение частоты гомозигот T/T по полиморфизму C→T в 3`-фланкирующей области *p53* до 25,6% в группе больных УИВР с «ER-» статусом по сравнению с 11,2% у пациентов с «ER+» статусом опухоли ($P_{\chi^2}=0,031$; $P_F=0,043$). Аналогичная картина обнаружена при сравнении подгрупп больных УИВР с «PR+» и «PR-» статусами опухоли. Отмечается достоверное увеличение частоты гомозигот T/T полиморфизма C→T в 3`-фланкирующей области гена *p53* в группе больных с «PR-» статусом (27,3%) по сравнению с выборкой пациентов с «PR+» статусом (8,3%) опухоли ($P_{\chi^2}=0,003$; $P_F=0,004$). Различий по частотам вариантов аллелей исследуемого полиморфизма между подгруппами

пациентов выявлено не было. По остальным трем полиморфизмам гена *p53*, в том числе по ОНП в экзоне 4, приводящему к несинонимичной замене аминокислоты в белке, достоверных отличий по частотам аллелей и генотипов между подвыборками больных УИВР молочной железы не обнаружено.

Ранее McGuire (1975 г.) показал, что чувствительность РМЖ к воздействию эстрогенов и антиэстрогенов коррелирует с количественным содержанием рецепторов в опухоли. Прогностическое значение эстроген-рецепторного статуса опухоли объясняется его корреляцией с факторами, определяющими благоприятный прогноз, такими как низкий пролиферативный индекс, гистологические особенности опухоли и т.д.

Полиморфизм $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* расположен на расстоянии около 1500 п.н. от стоп-кодона трансляции *p53*. Потенциально он может влиять на события посттранскрипционной модификации мРНК гена *p53*. Учитывая данные о низкой степени дифференцировки клеток опухолевой ткани и более злокачественном характере течения РМЖ у больных с низким содержанием рецепторов «ER» и/или «PR», можно предположить, что выявленное нами повышение частоты гомозигот *T/T* полиморфизма $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* в группах больных с «ER-» статусом и/или «PR-» статусом, свидетельствует об ассоциации данного генотипа с более злокачественным течением заболевания. Это указывает на сомнительность положительного эффекта при попытках эндокринной коррекции в ходе лечения онкологического заболевания. Женщины с генотипом *T/T* полиморфизма $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* потенциально могут составлять группу риска с более злокачественным течением РМЖ. Данные ассоциативного анализа указывают не только на гормонозависимую значимость 3'-фланкирующей области гена *p53* при формировании патологического фенотипа, но и на необходимость учета генотипа по данному полиморфизму при терапии больных гормональными препаратами.

Выводы

Таким образом, женщины с генотипом *T/T* полиморфизма $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* потенциально могут составлять группу риска с более злокачественным течением РМЖ. Данные ассоциативного анализа указывают не только на гормонозависимую значимость 3'-фланкирующей области гена *p53* при формировании патологического фенотипа, но и на необходимость учета генотипа по данному полиморфизму при терапии больных гормональными препаратами.

Литература

1. Ghosh A., Stewart D., Matlashewski G. Regulation of human *p53* activity and cell localization by alternative splicing // Mol. and Cell. Biology. - 2004. - P. 7987-7997.
2. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y.// Cold Spring Harbor Lab. Press. - 1989.

Резюме

Выявлено статистически достоверное увеличение частоты гомозигот *T/T* полиморфизма $C \rightarrow T$ в 3'-фланкирующей области гена *p53* в группе больных УИВР с «ER - » и/или «PR-» статусом опухоли по сравнению с выборкой пациентов с «ER+» и/или «PR+» статусом ($P_{\chi^2}=0,031$ и $0,003$ соответственно).

Statistically significant increasing in *T/T* homozygotes frequency for *C/T* polymorphism located in *p53* gene 3'-flanked region in two IDC patients groups with «ER - » and/or «PR-» tumor status compared to «ER+» and/or «PR+» status patients was detected ($P_{\chi^2}=0,031$ and $0,003$, respectively).

СТЕФАНОВИЧ Г.В., БАРИЛЯК І.Р., БУДЕРАЦЬКА Н.О.

ВПЛИВ ВІКУ ЖІНКИ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ООЦИТІВ ТА РАННІХ ЕМБРІОНІВ, ОТРИМАНИХ В ПРОГРАМАХ ЗАПЛІДНЕННЯ *IN VITRO*

Зниження жіночої фертильності з віком - явище суто фізіологічне. Воно починається приблизно з 35 років, а близько 50 років фертильність майже повністю втрачається. Зниження репродуктивного потенціалу призводить до зменшення ймовірності настання вагітності та збільшення частоти спонтанних абортів у жінок старшого віку. Причини та механізми зниження фертильності з віком досить інтенсивно вивчаються. Допоміжні репродуктивні технології відкрили нові можливості для дослідження цієї проблеми, оскільки весь процес - від отримання та запліднення ооцитів до розвитку доімплантаційних ембріонів - можна спостерігати поза організмом.

Існує припущення, що причиною зниження фертильності з віком може бути зменшення пулу оваріальних фолікулів, здатних до розвитку, а також зміни гормонального статусу жінок старшого віку [1]. Значна кількість дослідників вважає, що вік жінки – це один з факторів ризику виникнення анеуплоїдії ооцитів та ембріонів людини [2,3]. Так було встановлено, що між трисомією та віком жінки існує чітка залежність [4]. Часто вікове зниження фертильності пов'язують з погіршенням “якості” ооцитів [5]. Проте остаточно залежність між віком жінки та морфологічним та цитогенетичним статусом ооцитів доведена не була.

Метою даної роботи було дослідження впливу віку жінок, які проходять курс лікування безпліддя методом запліднення *in vitro*, на кількісні та морфофункціональні характеристики отриманих у них ооцитів та ранніх ембріонів.

Матеріал та методи.

Об'єктом дослідження були ооцити та ранні ембріони, отримані від 121 жінки, що проходили курс лікування безпліддя методом запліднення поза організмом в “Інституті генетики репродукції”, м. Київ. За віком жінки були поділені на 2 групи: 1-а група – пацієнтки віком до 30 років включно, 43 особи, та 2-а група – жінки віком більш, ніж 30 років, 78 осіб. Ооцити отримували шляхом трансвагінальної пункції та аспірації фолікулів під контролем ультрасонографії після гормональної стимуляції суперовуляції.

При отриманні ооцитів враховували кількість їх від кожної жінки, після чого ооцити піддавали прижиттєвій морфологічній оцінці. За морфологічними ознаками клітин кумулюсу, що оточують ооцит, та самого ооцита їх сукупність ділили на дозрілі, недозрілі та ооцити з ознаками атрезії. В подальшому для запліднення *in vitro* недозрілі та ооцити з ознаками атрезії не використовувались.

Через 17-20 годин після інсемінації *in vitro* проводили візуальний контроль запліднення. Ооцити, в яких виявлялись два пронуклеуси, вважали нормально заплідненими. В аномально запліднених ооцитах візуалізували 1, 3 або більше пронуклеусів. Ооцити, в яких пронуклеуси були відсутні, вважали такими, що не запліднились. Разом з аномально заплідненими ооцитами їх виключали з подальшого культивування.

При подальшому культивуванні нормально запліднених ооцитів, через 48-72 години після інсемінації, проводили морфологічну оцінку ранніх ембріонів, що дробились. При цьому враховували наступні ознаки: відповідність дроблення стадії розвитку, ступінь фрагментації, вакуолізації бластомерів, а також рівномірність дроблення. Ембріони оцінювали за чотирибальною системою, причому оцінці 1 відповідали ембріони найвищої якості за вказаними морфологічними ознаками, а оцінці 4, відповідно, найнижчої.

Результати та обговорення

Результати отримання та морфологічної оцінки ооцитів у двох груп жінок представлені в таблиці 1. Як видно з таблиці, середній вік жінок молодшої групи склав 27,1±1,8 років, в другій групі цей показник дорівнював 34,9±1,5. При цьому наймолодшій жінці 1-ї групи було 22 роки, а найстаршій жінці 2-ї групи – 42 роки. Кількість отриманих ооцитів у розрахунку на одну жінку достовірно не відрізнялась (15,4±1,3 та 13,1±0,8 відповідно в 1-й та 2-й групах). Відсотки дозрілих, незрілих та ооцитів з ознаками атрезії були практично однаковими в досліджуваних групах жінок. Таким чином, за вказаними вище характеристиками ооцитів розбіжностей між двома віковими групами жінок не було виявлено.

Таблиця 1.

Характеристики ооцитів, отриманих у жінок двох вікових груп

Група жінок	Кількість жінок в групі	Середній вік жінок	Загальна кількість отриманих ооцитів	Кількість ооцитів на 1 жінку	Дозрілі ооцити (%)	Недозрілі ооцити (%)	Ооцити з ознаками атрезії (%)
1 (<30 р.)	43	27,1±1,8	662	15,4±1,3	77,9±0,7	15,8±1,4	6,2±1,5
2 (>30 р.)	78	34,9±1,5	1020	13,1±0,8	78,2±0,4	15,3±0,9	6,3±0,9

◇±**

Результати запліднення ооцитів та морфологічної оцінки раних ембріонів двох вікових груп жінок представлені в таблиці 2.

Таблиця 2.

Характеристики запліднення ооцитів та морфологічна оцінка ембріонів жінок двох вікових груп

Група жінок	Нормальне запліднення (%)	Аномальне запліднення (%)	Незапліднені ооцити (%)	Оцінка морфології ембріонів (%)	
				1 бал	4 бали
1 (<30 р.)	71,3±0,8	3,9±1,5	2,5±1,5	46,8±2,1	11,9±2,7
2 (>30 р.)	69,1±0,5*	5,3±0,9	4,2±0,9	44,8±1,2	18,0±1,5*

Примітка:

* - p<0,05

Як видно з таблиці, рівень нормального запліднення ооцитів у 1-й (молодшій) групі жінок був достовірно вищим, ніж в 2-й групі (71,3±0,8 та 69,1±0,5 % відповідно, - p<0,05). Аномально запліднених (3,9±1,5 та 5,3±0,9% відповідно) та ооцитів, що лишились незаплідненими (2,5±1,5 та 4,2±0,9% відповідно) було дещо більше у 2-й групі жінок, проте різниця не є достовірною.

Ооцити, а потім зиготи та доімплантаційні ембріони людини мають певні морфологічні маркери, що свідчать про морфофункціональну повноцінність та здатність до подальшого розвитку. Виключно важливою є морфологічна оцінка ембріонів, яку зазвичай здійснюють на 2-й або 3-й день ембріонального розвитку (після запліднення *in vitro*). При цьому враховуються кількість, розмір та симетричність бластомерів, ступінь їх фрагментації та стан цитоплазми [6]. Використання цих

маркерів дозволяє ембріологам відбирати для переносу в матку жінки ембріони, що найбільш здатні до імплантації, таким чином зменшуючи кількість перенесених ембріонів та підвищуючи вірогідність настання вагітності.

Відсоток доімплантаційних ембріонів з найвищою оцінкою за морфологічними ознаками (1бал) у двох групах жінок достовірно не відрізнявся ($46,8 \pm 2,1$ та $44,8 \pm 1,2\%$ відповідно у 1-й та 2-й групах). І лише частка ембріонів, що мали найнижчу оцінку за морфологічними маркерами (4 бали) була достовірно більшою в групі жінок старшого віку ($11,9 \pm 2,7$ та $18,0 \pm 1,5\%$ відповідно в 1-й та 2-й групах, $p < 0,05$) (таб.2).

Висновки

На рівні гамет, отриманих в програмах запліднення *in vitro*, їх кількісних та морфологічних характеристик, впливу віку нами не було виявлено.

Вплив віку жінки показано при заплідненні оцитів, рівень якого був нижчий в старшій групі жінок, а також в процесі дроблення доімплантаційних ембріонів. В старшій групі жінок відсоток ембріонів з низькою морфологічною оцінкою був достовірно більшим.

Література

1. *Steinkampf M.P.* Effect of aging on ovulation induction // *Semin. Reprod. Endocrinol.* – 1991. – V.9, №2. – P.266-271.
2. *Bowman M.C., Saunders D.M.* Rates of aneuploidy in oocytes of older women: are equivocal findings of concern for menopausal embryo recipients? // *Hum. Reprod.* – 1994. – V.9, N7. – P.1200-1201.
3. *Angell R.R.* Higher rates of aneuploidy in oocytes from older women // *Hum. Reprod.* – V.9, N7. – P.1199 -1200.
4. *Hook E.B.* Down syndrome rates and relaxed selection hypothesis // *Am. J. Hum. Genet.* – 1983. – V.35, N7. – P.1307-1313.
5. *Navot D., Bergh P.A. et.al.* Poor oocyte quality rather than imolantation failure as a cause of age-related decline in female fertility // *Lancet.* – 1991. – V.337, Nii.- P.1375-1377.
6. *Balaban B., Urman B.* Embryo culture as a diagnostic tool // *Reprod. BioMed. Online.* – 2003.-V.7, N6. – P.671-682.

Резюме

Проведен сравнительный анализ количественных и морфологических характеристик ооцитов и ранних эмбрионов женщин двух групп – до 30 и более 30 лет – в программах оплодотворения *in vitro*. Наблюдала снижение уровня оплодотворения в старшей возрастной группе женщин, а также повышение у них уровня эмбрионов с низкой оценкой морфологии.

Проведено порівняльний аналіз кількісних та морфологічних характеристик ооцитів та ранніх ембріонів жінок двох груп – до 30 та більш ніж 30 років – в програмах запліднення *in vitro*. Спостерігали зниження рівня запліднення в старшій віковій групі жінок, а також підвищення у них рівня ембріонів з низькою оцінкою морфології.

Comparison of morphological characteristics of oocytes and early embryos from 121 women divided into 2 groups (less then 30 years and over 30 years) was carried out in *in vitro* fertilization programs. For group of patients over 30 years old decrease of number of normally fertilized oocytes was shown. We also observed an increase of number of early embryos with low assesment of morphology (Grade 4) in older age group.

СУСЛИНА С.Н., САМАТАДЗЕ Т.Е., НИКИТИНА З.К., ЛИВШИЦ В.А., БЫКОВ В.А.

*Российский университет дружбы народов, Россия, Москва, 117198,
ул. Миклухо-Маклая, д. 6, e-mail: svetlana-suslina@yandex.ru*

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРЕПОДАВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ВРАЧЕЙ И ПРОВИЗОРОВ НА МЕДИЦИНСКОМ ФАКУЛЬТЕТЕ РОССИЙСКОГО УНИВЕРСИТЕТА ДРУЖБЫ НАРОДОВ.

Предмет «Биотехнология» (БТ) для специальности «Фармация» является обязательной дисциплиной уже почти в течение 20 лет. Учебная программа по БТ мало изменилась с тех пор, что обусловлено отнюдь не инертностью системы разработки, а верно определенным вектором развития науки и ее прикладных аспектов в области Фармации.

Основной задачей изучения БТ провизорами является ознакомление с основными группами ЛС биотехнологического происхождения (БЛП), а их к настоящему времени уже более 20 среди которых давно известные вакцины, сыворотки, гормоны, так и недавно появившиеся препараты генной терапии.

Происхождение БЛП, принципы их создания, выполняемая функция в организме определяют источник получения и технологические подходы, а также связанные с этим особенности контроля качества, риски обращения, хранения и применения. Не последнее место занимают вопросы биобезопасности обусловленные биологическим материалом используемым при получении и контроле качества готовой продукции. Трудности с оценкой качества БЛП определяющиеся специфичностью действия и происхождения выводят данную группу ЛС за привычные рамки химико-фармацевтического анализа изучаемые студентами в основном курсе специальности.

Биотехнология для специальности «Лечебное дело» является достаточно новым предметом, всего 10 лет, поэтому в процессе преподавания возникали определенные сложности. Прежде всего, это то, что уровень инноваций в биотехнологии очень высок. Возрастающий объем информации требует развития у студентов творческих способностей и критических навыков мышления, способность анализировать как преимущества, так и потенциальную опасность некоторых революционных технологий (производство генетически модифицированных пищевых продуктов, генная терапия человека, молекулярное клонирование и т.д.). Биотехнология становится одной из векторных дисциплин современного фармацевтического и медицинского образования, в связи с тем, что доля лекарственных средств, получаемых биотехнологическими методами в ближайшем будущем, будет составлять 50% от всех применяемых лекарственных средств.

В связи с этим, особую роль в образовании играет преемственность дисциплин. Программа по биотехнологии заметно выходит за рамки учебных программ предшествующих ей дисциплин. Биотехнология – это интегрированная, мультидисциплинарная область знаний, которая имеет глубокие связи с другими науками и без углубленного освоения комплекса химических и медико-биологических дисциплин понимание важного для медицинского или фармацевтического специалиста предмета биотехнологии крайне сложно.

Преподавание предмета «фармацевтическая биотехнология» в курсе подготовки провизора (специальность фармация 040500) в Российском университете дружбы народов отводится 36 ак.ч. лекций и 72 ак.ч. лабораторных занятий. На кафедре они образуют 18 объединенных шестичасовых занятий в т.ч. два занятия контрольные работы и зачетное занятие, таким образом, пятнадцать из которых семь проводится на кафедре, а восемь - студенты выезжают на научные

базы НИЦ БМТ ВИЛАР РАСХН, НИИ Генетики промышленных микроорганизмов, НИИ Молекулярной биологии, ИБХ РАН.

В связи с переходом на кредитно-модульную систему оценки знаний учебная программа состоит из четырех авторских модулей: 1 Основы организации биотехнологического производства; 2. Клеточные технологии; 3. Рекомбинантные полипептиды и иммунобиотехнология; 4. Препараты на основе живых культур микроорганизмов. Все авторские модули для студентов-провизоров включают основные разделы типовой учебной программы. По каждому модулю проводится проверка знаний с помощью теста, результаты всех тестов по модулям вместе с оценками по каждому занятию складываются в рейтинг по дисциплине, который позволяет судить о качестве освоения материала и делает возможным допуск студента к курсовому экзамену.

К сожалению, около половины учебного времени проходит в теоретическом режиме, что обусловлено невозможностью моделирования типовых биотехнологических процессов вне рамок действующего биотехнологического производства или специализированной научной лаборатории, путь в которые закрыт причинами техники безопасности и чистоты помещений. Данная ситуация характерна для всех ВУЗов где учат провизоров.

Нами данная проблема решается за счет проведения демонстраций работающих биотехнологических лабораторий наших практических баз и просмотра учебных видеофильмов соответствующей тематики. Демонстрируемые на лекциях материалы каждый студент может сфотографировать или в любое удобное для него время получить в собственность в электронном виде. При таком динамичном и информативном способе преподавания отпадает необходимость конспектировать лекции преподавателя, что неизбежно сопряжено с тем, что студенты вынуждены отвлекаться. Таким образом, ознакомление студентов с теоретическими аспектами биотехнологии, которые они получают на лекциях с закреплением этих знаний на практических занятиях, позволяют обеспечить необходимый уровень подготовки специалистов.

Тесное сотрудничество с предприятиями позволяет получать студентам практический опыт работы с промышленным оборудованием и ознакомиться с технологическими процессами. Систематическое посещение студентами выставок позволяет им знакомиться с новейшими научными достижениями в области биотехнологии. Решение ситуационных задач, знакомство с современной концепцией обеспечения качества лекарственных средств и нормативно-правовой базой, регламентирующей биотехнологическое производство, дает возможность прочно закрепить полученные теоретические знания.

Несколько иначе обстоят дела с преподаванием БТ будущим врачам, цикловая система на 7 семестре предусматривает 36 часов «погружения» в течение шести учебных дней. Нами разработана оригинальная программа дисциплины Медицинская биотехнология включающая основные разделы: биотехнологические векторы и инновации для медицины; рекомбинантные белки и пептиды; иммунобиотехнология; генная терапия; ферменты медицинского назначения; раневые покрытия и материалы; клеточные технологии; препараты на основе культур живых микроорганизмов. В рамках кредитно-модульной системы оценки знаний разработана методика формирования рейтинга в ходе реализации которой суммируются баллы полученные студентом на занятии при решении ситуационных задач по изучаемому разделу дисциплины и результаты итогового теста. Полученный таким образом рейтинг студента по дисциплине позволяет судить об усвоенных знаниях и выставить оценку «зачет» или «незачет».

Теоретический аспект освоения дисциплины врачами воспринимается как адекватный способ ознакомления с передовыми направлениями БТ в медицинской практике. Практически весь излагаемый материал лекционный материал оформлен

в виде презентаций. Цветные слайды, выполненные как схемы с выносками или как таблицы, подробно комментируются преподавателем в ходе объяснения материала, что позволяет активировать два сенсорных уровня восприятия студента: визуальный и звуковой. Также студенты могут ознакомиться с образцами веществ, материалов, готовых препаратов получаемых биотехнологическим путем или предназначенных для реализации на практике инновационных лечебных подходов с которыми они могут столкнуться на практике. Следует отметить неуклонный рост интереса студентов-медиков к предмету, если шесть-восемь лет назад вопрос о необходимости предлагаемой информации активно дискутировался по поводу посещать или прогуливать, то сейчас пропуски занятий имеют только уважительные причины. Многие студенты высказывают заинтересованность в продолжении изучения БТ в различных направлениях на постдипломном уровне или в общем курсе специальности.

То, что интересует завтрашних врачей, не может и не должно оставлять равнодушными будущих провизоров. Поскольку, ключевым звеном формирования спроса на БЛП и биотехнологические медицинские услуги являются врачи, то компетенция провизоров в области биотехнологии должна позволять полностью удовлетворять спрос на весь спектр БЛП и сопровождающую его фармацевтическую информацию.

После завершения тем курса проводятся контрольные работы в форме теста, который позволяет в короткий срок оценить и в полной мере охарактеризовать полученные знания студентов. Тесты помогают студентам выделить главные аспекты, на которые необходимо обратить внимание при подготовке к экзамену.

Резюме

Статья посвящена методическим подходам к организации учебного процесса, проведению занятий и оценке качества полученных студентами знаний в ходе освоения ими фармацевтической и медицинской биотехнологии. В статье приводится способ контрольного анализа знаний студентов по предметам «Медицинская биотехнология» и «Фармацевтическая биотехнология» на медицинском факультете Российского университета дружбы народов. Основной курс преподавания предмета разбит на 4 авторских модуля включающих теоретический лекционный материал сопровождающийся мультимедийными показами, решение ситуационных задач по изучаемым темам, ознакомление с образцами реальных биотехнологических объектов. После завершения тем курса проводятся тестовые контрольные работы, который помогает быстро оценить полученные знания студентов. Использование этого метода позволяет повысить эффективность учебного процесса.

ТЕЛЕГЕСВ Г.Д., МИРОШНИЧЕНКО Д.О., МАЛЮТА О.В., КРАВЧУК І.В., ЛИСЕЦЬКА Т.Ю., ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Украина, 03680, Київ, вул. Заболотного, 150 e-mail: g.d.telegeev@imbg.org.ua

ВИВЧЕННЯ *Bcr* ЧАСТИНИ ГІБРИДНОГО ГЕНА *Bcr-Abl* ЯК ШЛЯХ ДО РОЗУМІННЯ ПАТОГЕНЕЗУ ЛЕЙКЕМІЙ ПРИ ТРАНСЛОКАЦІЇ (9:22)

Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) зустрічається приблизно у 20% хворих на лейкемії у дорослих (1). Головну роль в патогенезі цього захворювання відіграє гібридний ген *bcr-abl*, продукт реципрокної транслокації t(9:22). Він кодує дві кінази (серин-треонин кіназу в *bcr* частині, та тирозинкіназу в *abl* частині) гібридного гена. Головна увага у попередніх дослідників була зосереджена на вивченні та блокуванні

Abl кіназної активності. Це призвело до розробки специфічних інгібіторів Abl кінази, що значно поліпшило лікування хворих на цю патологію. Проте, дуже часто, під час лікування селектуються патологічні клони, що є нечутливими до інгібіторів. Це обумовлює необхідність подальшого вивчення молекулярного патогенезу хвороби, пошук нових цілей для терапії.

Дана робота присвячена вивченню іншої, важливої частини онкопротеїну, а саме продукту гена *bcr*. В нашому полі зору був один з кількох доменів цього протеїну, а саме PH домен.

Матеріали і методи

Отримання ДНК-конструкцій. PH ділянку *bcr* було отримано методом ЗТ-ПЛР з клітин крові пацієнтів (за інформованої згоди останніх). Фрагмент розміром 648 п.о. було клоновано в вектор для бактеріальної експресії рЕТ-32а. Всі конструкції було перевірено автоматичним сиквенуванням.

Виділення білків, що зв'язуються з PH доменом Bcr, методом афінної хроматографії. Білок PH експресували в клітинах *E.coli* лінії BL21 DE3 і виділяли на колонці Ni-NTA (Qiagen, USA) згідно протоколу виробника. Для аналізу білок-білкових взаємодій PH домену було використано колонку зі зв'язаним білком. На колонку зі зв'язаним PH білком наносили 0,5 мл лізата клітин K562 з загальною концентрацією білка 1 мг/мл і інкубували 12 год при +4°C. Після інкубації і промивки зразки аналізували методом двомірного електрофорезу. В якості контролю використовували білок, експресований з “порожнього” вектора рЕТ32а.

Аналіз білків, що були преципітовані PH доменом. Білки розділяли методом двомірного електрофорезу з градієнтом рН 3-10. Детекцію радіоактивно-мічених білків клітин K562 проводили на сканері Fuji X2000. Зразки вирізали із гелю, обробляли трипсином і аналізували методом мас-спектрометрії MALDI TOF MS на спектрометрі Bruker Biflex. Для ідентифікації пептидних спектрів було застосовано програму ProFound.

Імунопреципітація білків, що зв'язуються з PH доменом Bcr. Для аналізу було використано клітини 293T, трансфековані конструкціями, що експресували PH домен і відповідний білок-мішень (*zizimin1* або PLCε). В якості негативного контролю було використано конструкцію, яка не містила PH домену. Білок PH мав епітоп мус на N-кінці, *zizimin1* – HA фрагмент, PLCε – flag-фрагмент для полегшення їх детекції. Імунопреципітацію проводили з anti-мус антитілами.

Результати та обговорення

PH домен (від “pleckstrin homology”) - один з найбільш представлених у протеомі людини, він знайдений у 252 протеїнах, має близько 100-120 амінокислотних залишків і відіграє роль в клітинному сигналіngu, транспорті мембран, організації цитоскелету, модифікації фосфоліпідів (2). В попередній роботі ми показали, що PH домен Bcr з високою афінністю взаємодіє з Ptd Ins(3)P, Ptd Ins(3)P, Ptd Ins(5)P (3). Це дозволяє визначити переважне розташування BCR у клітині, що обумовлює його участь в клітинних процесах. Взаємодія з клітинними ліпідами є характерною для приблизно 10-15% всіх PH доменів, крім того вона не виключає можливість взаємодії з клітинними білками.

Для визначення білків, що зв'язуються з PH доменом Bcr *in vitro*, клітини K 562 (бластна криза ХМЛ) вирощували у середовищі з [S³⁵] - метіоніном. Усі білки, в такому випадку, мали радіоактивний сигнал, що дозволяє відрізнити їх від бактеріальних, присутніх у препараті білка PH, зв'язаного з колонкою Ni-NTA. Отримані білки розділяли методом двовимірного електрофорезу з подальшим аналізом методом мас-спектрометрії. Всього було ідентифіковано 23 білки, що потенційно можуть зв'язуватись з PH (табл. 1).

Таблиця 1.

Ідентифікація білків за результатами мас-спектрометрії

№	Назва білку	Номер в базі NCBI	Вирогідність ідентифікації пептидного мас-спектру	Est'Z	Перекриття послідовності пептиду	Теоретичні параметри	
						pI	Mr(кДа)
1	Ribosomal protein P2	NP_000995.1	9.7e+001	0.62	45	4.4	11.65
2	F-actin binding protein	NP_065910.1	1.0e+000	1.11	10	8.1	218.24
3	SMC1	NP_006297.2	9.6e+001	1.02	21	7.6	143.84
4	Keratin10, type1, cytoskeletal	KRHU0	1.0e+000	1.91	27	5.2	59.74
5	hypotetical protein	CAD38623.1	1.0e+000	1.80	18	9.4	198.11
6	pRb-interacting protein RbBP-36	AAN73272.1	6.5e+001	0.67	22	6.3	61.20
7	Oncogene EMS1	NP_612632.1	1.0e+000	1.40	27	5.2	57.62
8	Collagen IV, α -1 polypeptide	NP_001836.1	1.0e+000	1.85	21	8.9	161.73
9	Heat shock protein 27	AAA62175.1	1.0e+000	2.16	48	8.1	22.42
10	Formin-binding protein 17	AAK49824.1	9.7e+001	0.67	17	5.9	78.53
11	Interferon-responding finger protein 1 long form	BAB17050.1	5.7e+001	0.28	13	8.4	99.81
12	Hypotetical protein	CAD38684.1	1.0e+000	1.78	20	6.5	87.64
13	β 5-tubulin	NP_821133.1	1.0e+000	2.39	32	4.8	50.11
14	Ubiquitin specific protease 1	NP_003359.1	1.0e+000	1.29	23	5.4	89.22
15	Zizimin 1	CAC27814.1	1.0e+000	1.34	22	7.6	178.03
16	PLC ϵ	NP_006217.1	1.0e+000	1.06	27	5.4	114.54
17	Rho-GTPase activating protein 7	NP_872584.1	9.5e+001	1.21	16	6.0	172.29
18	Golgi sialoglycoprotein MG-160	Q92896	9.8e+001	0.63	18	6.5	138.46
19	Nuclear factor NF-kappa-B inhibitor kinase β	O14920	9.7e+001	1.20	26	5.6	87.57
20	β 2-tubulin	NP_006079.1	1.0e+000	1.94	23	4.8	50.27
21	Zinc finger protein 217	NP_006517.1	1.0e+000	1.30	18	9.3	117.14
22	KIAA0853	NP_055885.2	1.0e+000	1.36	11	9.6	185.2

23	Hypotetical protein	CAD898999.1	1.0e±000	1.72	18	9.4	4 198.0 0
----	---------------------	-------------	----------	------	----	-----	-----------------

Найбільш представленими у вищезазначеному переліку є білки, що беруть участь у метаболічних процесах клітини і складають 25% (рис. 1), мембранному транспорті – 19%, передачі сигналу- 17%.

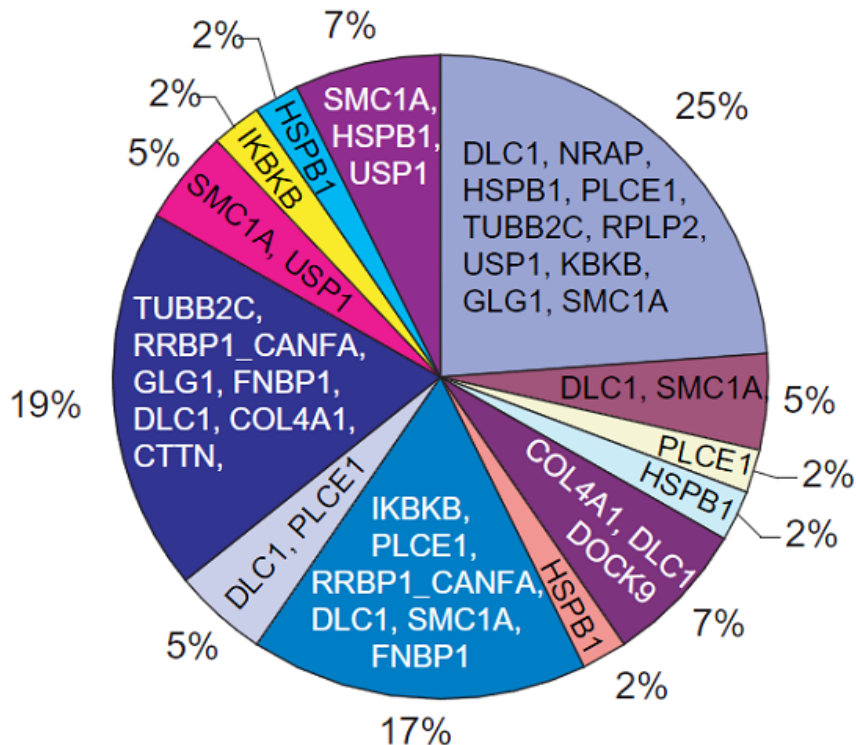


Рис. 1. Функціональний розподіл білків, що взаємодіють з PH доменом

Для подальшого вивчення білок-білкових взаємодій були відібрані : SMC1 (structure maintenance chromosome), Tubulin β , Zizimin 1, PLC ϵ (Pospholipase C ϵ). За допомогою гібридизації із специфічними антитілами (SMC1, Tubulin β) та імунопреципітацією PH домену з Zizimin 1 і PLC ϵ була підтверджена їх взаємодія.

Серед визначених можливих білків-партнерів можна виділити ІКК β , який є кіназою інгібітора NF κ B і бере безпосередню участь у запуску сигнального шляху, що закінчується родиною транскрипційних факторів NF κ B. Це видається особливо цікавим з огляду на той факт, що даний сигнальний шлях задіяний і є важливим у випадку Vcr/Abl-опосередкованої трансформації, хоча точний механізм його активації поки невідомий. Інший білок EMS1 (кортактин) задіяний у ряді важливих клітинних процесів, зокрема він залучений у інтерналізації рецепторів, що може бути одним з важливих етапів появи цитокінової незалежності у клітинах, що експресують Vcr-Abl. На основі наявних даних розроблені можливі схеми сигнальних шляхів, залучених в канцерогенез.

Наступним кроком у цих дослідженнях мають бути встановлення не тільки нових партнерів по зв'язуванню, але і конкретні частини молекул, які відповідають за взаємодію з PH доменом. Також важливим є виявлення молекулярних наслідків цих білкових взаємодій та їх можливий внесок у трансформацію клітини.

Відомо, що після стимуляції CSF відбувається активація P13K, а також міграція Rac2 до фагосоми (5, 6), де вже розташований Vcr, за рахунок взаємодії PH домену з Ptd Ins3P (3). Це дозволяє пояснити існування так званого "oxidative burst" в нейротрофілах

bcr-null трансгенних мишей (6). Втрата GTP-аз активуючої активності Bcr призводить до постійної активації Rac2, з подальшою активацією NADPH оксидазного комплексу (7,8). Роль саме білку Bcr-Abl в такому процесі ще потрібно прояснити, хоча відомо, що при ХМЛ спостерігається зниження рівня секреції внутрішньоклітинних гранул та фагоцитозу (9,10).

Література

1. Quintás-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia // *Blood*.– 2009.– V.113, N 8.– P.1619–1630.
2. Lemmon M.A. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides // *Biochem Soc Symp*.– 2007.– 74.– P. 81–93.
3. Телегеев Г.Д., Мірошниченко Д.О., Мельникова О.Є., Романова І.О., Дибков М.В., Малюта С.С. Вивчення ролі ендогенних чинників в патогенезі лейкемії при транслокації (9;22) // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. Збірник наукових праць*.– Київ, "Логос", 2007. Т.1.– С. 530–533.
4. Ellson C.D., Anderson K.E., Morgan G., Chilvers E.R., Lipp P., Stephens L.R., Hawkins P.T. Phosphatidylinositol 3-phosphate is generated in phagosomal membranes // *Curr Biol*.– 2001.– V. 11, N20.– P.1631–1635.
5. Cho Y.J., Cunnick J.M., Yi S.J., Kaartinen V., Groffen J., Heisterkamp N. Abr and Bcr, two homologous Rac GTPase-activating proteins, control multiple cellular functions of murine macrophages. // *Mol Cell Biol*.– 2007.– V.27, N3.– P. 899–911.
6. Voncken J.W., van Schaick H., Kaartinen V., Deemer K., Coates T., Landing B., Pattengale P., Dorseuil O., Bokoch G.M., Groffen J. Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants // *Cell*.– 1995.– V.80, N5.– P. 719–728.
7. Bokoch G.M., Diebold B.A. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase // *Blood*.– 2002.– V.100, N8.– P. 2692–2696.
8. Kaartinen V., Gonzalez-Gomez I., Voncken J.W., Haataja L., Faure E, Nagy A, Groffen J, Heisterkamp N. Abnormal function of astroglia lacking Abr and Bcr RacGAPs // *Development*.– 2001.– V. 128, N21.– P. 4217–4227.
9. Nuyanzina V.A., Nabokina S.M. Identification of exocytosis mediator proteins in peripheral blood neutrophils of patients with chronic myeloid leukemia // *Bull Exp Biol Med*.– 2004.– V. 137, N.4.– P. 361–363.
10. Kobayashi S.D., Voyich J.M., Burlak C., DeLeo F.R. Neutrophils in the innate immune response // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* .– 2005.– V. 53, N6.– P. 505–517.

Резюме

Bcr є складовою частиною гібридного гену *bcr-abl*, що утворюється при лейкеміях t(9;22). Саме він є модулюючим фактором, що визначає гостроту і характер захворювання. У роботі, за допомогою очищеного рекомбінантного PH домена Bcr, вивчали його взаємодію з білками клітини. Встановлена взаємодія з 23 клітинними білками, а більш детально з'ясовано зв'язок з SMC1, Tubulin β , Zizimin 1, PLC ϵ . Обговорюється роль білка Bcr у патогенезі при ХМЛ.

Bcr является составной частью гибридного гена *bcr-abl*, образующегося при лейкемиях t(9;22). Именно он является модулирующим фактором определяющим остроту и характер заболевания. В работе с помощью очищенного рекомбинантного PH домена Bcr, изучали его взаимодействие с белками клетки. Установлено взаимодействие с 23 клеточными белками, а более детально установлена связь с SMC1, Tubulin β , Zizimin 1, PLC ϵ . Обсуждается роль белка Bcr в патогенезе при ХМЛ.

Bcr is the essential component of the hybrid *bcr-abl* founded in t(9;22) leukemias. Namely *Bcr* modulates the development of the different forms of leukemias. In this work, using recombinant PH domain of Bcr, the interaction with 23 cellular proteins was identified and binding with SMC1, Tubulin β , Zizimin 1, PLC ϵ was confirmed. Role of Bcr protein in CML pathogenesis was discussed.

ТИРКУС М. Я.

ДУ «Інститут спадкової патології АМН України»

Україна, 79000, Львів, вул. ЛИСЕНКА, 31а, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua

ЧАСТОТА І СПЕКТР МІКРОДЕЛЕЦІЙ Y-ХРОМОСОМИ У ЧОЛОВІКІВ З РІЗНИМИ ФОРМАМИ ПОРУШЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ

Сперматогенез - складний багатостадійний процес в контроль, регуляцію і реалізацію якого залучено більше 2000 генів, серед яких центральне місце займають гени Y-хромосоми. Результати молекулярно-генетичних досліджень свідчать про те, що мікрodelеції AZF локусу є однією з найбільш частих (мажорних) генетичних причин непліддя у чоловіків при важких формах порушення сперматогенезу.

Зокрема, на довгому плечі Y-хромосоми (Yq) в проксимальній еухроматиновій її ділянці містяться гени фактору азооспермії (AZF- регіон), які відповідають за нормальний сперматогенез. Делеції AZF- регіону супроводжується важкими порушенням фертильності [1].

Вперше роль делецій локусу Yq11 в етіології порушення процесів сперматогенезу було показано в 1976 р. Tierolo і Zuffardi [2]. Подальші цитогенетичні та молекулярно-генетичні дослідження дозволили за допомогою Sts-технології побудувати детальну карту Y-хромосоми, що включає 43 делеційні інтервали та підтвердити наявність в дистальній ділянці довгого плеча Y-хромосоми локусу AZF, делеції якого супроводжуються порушеннями процесів сперматогенезу та чоловічим непліддям [3]. Так, при таких важких формах порушення сперматогенезу, як азооспермія та олігозооспермія, мікрodelеції AZF локусу Y-хромосоми виявляють у 5-15% обстежених. Причому, частота мікрodelецій зростає по мірі поглиблення порушень процесів сперматогенезу: мікрodelеції AZF локусу Y-хромосоми виявлені у 5-10% чоловіків з олігозооспермією, в той час, як у чоловіків з азооспермією, що передбачає складніші порушення, цей показник сягає 10-15% [4,5].

У 1996 р. Vogt із співавт. [6] на основі одержаних даних про локалізацію та розмір делецій, запропонували виділити в локусі Yq11.21-q11.23 три субрегіони: AZFa, AZFb і AZFc. Зараз в літературі широко дискутується взаємозв'язок між чоловічою інфертильністю та частотою і спектром мікрodelецій AZF регіону Y-хромосоми. Зокрема, вважається, що найчастіше при чоловічому неплідді зустрічаються делеції локуса AZFc, але найважчими клінічними проявами супроводжуються мікрodelеції, що захоплюють субрегіони AZFa і AZFb [7].

Отже, метою даної роботи було встановити частоту та спектр мікрodelецій AZF регіону Y-хромосоми серед чоловіків з різними формами порушення сперматогенезу.

Матеріали та методи

Досліджувану групу склали 300 чоловіків із різними формами порушення сперматогенезу. Обстежувані скеровувалися у Львівський міжобласний медико-генетичний центр з приводу неплідного шлюбу. Генетичним дослідженням передували дослідження показників сперматогенезу. Всі досліджувані мали порушення показників спермограми різного ступеня важкості. Контроль складав 50 здорових фертильних чоловіків.

ДНК виділяли з периферійної крові методом висолювання. Молекулярно-генетичні дослідження гена SRY та мікрodelецій AZFa, AZFb та AZFc регіону проводили в наступних STS локусах: sY84, sY86, sY127, sY134, sY254, sY255 за допомогою двох мультилокусних реакції для вищевказаних STS локусів та контрольного фрагменту SRY [8].

Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [9]. ПЛР проводили в автоматичному режимі на

термоциклері „Терцик” („ДНК-технология”, Росія), використовували олігонуклеотидні праймери та суміш dDNTP („Fermentas”, Вільнюс, Литва), 5х кратний реакційний буфер та термостабільну ДияТак-полімераза виробництва фірми “ДНК-технологии” (м. Москва, Росія).

Проводили 35циклів ПЛР в наступному режимі: активація-15хв (95°C), денатурація ДНК (94°C) 30сек., відпал праймерів (57°C) 90сек. і синтезу ДНК (72°C) 60 сек. Аналіз продуктів ПЛР проводили шляхом електрофорезу в 2% агарозному гелі та сканували електрофореграму на ультрафіолетовому транслюмінаторі[8].

Результати та обговорення

Попередньо слід зазначити, що всім обстежуваним чоловікам з порушеними параметрами спермограми проводили каріотипування. Нижче представлені результати молекулярно-генетичних досліджень стосувалися чоловіків із нормальним каріотипом.

На підставі результатів спермологічних досліджень обстежувані чоловіки були розділені на 3 групи. Першу групу склало 120 осіб, серед них 65 осіб з аспермією(відсутність в еякуляті сперматозоїдів та клітин сперматогенезу) та 45 осіб з азооспермією (відсутність сперматозоїдів у еякуляті). Другу групу склало 80 осіб, серед них 40 осіб з важкою олігозооспермією (кількість сперматозоїдів менше 5 млн/мл) та 40 осіб з олігоастенотератозооспермією, а третю – 100 осіб з іншими формами патозооспермії (при кількості сперматозоїдів більше 5 млн/мл).

В результаті роботи проведено детекцію AZFa-, AZFb-, AZFc-регіонів AZF-локусу довгого плеча Y-хромосоми та SRV-гена короткого плеча Y-хромосоми у всіх досліджуваних групах. Дослідження кожної проби проводили не менш як у двох повторях. Відсутність на електрофореграмі певних фрагментів свідчила про наявність мікрodelецій у відповідних локусах. У даній роботі детекція гена SRV служила як для внутрішнього контролю реакції, так і для визначення наявності Y-хромосоми. З метою уникнення псевдонегативних результатів, нами проведено дослідження даного зразка ДНК для генів розташованих на аутосомах, що дало позитивний синтез.

Отримані результати засвідчили, що у 21 пацієнта виявлено мікрodelеції Y-хромосоми, що складає 7% від всіх (300) обстежених чоловіків. При цьому виявлений наступним спектром мутацій: мікрodelеції субрегіону AZFa виявлено у однієї особи (4,8%), субрегіону AZFb - у двох осіб (9,5%), субрегіонів AZF(b+c) – у шести осіб (28,6%), мікрodelеції субрегіону AZFc виявлено у десяти осіб (47,6%), у двох осіб встановлено відсутність усієї послідовності AZF(a+v+c) Y-хромосоми (9,5%).

Отже, як видно з представлених результатів (таблиця), найчастіше ушкоджувався субрегіон AZFc. Назагал, відсутність AZFc субрегіону встановлено у 18 осіб. Тобто ця мікрodelеція виявлена у 85,7% пацієнтів із загальної (21 пацієнт) групи з діагностованими мікрodelеціями Y-хромосоми. Наші результати принципово співпадають із результатами інших дослідників[10], згідно яких порушення у AZFc ділянці є найрозповсюдженішими.

Підсумовуючи отримані результати щодо частоти мікрodelецій Y-хромосоми залежно від важкості порушень процесів сперматогенезу, очевидно, що найчастіше мікрodelеції виявляли у групі пацієнтів з аспермією та азооспермією (всього 14 чоловік). Значно рідше мікрodelеції виявляли в групі пацієнтів з олігозооспермією та олігоастенотератозооспермією (всього 6 чоловік). І лише в одного пацієнта з третьої групи виявлені мікрodelеції Y-хромосоми. У контрольній групі мікрodelеції Y-хромосоми знайдено не було[5,11]. Частота детекції мікрodelецій Y-хромосоми серед всіх обстежених інфертильних чоловіків склала 7%. Зведені результати досліджень наведені в таблиці.

Таблиця

Частота та спектр мікрodelецій AZF регіону в досліджуваних групах чоловіків

Групи пацієнтів	Кількість обстежених	Кількість знайдених	Спектр знайдених
-----------------	----------------------	---------------------	------------------

	чоловіків	мікрodelецій	мікрodelецій
1. Аспермія Азооспермія	65 55	7(10,8%) 7(12,7%)	AZFa, AZFb, AZFc, AZF(b+c), AZF(a+b+c)
2. Олігозооспермія Олігоастенотератозооспермія	40 40	3(7,5%) 3(7,5%)	AZFc
3. Різні форми патоспермії (к-сть сперматозоїдів більше 5млн/мл)	100	1(1%)	AZFc
Всього пацієнтів 1-3 групи (інфертильні чоловіки)	300	21(7%)	AZFa, AZFb, AZFc, AZF(b+c), AZF(a+b+c)
Контрольна група (фертильні чоловіки)	50	0(0%)	—————

При вивченні спектру мікрodelецій AZF регіону в обстежуваних групах пацієнтів з'ясувалося, що лише в першій групі (пацієнти з аспермією/азооспермією) діагностовано весь спектр мікрodelецій, а саме: мікрodelеції субрегіонів AZFa, AZFb, AZF(b+c) та AZF(a+b+c). В другій та третій групах виявлено мікрodelеції лише субрегіону AZFc. Отримані результати підтверджують, по-перше, тезу про те, що найважчими клінічними проявами супроводжуються мікрodelеції, що захоплюють субрегіони AZFa і AZFb і по-друге те, що найчастіше при порушених параметрах сперматогенезу зустрічаються мікрodelеції субрегіону AZFc, причому, при ураженнях сперматогенезу різного ступеня [12].

Отже, молекулярно-генетичне дослідження мікрodelецій Y-хромосоми дозволяє зрозуміти причину порушення сперматогенезу, поліпшити диференційну діагностику і має прогностичне значення.

Висновки

1. Серед всіх обстежених інфертильних чоловіків частота мікрodelецій Y-хромосоми становить 7%, причому, найчастіше мікрodelеції AZF регіону виявляються у чоловіків з аспермією та азооспермією, частота яких становить 10,8% та 12,7% відповідно.

2. Мікрodelеції субрегіонів AZFa та AZFb зустрічались виключно в пацієнтів з аспермією та азооспермією, мікрodelеції AZFc регіону виявлялись у переважної більшості обстежених чоловіків з порушеннями процесів сперматогенезу незалежно від ступеня таких порушень.

3. Отримані результати вказують на вагомий внесок генетичної компоненти у порушеннях сперматогенезу та передбачають необхідність проведення цих досліджень в усіх випадках порушення сперматогенезу при кількості сперматозоїдів 0- 5 млн/мл.

Література

1. *Hopps C.V., Mielni, A., Goldstein M., Palerm, G.D., Rosenwaks Z. & Schlegel P.N.* Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. //Human Reproduction.- 2003.- Vol. 18.- P. 1660-1665.

2. *Tiepolo L., Zuffardi O.* Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y-chromosome long arm // Hum.Genet.- 1976.- Vol. 34.- P.119-124.

3. *Vollrath D., Foote S., Hilton A.* et al. The human Y chromosome: a 43-internal map based on naturally occurring deletions // Science. - 1992. - Vol. 258. - P. 52-59.

4. *Foresta C., Moro E., Ferlin A.* Prognostic value of Y deletion analysis. The role of current methods // Hum. Reprod. — 2001. —Vol. 16, № 8. - P. 1543-1547.

5. *Simoni M., Bakker E., Eurlings M.* et al. Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletion // Int. J. Androl.- 1999. - Vol. 22. - P. 292-299.

6. *Vogt P.H., Edelmann A., Kirsch S. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11.// Hum Mol Genet.- 1996.-Vol. 5.-P. 933–943.*
7. *Krausz C., Forti G. & McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility.// International Journal of Andrology. -2003.- Vol. 26.-P.70-75.*
8. *Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions // International J. of Andrologi.- 2004.- No 27.- P. 240-249.*
9. *Маниатис Т., Фриз Е.Е, Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование.- М. Мир.- 1985.- С.420.*
10. *Simoni M., Bakker E., Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions // International J. of Andrologi.- 2004.- No 27.- P. 240-249.*
11. *Черных В.Б., Курило Л.Ф., Штлейко Л.В. и авт. Анализ микроделеций в локусе AZF у мужчин с бесплодием: совместный опыт исследований. // Медицинская генетика.-2003.- Т. 2. № 8. С. 367-379*
12. *Maurer, B. & Simoni, M. Y chromosome microdeletion screening in infertile men. //Journal of Endocrinological Investigation. -2000.- Vol. 23.- P. 664-670.*

Резюме

Отримані результати молекулярно-генетичних досліджень свідчать про те, що мікроделеції AZF локусу Y-хромосоми є однією з найбільш частих (мажорних) генетичних причин непліддя у чоловіків при важких формах порушення сперматогенезу. Серед всіх обстежених інфертильних чоловіків частота мікроделецій Y-хромосоми становить 7%, причому, найчастіше мікроделеції AZF регіону виявляються у чоловіків з аспермією та азооспермією, частота яких становить 10,8% та 12,7% відповідно.

Полученные результаты молекулярно-генетических исследований свидетельствуют о том, что микроделеции AZF локусу Y-хромосоми являются одной из наиболее частых (мажорных) генетических причин бесплодия у мужчин при тяжелых формах нарушения сперматогенеза. Среди всех обследованных инфертильных мужчин частота микроделеций Y-хромосоми составляет 7%, причем, чаще всего микроделеции AZF региона обнаруживали у мужчин с аспермией и азооспермией, частота которых составляет 10,8% и 12,7% соответственно.

The obtained results of molecular-genetic researches testify that Y-chromosome AZF locus microdeletions are one of the major genetic causes of infertility in males with severe forms of spermatogenesis failure. Among all studied infertile men Y-chromosome microdeletions frequency was 7%, thus, AZF region microdeletions mostly were found in males with aspermia and azoospermia. Their frequencies were 10,8% and 12,7% accordingly.

ТКАЧОВА Д.Л., ДУГАН О.М.

Національний технічний університет України «КПІ»,

Україна, 03056, м. Київ, пр. Перемоги, 37, e-mail: diotech@ntu-kpi.kiev.ua

ПОТЕНЦІЙНА МУТАГЕННА ДІЯ КОПЧЕНИХ М'ЯСОПРОДУКТІВ

Попередження або гальмування небажаного мікробіологічного псування м'яса і м'ясних продуктів досягається шляхом застосування різноманітних способів консервування із застосуванням дії різних зберігаючих факторів (бар'єрів): фізичних (високі і низькі температури, іонізуюче випромінювання, ультрафіолетове випромінювання, упаковки і захисних покриттів); хімічних (використання

консервантів); фізико-хімічних (посол, копчення); біохімічних (направлене використання мікрофлори).

Сучасні способи обробки мають бути направлені на отримання стійких при зберіганні продуктів з високими показниками якості, що може досягатися комбінацією декількох зберігаючих факторів (бар'єрів), які не можуть подолати мікроорганізми, присутні у продукті. Прикладом традиційної комбінації бар'єрів може слугувати копчення м'ясопродуктів, де сполучаються консервуюча дія зневоднення, солі і бактерицидних речовин коптільного диму [4].

Копчення – це обробка м'ясопродуктів коптільним димом з метою надання їм специфічних органолептичних властивостей і подовження термінів зберігання. М'ясні продукти обробляються як гарячим димом (обсмаження, гаряче копчення, запікання у диму), так і холодним димом (холодне копчення) [3,4].

Коптільний дим – це складна дисперсійна система типу аерозолі. Дисперсійним середовищем є парогазова суміш, яка складається з повітря, газоподібних продуктів горіння, парів коптільних речовин і водяних парів. Дисперсійна фаза представлена частками рідких і твердих речовин – продуктів неповного згорання деревини. Основна маса коптільних речовин зосереджена у дисперсійній фазі. У димі присутні частки попелу і сажі, які є небажаними домішками. У складі коптільного диму знайдені наступні класи органічних сполук: органічні кислоти (оцтова, пропіонова, масляна, валеріанова, мурашина), альдегіди і кетони, спирти, феноли та їхні ефіри, аміни, поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) тощо [4]. Загальна кількість речовин, присутніх у димі, оцінюється у 5-10 тисяч, з яких ідентифіковано біля 500 індивідуальних компонентів [1,3].

Для отримання коптільного диму використовують деревину листяних порід: бук, дуб, вільха, береза, клен, ясен, тополь та ін. Застосування різних порід деревини дозволяє отримати різноманітний аромат, смак і колір м'ясопродуктів. Найкращий за складом і властивостям дим утворюється при температурі 220-300°C. Зниження температури супроводжується збільшенням кількості сажі, більш темним забарвленням та погіршенням аромату і смаку. При температурі вище 300°C виникає підвищена небезпека утворення канцерогенних ПАВ [3].

Поряд із класичним копченням використовують бездимне копчення із застосуванням коптільних рідин. Це очищені конденсати диму, які в значній мірі звільнені від смол і небажаних побічних продуктів (ПАВ і нітрозамінів) [3]. Коптільна рідина використовується в якості ароматизатора.

За Сарафановою [5] *ароматизатор – харчова добавка, що вноситься у харчовий продукт для покращення його аромату та смаку, і являє собою суміш смакоароматичних речовин із розчинником або сухим носієм, або без них.* Оскільки ароматизатори є складними багатокомпонентними сумішами і виробляються вони у світі у кількостях в декілька тисяч, то коди «Е» їм не надаються.

Як було зазначено вище, коптільний дим містить тисячі неідентифікованих компонентів, через що кінцеву токсиколого-гігієнічну оцінку копченню надати неможливо. Основним токсичним компонентом диму є добре відомий канцероген – бенз(а)пірен. Наряду з ним у димі зустрічаються і інші поліциклічні сполуки. Гранично допустима концентрація бенз(а)пірену складає 1 мкг/кг їстівної частини копченого продукту. Вважається, що при холодному копченні на продукті осаджується менше бенз(а)пірену, ніж при гарячому. Особливо високий вміст бенз(а)пірену спостерігається при чорному копченні. При копченні солених м'ясопродуктів можуть утворюватися також небезпечні для здоров'я нітрозфеноли [3].

Бездимне копчення являє собою обробку виробів у коптільній камері або безпосереднім введенням коптільного препарату у продукт (у фарш разом із розсолом), чи нанесенням його на поверхню продукту (зануренням у коптільну рідину, розбризкуванням, обмазуванням). Основою для виготовлення коптільних препаратів (рідин) слугують конденсати, утворені вловлюванням компонентів диму водою [4].

Перевагою бездимного копчення є те, що якщо при традиційному димовому способі в результаті контакту копчених продуктів з нітрогазами, що містяться у коптильному димі, існує небезпека забруднення продуктів нітросолями, то при бездимному способі копчення це небажане явище повністю виключається [2]. Згідно з директивою ЄС концентрація бенз(а)пірену у коптильних рідинах не повинна перевищувати 10,0 мкг/кг [7]. Такі препарати мають ряд недоліків, а саме неадекватність складу і співвідношення коптильних речовин у коптильних препаратах у порівнянні з коптильним димом; висока трудомісткість поверхневої обробки продуктів коптильними препаратами; відсутність повної імітації запаху, смаку і кольору у продуктах у порівнянні з традиційним копченням [4].

На сьогодні використовується велика кількість різноманітних за технологічними властивостями, хімічним складом і способами застосування коптильних препаратів із різними назвами та індексами: «Аромат копчення», «Вахтоль», «Вобеоль», «ВНИИМП», «ВНИИМП-1», «Геркосеф», «Жидкий дым», «КП-74», «Коптильная соль», «Коптильное масло», «МИНХ», «ПДВ» та ін. [2].

Як вже було зазначено, копчення – добре відоме джерело контамінації їжі поліциклічними ароматичними вуглеводами. Методи традиційного процесу копчення можуть суттєво різнитися, через що вміст ПАВ у копчених продуктів значно варіює.

Факторами, що впливають на склад копченого продукту, є вид деревини, методи прямого і непрямого копчення, різні температури копчення, тип димогенератора, доступність кисню, час копчення тощо [7]. За даними літератури проведені чисельні дослідження вмісту ПАВ у копчених продуктах харчування. Так, у Сербії визначили вміст ПАВ шести типів копчених м'ясних продуктів, а саме вітччини з яловичини, свинини, бекону у оболонці, бекону без оболонки, ковбаси сајна і ковбаси sremksa. Зразки відбиралися на виробництві кожні три години протягом 15-18 днів копчення. Найбільшу концентрацію ПАВ мали копчена вітччина із яловичини і бекон без оболонки. Результати досліджень показали, що вміст у зразках 16 ПАВ, визначених Міжнародним агентством з досліджень раку (IARC) як пріоритетні, складав від 1,5 до 6,8 мкг/кг [8]. У інших дослідженнях [11] були перевірені на наявність канцерогенних і неканцерогенних ПАВ такі копчені продукти, як індичатина, свинина, курчатина, яловичина і риба, та 18 промислових коптильних препаратів. Загальна концентрація ПАВ у копчених м'ясних продуктах складала від 2,6 до 29,8 мкг/кг, у копченій рибі – від 9,3 до 86,6 мкг/кг. Загальна концентрація канцерогенних ПАВ у копченому м'ясі складала до 7,4 мкг/кг і у копченій рибі до 16,0 мкг/кг. У коптильних препаратах загальна концентрація ПАВ складала від 6,3 до 43,7 мкг/кг, а концентрація канцерогенних ПАВ складала від 0,3 до 10,2 мкг/кг [20]. Ще одним прикладом є дослідження 11 зразків коптильних препаратів і 44 зразків копчених продуктів (ковбаса, бекон, реберця тощо) різних виробників. У 73% коптильних препаратів був знайдений бенз(а)пірен, його рівні коливалися в межах 0,1 – 336,6 мкг/кг. У 52% зразків копчених продуктів також знайдений бенз(а)пірен у кількості від 0,1 до 5,9 мкг/кг [20]. У 2004 році групою дослідників [12] була складена база даних (на основі 139 посилань на літературні джерела з 23 країн світу) по вмісту нітросолей, гетероциклічних амінів та ПАВ у продуктах харчування. Згідно цієї бази даних в різних копчених продуктах загальний вміст ПАВ реєструвався у наступних концентраціях: у яловичині – 42,1 мкг/кг; птиці – 4,5 - 17,3 мкг/кг; сосисках – 14,9 мкг/кг; вітччині – 2,6 - 9,5 мкг/кг; свинині – 7,5 мкг/кг; ковбасі – 7,2 - 10,0 мкг/кг.

ФАО/ВООЗ підкреслює необхідність проведення досліджень мутагенності хімічних препаратів, що використовуються в якості харчових добавок. Продукція, приготована з використанням коптильних рідин, досить добре досліджена з токсикологічних позицій. Однак, через те, що коптильні препарати містять такі мутагенні речовини, як феноли, формальдегід, оцтову кислоту та ін., були проведені додаткові дослідження мутагенної активності коптильних препаратів. Так, препарат ВНИИМП не викликав мутацій у трьох експериментальних моделях, що дало підґрунтя

говорити про відсутність у них мутагенної дії. У щурів, які отримували протягом місяцю продукцію, виготовлену із застосуванням препарату «Вахтоль», не було відмічено мутагенної дії на статеві клітини. У той же час коптільний препарат «Вахтоль» у 1% концентрації збільшував у порівнянні з контролем частоту мутацій у культурі *E.coli*, а також проявив тенденцію до збільшення хромосомних аберацій у культурі тканин людини. Тому, дані рекомендації з обмеження використання вказаного препарату у харчовій промисловості [1]. В інших експериментах цитогенетичні дослідження впливу коптільної рідини у чотирьох концентраціях на хромосоми клітин кісткового мозку мишей також не виявили мутагенної дії [14]. Ще одні автори [18] вивчали дію чотирьох промислових коптільних рідин, конденсату коптільного диму і конденсату тютюнового диму. Отримані результати свідчили про те, що на відміну від конденсату тютюнового диму, ані коптільні рідини, ані конденсат коптільного диму не викликали мутацій у тесті Еймса із застосуванням штаму *S. typhimurium* TA98, тоді як три коптільні рідини проявляли мутагенну активність у дослідженнях із штамом TA100.

Крім коптільних препаратів на мутагенність досліджені різноманітні копчені продукти, конденсати коптільного диму і його фракції. Так, проведені дослідження конденсату коптільного диму, отриманого із різних порід деревини у Нігерії, у тесті Еймса із застосуванням штамів TA98 і TA100. В результаті всі конденсати викликали дозозалежне збільшення гістидинових ревертантів здебільшого у присутності метаболічної активації. У конденсатах були ідентифіковані 7 ПАВ, а саме пірен, бенз(а)пірен, бенз(а)антрацен, бенз(к)флуорантен, бенз(б)хризен, бенз(г,х,і)перилен та дибенз(а,е)пірен [6]. У інших дослідженнях [13] фракції екстрактів копчених м'ясних продуктів, що містили ПАВ, досліджувалися на штамів TA98 і TA100 у відсутності метаболічної активації і після чотиригодинної обробки нітритом при 37°C у кислому середовищі. Результати досліджень у тесті Еймса показали, що нітрит перетворює ПАВ у кислому середовищі у мутагени прямої дії, які можуть бути нітро-ПАВ.

Зафіксована мутагенна дія зразків прокопченого тунця, який широко застосовується в японській кухні. Дослідження проводили на штамі TA98 з метаболічною активацією. Мутагенна дія була вища, ніж очікувана при тому рівні бенз(а)пірену, що був визначений у цих зразках. Хроматографічними методами було показано, що основними мутагенними компонентами, ймовірно, слугували представники гетероциклічних амінів – імідазохіноліни та імідазохіноксаліни [15].

Крім того, у тесті Еймса із застосуванням 5 штамів *S. typhimurium* був досліджений конденсат диму з коптільні. Найбільша увага була приділена фракціям вільним від ПАВ, але які містили фенольні сполуки, які відповідають за консервуючу і ароматизуючу дію коптільного диму. Фенольні сполуки, якими збагачений коптільний дим, а саме фенол, крезол, 2,4-диметилфенол, сирінгол, евгенол, ванілін та гваякол, давали негативні результати у тесті Еймса до концентрації 5000 мкг на чашку у присутності і відсутності метаболічної активації. Фракціонування конденсату на фенольні фракції і дослідження кожної фракції у тесті Еймса також дало негативні результати за виключенням деяких випадків, що не виключає наявність невеликої кількості мутагенних домішок [17].

Досліджені 5 похідних карболових кислот, які формуються при взаємодії карбонільних сполук коптільного диму з триптофаном, на мутагенність у тесті Еймса. В результаті три з протестованих сполук не викликали мутацій у штамів TA97, TA98 і TA100, а дві сполуки виявилися токсичними для *S. typhimurium* [16].

Слід звернути увагу, що епідеміологічні дослідження вказують на кореляційні зв'язки між зростаючими випадками ракових захворювань шлунково-кишкового тракту і системне споживання копчених продуктів [10]. За спостереженнями протягом 10 років у певному регіоні Угорщини із словенським населенням процент раку шлунку від загальної захворюваності на рак вдвічі більше (47-50%), ніж у всій Угорщині в цілому (29,9%). Відомо, що у цьому регіоні населення споживає домашні копчені продукти з

вмістом бенз(а)пірену 4,16 мкг/кг, тоді як у домашніх копчених продуктах інших регіонів і у промислових копчених продуктах вміст бенз(а)пірену в середньому складає 0,7 мкг/кг [9]. Також, у північно-східному регіоні Індії зафіксовані часті випадки назофарингальної карциноми, які пов'язують із вживанням копченого м'яса в цьому регіоні. Дослідження екстрактів копченого м'яса у тесті Еймса на штаммах TA98, TA1538, TA100, TA1535 і TA1537 у присутності і відсутності метаболічної активації показали наявність мутагенної активності. Крім того, була показана індукція зразками злоякісних пухлин у мишей. Хімічний аналіз екстрактів показав присутність низьких концентрацій летких нітрозамінів [19].

Таким чином, за даними літератури, проведені чисельні дослідження із визначення мутагенної активності конденсатів коптильного диму, коптильних препаратів і безпосередньо зразків різноманітних копчених продуктів із одночасним визначенням в них вмісту потенційних мутагенів/канцерогенів, таких як ПАВ, нітрозаміни і гетероциклічні аміни. Отримані дані є неоднозначними і не дають у повній мірі відповіді про мутагенний/канцерогенний властивості копчених продуктів і коптильних препаратів. Здебільшого, копчені продукти і конденсати коптильного диму виявляли мутагенну дію у тесті Еймса, тоді як коптильні препарати були менш мутагенними. У багатьох досліджуваних зразках визначені високі рівні ПАВ, причому і у деяких коптильних препаратах, які початково створювалися із метою позбавлення забруднення ПАВ. Небезпеку вживання неякісної копченої продукції доводять і епідеміологічні дослідження, що вказують на кореляційний зв'язок між раковими захворюванням шлунково-кишкового тракту і систематичним вживанням копченої їжі з вмістом ПАВ (і як основним показником - бен(а)пірену), що значно перевищує ГДР. Виходячи з вищесказаного, актуальним є подальше вивчення мутагенної активності копчених продуктів, виявлення причин, що впливають на варіабельність вмісту мутагенних/канцерогенних речовин і відповідно на мутагенність копченого продукту (а саме - вид деревини, температура і час копчення, додавання нітритів тощо), здійснення екстраполяції даних генетичних тестів на людину і встановлення кореляційних зв'язків між харчовим раціоном і захворюваністю населення.

Література

1. *Булдаков А.С.* Пищевые добавки. Справочник. – СПб.: „Ut”, 1996. – 240 с.
2. *Курко В.И.* Основы бездымного копчения. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 228 с.
3. *Люк Э., Ягер М.* Консерванты в пищевой промышленности. – СПб: ГИОРД, 1998. – 296 с.
4. *Перкель Т. П.* Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов: Учебное пособие / Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. - Кемерово, 2004. - 100 с.
5. *Сарафанова Л.А.* Пищевые добавки: Энциклопедия. – СПб: ГИОРД, 2004. – 808 с.
6. *Asita A.O., Matsui M., Nohmi T. et al.* Mutagenicity of wood smoke condensates in the Salmonella/microsome assay // *Mutat. Res.* – 1991. - Vol. 264, № 1. –P. 7-14.
7. *CX/FAC 05/37/34 Discussion paper on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) contamination, Thirty-seventh session of joint FAO/WHO food standards programme / Codex committee on food additives and contaminants.* – The Hague, the Netherlands. - 2005. – 9 p.
8. *Djinovic J., Popovic A., Wolfgang J.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different types of smoked meat products from Serbia // *Meat Science.* – 2008. – Vol. 80. – P. 449 – 456.
9. *Fritz W., Soos K.* Smoked food and cancer // *Bibl. Nutr. Dieta.* – 1980. – Vol. 29. – P. 57 – 64.
10. *Goldman R., Shields P.G.* Food mutagens // *J. Nutr. (Suppl.)* – 2003. – Vol. 133. – P. 965S – 973S.

11. *Gomaa E.A., Gray J.I., Rabie S. et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings // *Food. Addit. Contam.* – 1993. – Vol. 10, № 5. – P. 503-521.
12. *Jakszyn P., Agudo A., Ibanez R. et al.* Development of a food database of nitrosamines, heterocyclic amines, and polycyclic aromatic hydrocarbons // *J. Nutr.* – 2004. - Vol. 134. – P. 2011–2014.
13. *Kangsadalampai K., Butryee C. and Manoonphol K.* Direct mutagenicity of the polycyclic aromatic hydrocarbon-containing fraction of smoked and charcoal-broiled foods treated with nitrite in acid solution // *Food Chem. Toxicol.* -1997. – Vol. 35, № 2. – P. 213-218.
14. *Kazimirova A., Jablonicka A.* Evaluation of potential mutagenic effect of the liquid smoke preparation UTP in vivo: cytogenetic analysis of mouse bone marrow // *Mutat. Res.* – 1994. – Vol. 323, № 1-2. – P. 89 – 92.
15. *Kikugawa K, Kato T, Hayatsu H.* Mutagenicity of smoked, dried bonito products // *Mutat. Res.* – 1985. – Vol. 158, № 1-2. – P. 35-44.
16. *Papavergou E., Ioannides C., Clifford M.N.* The evaluation in the Ames test of the mutagenicity of tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acids from smoked foods // *Food Addit. Contam.* – 1992. – Vol. 9, № 2. – P. 183-187.
17. *Pool B.L., Lin P.Z.* Mutagenicity testing in the Salmonella typhimurium assay of phenolic compounds and phenolic fractions obtained from smokehouse smoke condensates // *Food Chem. Toxicol.* – 1982. – Vol. 20, № 4. – P. 383-391.
18. *Putnam K. P., Bombick D. W., Avalos J. T. and Doolittle D. J.* Comparison of the cytotoxic and mutagenic potential of liquid smoke food flavourings, cigarette smoke condensate and wood smoke condensate // *Food Chem. Toxicol.* – 1999. – Vol. 37, № 11. – P. 1113-1118.
19. *Sarkar S., Nagabhushan M., Soman C.S. et al.* Mutagenicity and carcinogenicity of smoked meat from Nagaland, a region of India prone to a high incidence of nasopharyngeal cancer // *Carcinogenesis.* - 1989. – Vol. 10, № 4. - P. 733-736.
20. *Yabiku H.Y., Martins M.S., Takahashi M.Y.* Levels of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavour and some smoked foods // *Food. Addit. Contam.* - 1993. - Vol. 10, № 4. – P. 399-405.

Резюме

Коротко висвітлена проблема контамінації м'ясопродуктів при їхньому копченні. Розглядаються два типи копчення: традиційне - копильним димом, і бездимне – копильними препаратами. Наводяться дані з потенційної мутагенної і канцерогенної дії копчених продуктів, копильних препаратів і конденсатів копильного диму та дані по вмісту в них бенз(а)пірену та інших поліциклічних ароматичних вуглеводнів.

Коротко освещена проблема контаминации мясопродуктов при их копчении. Рассматриваются два типа копчения: традиционное – копильным дымом, и бездымное – копильными препаратами. Приводятся данные по потенциальному мутагенному и канцерогенному действию копченых продуктов, копильных препаратов и конденсатов копильного дыма и данные по содержанию в них бенз(а)пирена и других полициклических ароматических углеводородов.

The problem of meat products contamination during their smoking has been briefly reported. Two types of smoking have been discussed: traditional smoking and smoking with using smoke flavourings. The data concerning potential mutagenic and carcinogenic activity of smoked products, smoke flavourings and wood smoke condensates have been cited. Additionally there is information about the contents of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in mentioned samples.

ТРЕТЯК Б.І., ЗАСТАВНА Д. В., МАКУХ Г. В.

ДУ «Інститут спадкової патології АМНУ»

Україна, 79000, Львів, вул. Лисенка, 31а, e-mail: irynej@ukr.net

ДЕЛЕЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ SMN ТА NAIP У ПАЦІЄНТІВ З РІЗНИМИ ТИПАМИ СПІНАЛЬНОЇ М'ЯЗОВОЇ АТРОФІЇ ІЗ ЗАХІДНОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ

Спінальна м'язова атрофія (СМА) – це поліморфна група найбільш частих нервово-мязових хвороб, які характеризується дегенерацією мотонейронів передніх рогів спинного мозку. Клінічні форми СМА визначаються за критеріями глибини порушень функцій руху та часу маніфестації хвороби. Міжнародний консорціум затвердив наступну класифікацію СМА: тип I – хвороба Вердніга-Гоффмана, це – найважчий тип СМА, проявляється в перші 6 місяців життя і призводить до смерті на протязі перших двох років життя; тип II – проміжна форма, дебют хвороби відбувається до 18 місяців життя, пацієнти можуть сидіти, але не можуть стояти та ходити і живуть більше чотирьох років; тип III – хвороба Кугельберга-Веландера – найм'якший тип СМА, коли прогресуюча м'язова слабкість проявляється після двох років життя.[1]. Щодо III типу СМА, то час її маніфестації може коливатися в діапазоні від двох до 30 років і старше. Тому, за пропозицією *K. Zerres*. [2] СМА III типу можна умовно розділити на дві підгрупи: на підгрупу А з маніфестацією хвороби до трьох років і підгрупу В з маніфестацією хвороби від трьох до тридцяти років, а також створити в класифікації новий тип СМА – СМА IV типу при маніфестації хвороби старше 30 років.

СМА – це спадкова хвороба з аутосомно-рецесивним типом успадкування. Середня частота усіх форм СМА складає 1:6000 - 1:10000 дітей. Виключення складають регіони, в яких описано виражене накопичення СМА, до них належать популяції з високими показниками інбридінгу: Бенгазі, Лівія, караїми в Ізраїлі, араби в Кувейті і популяції, в яких підвищення частоти СМА зумовлено ефектом родоначальника. Так у Канаді і на о. Реюньйон, де від однієї пари європейців походять 13 сімей, виявлено 38 пацієнтів з хворобою Вердніга - Гоффмана [3,4,5].

При СМА всіх типів виявляються делеції (чи інші зміни) в декількох генах в ділянці 5q13. Серед цих генів найбільш вивченими є гени SMN та NAIP[6]. Ген SMN (survival motor neurons), картованого в локусі D5S125(5q13), ідентифіковано методом позиційного клонування. Він має розмір 20000 п.н., складається з 8 екзонів, мРНК гена містить 1700 п.н. і кодує білок із 294 амінокислотних залишків з молекулярною вагою 32 КілоДальтони. Делеції у гені SMN були виявлені у хворих на СМА з частотою 80-98%, в залежності від типу СМА та етнічного походження пацієнтів [7]. Ген SMN включає ген SMN1 і його високогомологічну центромерну копію SMN2, яку ще називають геном sBCD541. Виявлено всього п'ять відмінностей між генами SMN1 та sBCD541. Дані два гени можна розрізнити шляхом ампліфікації 7-го та 8-го екзонів з подальшим використанням методу SSCP аналізу, або ж розщеплення продуктів ПЛР ендонуклеазами рестрикції. Поблизу теломерного кінця гена SMN ідентифікований ген NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), який кодує білок інгібітор неврального апоптозу [7]. Гомозиготні делеції 5 та 6 екзонів гена NAIP були виявлені із частотою 27-37% у хворих на СМА. Здебільшого дані делеції зустрічались у хворих на важкий тип I СМА – хворобу Вердніга-Гоффмана. [7].

Метою даної роботи було проведення делеційного аналізу генів SMN1 та NAIP у пацієнтів з спінальною м'язовою атрофією із західного регіону України.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були зразки ДНК, виділені з лейкоцитів периферійної крові дітей хворих на спінальну м'язову атрофію, що проходили медико-

генетичне консультування у Львівському ММГЦ ДУ «Інституту спадкової патології АМН України». Виділення та очистку ДНК із лейкоцитів периферійної крові проводили методом ферментативного розщеплення та подальшої фенольної екстракції, або методом висолювання. Молекулярно-генетичний аналіз делецій проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на приладі “Терцик” (“ДНК-технологии”, Росія) з використанням реактивів, олігонуклеотидних послідовностей та ендонуклеази рестрикції (“МВІ Fermentas”). Для отримання продукту ампліфікації нами були використані олігонуклеотидні праймери: для 7-го екзона гена SMN - R111 541 та X7-Dra; для 8-го екзона гена SMN - 541 C960 та 541 C1120 ; для ампліфікації послідовності 5 екзона гена NAIP – 1863 і 1864. [8] У випадку аналізу делецій 7-го та 8-го екзонів гена SMN після закінчення ПЛР відбиралась 5 мкл проби, і аналізували на наявність продуктів ампліфікації за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. У випадку наявності ПЛР продукту до зразка додавали по 10 о.а. ендонуклеази рестрикції DraI (для аналізу делеції 7-го екзону) чи DdeI (для аналізу делеції 8-го екзону) та інкубували при 37 С на протязі ночі. Продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. Продукти ампліфікації 5-го екзона гена NAIP аналізували з допомогою мультилокусної ПЛР та подальшого електрофорезу в 2 % агарозному гелі, в якості контролю використовували продукт ампліфікації 13-го екзона гена NAIP .

Результати та обговорення

Делеційний аналіз генів SMN та NAIP проводили у 35 хворих на СМА. За клінічними проявами та часом маніфестації хвороби пацієнти були розділені на три групи. В першу групу увійшло 9 дітей до 2-х років із хворобою Верднига-Гоффмана (СМА I типу), в другу – 23 дітей 2-4-річного віку зі СМА II типу, в третю – 3 пацієнти 12-,20- та 27 - річного віку з пізньою маніфестацією СМА III типу.

Перш за все слід зазначити, що продукти ампліфікації 7-екзона генів SMN1 та сBCD541 (т.з. псевдоген) мають однаковий розмір. Відрізнити їх можна завдяки тому, що у продукті ампліфікації 7-го екзона гена сBCD541 наявний сайт впізнавання рестрикції рестриктази DraI, який утворюється олігонуклеотидним праймером X7-Dra з одним помилковим нуклеотидом [9] і розщепляється даною рестриктазою на два фрагменти. Ці два фрагменти відрізняються між собою на 12 п.н. У зразках ДНК хворих на СМА з гомозиготною делецією 7-го екзона гена SMN візуалізується тільки рестрикційний фрагмент, який відповідає 7-му екзону гена сBCD541. У пробандів, в яких є хоч по одній копії генів SMN1 та сBCD541, візуалізуються як рестрикований 176 п.н., так і не рестрикований 188 п.н., продукти ампліфікації. Тобто, при застосуванні даного методу делеційного аналізу ми оцінювали як ген SMN1, так і його високогомологічну центромерну копію псевдоген сBCD541. В усіх обстежених пацієнтів виявлено сBCD541-псевдоген. Нище в таблиці приводяться результати виявлених делецій екзону 7 гена SMN як окремо, так і в компаунді з делецією екзона 8 гена SMN1 і в компаунді з делецією екзона 8 та екзона 5 гена NAIP.

Таблиця

Делеційний аналіз генів SMN1 та NAIP у пацієнтів зі СМА.

Генотип	Клінічний тип СМА		
	I (n-9)	II (n-23)	III (n-3)
Делеції екзонів 7, 8 SMN1 та екзона 5 NAIP	4* (44,4 %**)	0 (0 %)	1 (33,3 %)
Делеції екзонов 7, 8 SMN1	3 (33,3 %)	5 (21,7 %)	0 (0 %)
Делеції екзона 7 SMN1	1 (11,1 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Делецій не виявлено	1 (11,1 %)	18 (78,3 %)	2 (66,7 %)

Примітки: *- абсолютні значення,

** - відсоток виявлених делецій в даній досліджуваній групі.

Отже, отримані результати засвідчили, що серед 35 пробандів делецію 7 екзона гена SMN1 у гомозиготному стані виявлено у 13 пробандів, що складає 40%. Гомозиготну делецію 8 – екзона гена SMN1 виявляли тільки у компаунді з делецією 7 екзона, і це стосувалося 7 пацієнтів зі СМА типу I, 5 пацієнтів зі СМА типу II та одного пацієнта зі СМА типу III. Тобто, делецію екзона 8 гена SMN1 назагал виявлено у 37% обстежених пацієнтів. А делеція екзону 5 гена NAIP була виявлена лише у компаунді з делеціями 7-го та 8-го екзонів гена SMN1 і її частота складала 14%.

Підсумовуючи отримані результати, очевидно, що біля 89% пацієнтів із хворобою Вердніга-Гоффмана, або СМА I типу, мають делеції 7,8 екзонів гена SMN1 та екзона 5 гена NAIP, які знаходяться в ділянці q13 хромосоми 5. При спінальній м'язовій атрофії II і III типів такі делеції у районі 5 q13 виявлені у 23% пацієнтів. Тобто, виявлені делеції асоційовані з особливо важкими проявами СМА. Отримані результати молекулярно-генетичного дослідження пацієнтів з підозрою на СМА із західного регіону України принципово співпадають із результатами інших досліджень.

Висновки:

1. Делеційний аналіз мутацій генів SMN1 та NAIP регіону 5q13 забезпечує коректну молекулярно-генетичну діагностику спінальної м'язової атрофії.
2. Отримані результати показали, що делеції 7,8 екзонів гена SMN1 та екзона 5 гена NAIP супроводжуються важкими клінічними проявами СМА.

Роботу виконано при фінансовому сприянні Західно-Українського Біо-Медичного Дослідницького Центру підтримки молодих вчених (WUBMRC).

Література

1. Munsat TL, Davies KE. Workshop report: International SMA consortium meeting.// *Neuromuscul Disord.* -1992. № 2. – P. 423-428.
2. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S. Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications.// *Arch Neurol.* -1995. – vol. 52, № 5. – P.518-23.
3. Fried K, Mundel G. High incidence of spinal muscular atrophy type I (Werdnig-Hoffmann disease) in the Karaite community in Israel.// *Clin Genet.* -1977. - vol.12, № 4. - P.250-1.
4. Teebi AS. Autosomal recessive disorders among Arabs: an overview from Kuwait. // *J Med Genet.* -1994.-vol 31, № 3.- P.224-33.
5. Pascalet-Guidon MJ, Bois E, Feingold J, Mattei JF, Combes JC, Hamon C. Cluster of acute infantile spinal muscular atrophy (Werdnig-Hoffmann disease) in a limited area of Reunion Island.// *Clin Genet.* -1984. –vol.26, № 1.-P.39-42.
6. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. // *Cell.* -1995.- vol.80, № 1.- P.55-65.
7. Roy, N., Mahadevan, M.S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, M., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., et al.,. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy.// *Cell.* -1995.- vol 80. № 1.-P.167-178.
8. Экишиян А.Ю., Лившиц Л.А., Бычкова А.М. Молекулярно-генетический анализ спинальной мышечной атрофии (СМА) в семьях высокого риска из разных регионов Украины. *Циология и генетика.*– Киев.-1997.-Т 31. №6. -75-80.
9. Van der Steege, G., Draaijers, T.G., Grootsholten, P.M., Osinga, J., Anzevino, R., Velonà, I., Den Dunnen, J.T., Scheffer, H., Brahe, C., van Ommen, G.J.B. and Buys, C.H.C.M. A provisional transcript map of the spinal muscular atrophy (SMA) critical region.// *Eur. J. Hum. Genet.* -1995. - vol. 3. – P.87-95.

Резюме

Наведено результати делеційного аналізу 7-го та 8-го екзонів гена SMN1 і 5-го екзона гена NAIP у пробандів з I,II, III типами СМА із західного регіону України.

Результати досліджень показали, що делеції 7,8 екзонів гена SMN та екзона 5 гена NAIP супроводжуються важкими клінічними проявами СМА.

Приведены результаты делеционного анализа 7-го и 8-го экзонов гена SMN и 5-го экзона гена NAIP в пробандов с I, II, III типами СМА из западного региона Украины. Результаты исследований показали, что делеции 7,8 экзонов гена SMN и экзона 5 гена NAIP сопровождаются тяжелыми клиническими проявлениями СМА.

It is shown the results of 7 and 8 exons of SMN gene and 5 exon of NAIP gene deletion analysis among probands with I, II, III types of SMA from the west Ukrainian region. The results revealed that deletions of the SMN gene 7 and 8 exons and 5 exon of NAIP gene were detected among the patients with heavy clinical symptoms of SMA.

**ТЫЖНЕНКО Т.В.¹, КАРАЧЕНЦЕВ Ю.И.¹, ПОЧЕРНЯЕВ А.К.¹,
ГОРШУНСКАЯ М.Ю.², АТРАМЕНТОВА Л.А.^{1,3}, КРАВЧУН Н.А.¹ ПОЛТОРАК В.В.¹**

¹ ГУ “Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины”, Украина, 61002, Харьков, ул. Артёма, 10;

² Харьковская медицинская академия последипломного образования Украина, 61176, Харьков, ул. Корчагинцев, 58;

³ Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина Украина, 61077, Харьков, пл.Свободы, 4. E-mail: wshkoda23@rambler.ru

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ПО ЛОКУСАМ *PON1* И *APM1* В ГРУППЕ ДОНОРОВ НАСЕЛЕНИЯ ХАРЬКОВА

Эндокринные и сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее многочисленными в группе так называемых «болезней цивилизации», поэтому поиск их маркеров и кандидатных генов – актуальная задача медицинской генетики. В связи именно с этой проблемой интенсивно исследуются полиморфизмы гена параоксоназы *PON-1* и гена адипонектина *APM1*.

Ген параоксоназы локализован на седьмой хромосоме (7q21–22) [1]. Его продукт – фермент параоксоназа проявляет активность по отношению к широкому спектру субстратов, участвуя в детоксикации органофосфатов, предупреждая атерогенные модификации липопротеинов низкой и высокой плотности [2-4]. Известны различные полиморфизмы *PON-1*, приводящие к изменению активности параоксоназы. Один из них – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP) *PON-1* представляет собой несинонимическую замену Q192R SNP в Region Ex6+78A>G [1]. Полиморфизм *PON-1* 192 неодинаково представлен в разных популяциях и по-разному ассоциирован с сердечно-сосудистыми и эндокринными заболеваниями [5-7].

Ген адипонектина *APM1*, находится на третьей хромосоме в локусе 3q27 [8, 9, 10]. Ему отводится роль кандидатного гена сахарного диабета 2-го типа [11], так как продукт этого гена – гормон адипонектин, модулируя чувствительность к инсулину, участвует в регуляции инсулинорезистентности [8, 12–14]. Как показано на ряде этнических групп и популяций, однонуклеотидный полиморфизм, представляющий собой замену гуанина (G) на тимин (T) во втором интроне (SNP +276G>T (регион IVS2+62G>T)), наиболее тесно, ассоциирован с заболеванием.

Несовпадение результатов относительно ассоциаций генов с заболеваниями [12, 15-18] вызывает дискуссии среди учёных, в которых высказываются различные соображения относительно источников разногласий. Одной из причин несогласованности результатов называют статистическую флуктуацию, связанную с размером выборок, статистические погрешности, связанные с эффектом множественных сравнений, работой на смещённых выборках. В качестве другой

причины называют несопоставимость характеристики генофондов у представителей разных этнических групп и популяций, не учёт пола и возраста обследованных. Считается также, что помехи могут быть связаны с неодинаковой семейной историей обследованных. Кроме того, могут не совпадать критерии при формировании контрольной группы.

Связь полиморфизма генов с особенностями метаболизма обычно изучают на группах больных, поэтому данных о распределении полиморфизмов в общих популяциях немного. Между тем, информация о региональной частоте аллелей и генотипов является той базой, на которой строится система генетического прогнозирования и первичной профилактики. Всё изложенное определило цель данного исследования: сравнить распределение генотипов в выборке из населения Харькова по двум аутосомным генам *PON1* и *APM1*.

Материалы и методы

Образцы крови и генеалогические данные 109 доноров были получены на Харьковской областной станции службы крови с их письменного согласия. ДНК выделена из лейкоцитов при помощи ионообменной смолы *Челекс-100 (ChelexR100)* [19]. Однонуклеотидную замену, которая ведет к изменению в аминокислотной последовательности параоксоназы в позиции 192 с глутамина на аргинин, определяли путём амплификации в полимеразной цепной реакции фрагмента гена размером 199 пар нуклеотидов с последующим гидролизом эндонуклеазой *BspPI*. Были использованы прямой (*PON192F TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG*) и обратный (*PON192R GACATACTTGCCATCGGGTGAA*) праймеры [20]. Определяли также однонуклеотидную замену, локализованную во 2 интроне гена адипонектина (SNP +276G>T). Был использован прямой (*APM276F GGCCTCTTTCATCACAGACC*) и обратный (*APM276R AGATGCAGCAAAGCCAAAGT*) праймеры и эндонуклеаза *SmaI* [21]. В качестве маркера молекулярной массы была использована ДНК *pUC19*, гидролизованная эндонуклеазой *MspI*. Разделение фрагментов ДНК после рестрикции проводили с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле.

Проверка статистических гипотез о соответствии фактического и теоретического распределений проведена с помощью критерия χ^2 на уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В изученной группе по гену *PON1* частота аллеля *Q* составляет 0,67, аллеля *R* – 0,33. Распределение генотипов значимо не отличается от соотношения, характерного для панмиктической популяции. В этой же группе частоты аллелей гена *APM1* составили для *T* и *G* соответственно 0,55 и 0,45. По этому гену фактическое соотношение генотипов с теоретически ожидаемым не совпало (табл.1). Удельный вес гетерозигот *TG* оказался 1,55 раз больше, а число гомозигот меньше, чем при панмиксии (*TT* составляет 0,55, а *GG* 0,33 от теоретически ожидаемого).

Таблица 1

Распределение генотипов

Локус	Генотипы	Количество		Статистики
		фактическое	теоретическое	
<i>PON1</i>	<i>QQ</i>	47	49,38	$\chi^2 = 1,44; \chi^2_{st} = 3,84; df = 1; p > 0,05$
	<i>QR</i>	53	48,64	
	<i>RR</i>	9	11,98	
<i>APM1</i>	<i>TT</i>	17	31,16	$\chi^2 = 31,0; \chi^2_{st} = 3,84; df = 1; p < 0,001$
	<i>TG</i>	79	50,98	
	<i>GG</i>	7	20,86	

Примечание: χ^2 и χ^2_{st} – фактическое и пороговое значение критерия, *df* - число степеней свободы, *p* – уровень значимости

В качестве обсуждения причин, по которым изученная группа оказалась смещённой от состояния равновесия, можно выдвинуть следующие причины. Одна из них – отбор в пользу гетерозигот. Учитывая, что в современном населении Харькова до взрослого состояния доживает почти 98 % родившихся [22], можно предположить, что такой отбор происходит пренатально и осуществляется путём элиминации гомозигот или избирательного гетерогамного оплодотворения по локусу *APM1*. К избытку гетерозигот может приводить и отрицательная брачная ассортативность по признакам, сопряжённым с анализируемым геном. Нельзя исключить также и то, что наблюдаемый эффект может быть связан с особенностью формирования группы. Дело в том, что группа в строгом смысле не может считаться репрезентативной выборкой населения, поскольку формировалась из доноров крови, к здоровью которых, как известно, предъявляются довольно жёсткие требования. Возможно, по этой причине в выборку не попала часть населения с ослабленным здоровьем. Такая ситуация возможна, если ген *APM1* действительно ассоциирован с заболеваниями, по которым определяется пригодность к донорству. В этом случае в выборку с большей вероятностью попадают люди с более крепким здоровьем, что часто сопряжено с повышенной гетерозиготностью.

Выводы. Различия в структуре популяции по указанным локусам могут указывать на их неодинаковую эволюционно-генетическую роль в патогенезе эндокринных и сердечно-сосудистых заболеваний. Хотя высказанные предположения ещё ждут экспериментальной проверки, найденные популяционно-генетические характеристики уже могут быть использованы в качестве отправной точки при поиске молекулярных маркёров наследственной предрасположенности к таким заболеваниям как сахарный диабет 2 типа, атеросклероз, метаболический синдром и ассоциированное с ним ожирение, в основе которых лежит инсулинорезистентность (формирование последней так или иначе связано с параоксоназой или адипонектином).

Литература

1. *GenBank*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. GenBank is the NIH genetic sequence database, an annotated collection of all publicly available DNA sequences.
2. Mackness M.I., Arrol S., Abbot C., Durrington P.N. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase // *Atherosclerosis*. – 1993. – Vol.104. – P.129-135.
3. Горшунська М.Ю. Активність параоксонази у жінок, хворих на цукровий діабет 2 типу: кореляція з параметрами оксидативного стресу, ліпідного профілю та глікемічного контролю // *Ендокринологія*. – 2001. – Т.6., № 2. – С. 160-165.
4. Draganov. D.I., La Du B.N. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review // *Naunyn Schmiedelberg Arch. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 369. – P.78-88.
5. Antikainen M., Murtomaki S., Syvanne M. et. al. The Gln-Arg 191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns // *J. Clin. Invest.* – 1996. – Vol. 98. – P.883-885.
6. Huang Q., Lui Y.H., Yang Q.D. et. al. Human serum paraoxonase gene polymorphism, Q192R and L55M, are not associated with the risk of cerebral infarction in Chinese Han population // *Neurol. Res.* – 2006. – Vol. 28(5). – P. 549-554.
7. Sanghera D.K., Saha N., Aston C.E., Kamboh M.I. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 1997. – Vol. 17(6). – P. 1067 - 1073.
8. 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.
9. Mackness M.I., Mackness P.N., Durrington P.W. et. al. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins // *Curr. Opin. Lipidol.* – 1996. – Vol.7. – P.69-76.

10. *Dursun P., Demirta E., Bayrak A., Yarali H.* Decreased serum paraoxonase 1 (PON1) activity: an additional risk factor for atherosclerotic heart disease in patients with PCOS? // *Human Reproduction*. – 2006. – Vol. 21(1). – P.104-108.
11. *Kissenbah, Sonnenberg, Myklebust J et.al.* Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2000. – V. 97. – P. 144478-14483.
12. *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.
13. *Menzaghi C., Ercolo T., Paola R.D 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.
14. *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.
15. *Vasseur F., Helbecque N., Dina C., et al.* Single-nucleotide polymorphism haplotypes in both proximal promoter and exon 3 of the *APM1* gene modulate adipocyte-secreted adiponectinhormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians // *Hum Mol Genet*. – 2002. – V.11. P. 2607-2614.
16. *Ohashi K., Ouchi N., Kihara S., et.al.* Adiponectin 1164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease // *J Am Coll Cardiol*. – 2004. – P. 1195-2000.
17. *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.
18. *Tso A.W.K, P.C.Sham, N.M.S. Wat, A.Xu, B.M.Y.Cheung, R.Rong, C.H.Y.Fong, J.Y.Xu, K.K.Y.Cheng, E.D.Janus, K.S.L.Lam.* Polymorphism of the gene encoding adiponectin and outcome of Chinese subjects with impaired glucose tolerance: a 5-year follow-up study // *Diabetologia*. – 2006. – V. 49. – P.1806-1815.
19. *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
20. *Ombres D., Pannitteri G., Montali A. et. al.* Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene is not associated with coronary artery disease in Italian patients // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. – 1998. –Vol.18. – P.1611–1616.
21. *Pollin T. I., Tanner K., O'Connell J. R. et al.* Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by assosiation with variation in the *APM1* gene // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54. – P. 268–274.
22. Людський розвиток в Україні: інноваційний вимір/ За ред. Лібанова. К.: Інститут демографічних та соціальних досліджень, 2008. – 315 с.

Резюме

Собрана информация о 109 практически здоровых жителей г. Харькова. Частота аллеля *Q* гена параоксоназы среди здоровых жителей составляет 0,67; частота аллеля *R* – 0,33. Распределение генотипов значимо не отличается от равновесного соотношения. В этой же группе частоты аллелей гена адипонектина для *T* и *G* соответственно 0,55 и 0,45. Гетерозигот *TG* оказалось в 1,55 раз больше, а гомозигот в 2 раза меньше, чем при панмиксии.

Зібрана інформація про 109 практично здорових мешканців м. Харкова. Частота алеля *Q* гена параоксонази серед здорових мешканців складає 0,67 частота алеля *R* – 0,33. Розподіл генотипів значущо не відрізняється від рівноважного співвідношення. В цій же групі частоти алелей гена адипонектину для *T* і *G* відповідно 0,55 і 0,45. Гетерозигот *TG* виявилось в 1,55 раз більше, а гомозигот у 2 рази менше ніж при панміксії.

The data about 109 practically healthy Kharkov habitants were collected. Frequency of *Q* allele of paraoxonase gene is 0,67; frequency of *R* allele - 0,33 among healthy habitants. Distributing of genotype

frequencies did not deviate from equilibrium. In the same group frequency of alleles adiponektin gene for T and G was 0,55 and 0,45 correspondingly. Heterozygotes TG were 1,55-fold higher than in panmictic population; on the contrary, homozygotes were twice lower.

ЧЕРЕДНИК Ю.А.¹, КУЗЬМИН А.В.², ЧЕРНОУСОВА Л.Н.², АНОПРИЕНКО О.В.³, ГОРОВЕНКО Н.Г.⁴, КОСТРОМИНА В.П.¹, БЕЛОГОРЦЕВА О.И.¹

¹*Институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф.Г. Яновского АМН Украины, ул. Н. Амосова, 10, г. Киев, 03680, Украина.*

²*Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАМН, г. Москва, Россия.*

³*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Заболотного, 150, г. Киев, 03143, Украина.*

⁴*Киевская Медицинская Академия последипломного образования им. Шупика П.Л. МЗ Украины, ул. Дорогожичская, 9, г. Киев, 03112, Украина.*

E-mail: yurach@ukr.net

ДНК-ДИАГНОСТИКА И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ *M.tuberculosis* У ДЕТЕЙ С ЛЕГОЧНОЙ ФОРМОЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

По данным ВОЗ за последние несколько лет заболеваемость туберкулезом среди взрослого населения выросла в несколько раз. Ежегодно в мире туберкулезом заболевает свыше 8 млн. человек, и более 2 млн. человек умирает от этой болезни. В Украине каждый год от туберкулеза умирает свыше 10 тысяч человек. Отмечено увеличение количества случаев заболевания у лиц с впервые выявленным туберкулезом, среди которых каждым девятым больным является ребенок [1]. Растет число больных детей разных возрастных групп с преобладанием острых, быстро прогрессирующих деструктивных процессов.

Отсутствие «золотого стандарта» лабораторной диагностики туберкулеза у детей делает необходимым разработку и применение новых современных диагностических процедур, поскольку традиционные методы диагностики туберкулеза, такие как бактериоскопический и культуральный характеризуются продолжительностью выявления МБТ, недостаточной специфичностью и чувствительностью. Так, с помощью бактериоскопии выявляется лишь 10-15% детей с вероятным диагнозом туберкулез, и 30-40% с помощью культурального метода [2]. В последнее время для повышения эффективности лабораторной диагностики туберкулеза разработан целый ряд новых микробиологических, иммунологических и молекулярно-генетических методов. К наиболее перспективным относятся в первую очередь подходы, основанные на использовании техники ПЦР.

Имеющиеся данные по применению ПЦР для диагностики туберкулеза у детей демонстрируют различные результаты проводимых исследований [1]. Некоторые исследователи отмечают низкую чувствительность ПЦР-тестов у детей, что не позволяет исключить диагноз туберкулез в случае отрицательного анализа. Проблема недостаточной специфичности ПЦР проявляет себя в тех регионах, где ТБ – эндемическое заболевание и латентная инфекция *M.tuberculosis* (МБТ) является обычной [2]. Тем не менее, ряд подходов с использованием ПЦР, демонстрируют хорошие результаты, которые позволяют более эффективно использовать ПЦР процедуру для диагностики ТБ у детей [3, 4]. Методы на основе ПЦР являются незаменимыми для быстрого выявления микобактерий туберкулеза их идентификации на уровне вида и штамма, изучения эпидемиологических путей распространения инфекции с помощью генотипирования микобактерий, определения мутаций, ответственных за лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам (АМБП). Применение новых микрочип-технологий для решения данных задач

позволит автоматизировать и значительно сократить сроки проведения диагностической процедуры за счет высокой чувствительности и возможности одновременного проведения нескольких реакций на одном чипе [5].

Целью работы является оценка эффективности быстрого выявления МБТ в клиническом материале и определение генотипических характеристик *M.tuberculosis* у детей с легочной формой туберкулеза молекулярно-биологическими ПЦР-диагностическими и методами микрочип-детекции на протяжении комплексной антимикобактериальной терапии.

Материалы и методы

Исследование было выполнено на образцах 60 детей (мокрота, венозная кровь, изоляты) с впервые диагностированным легочным туберкулезом, которые проходили лечение в ИФП в течение 2007-2008 годов. 36 пациентов составляли девочки и 24 – мальчики, средний возраст составлял $14,4 \pm 0,3$ года. Образцы анализировали классическим микроскопическим и микробиологическими методами, а также методом ПЦР-диагностики, при поступлении в стационар до начала лечения, через два месяца после начала терапии и после клинического выздоровления.

ПЦР-положительные образцы мокроты, отобранные при поступлении больного, анализировали на биологических микрочипах для сполиготипирования (DR-микрочип) и определения устойчивости к фторхинолонам (ТБ-Биочип-2), разработанных в ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН. Работа проводилась на базе ЦНИИТ РАМН согласно инструкциям разработчиков.

Результаты и обсуждение

Преобладание первичных форм легочного туберкулеза среди детей в исследуемой группе сказывалось на низком проценте бактериовыделителей. Частота обнаружения *M.tuberculosis* традиционными методами в начале терапии составляла $20,3 \pm 4,4\%$. Результаты обнаружения МБТ в клинических образцах методом ПЦР – $48,3 \pm 6,9\%$ в крови и $51,7 \pm 7,1\%$ в промывных водах бронхов. Частота обнаружения МБТ спустя два месяца после начала терапии ПЦР-тестом, составляла $23,3 \pm 4,7\%$ в обоих образцах, что на 16,6 % выше, чем традиционными методами – $5,7 \pm 2,4\%$ случаев. В конечной точке терапии ПЦР обнаруживал МБТ в $3,3 \pm 1,3\%$ препаратов крови и $10,0 \pm 2,9\%$ респираторных образцов (в 3,07 раза больше ($P < 0,05$)), а традиционные микроскопический и микробиологический методы не выявляли МБТ.

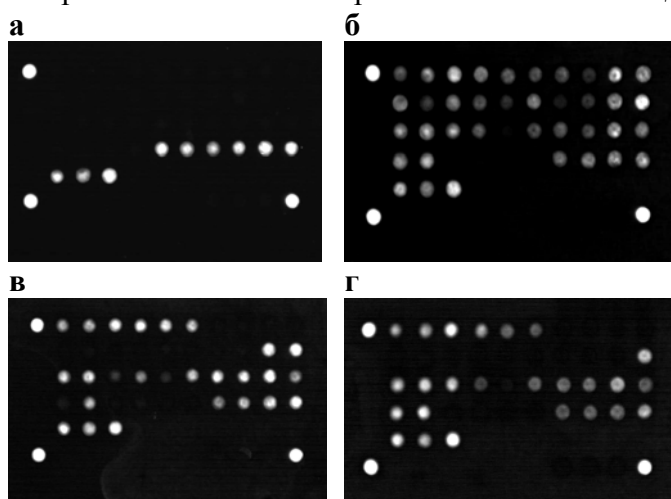


Рисунок 1. Результаты сполиготипирования некоторых изолятов, полученных из клинического материала детей с ТБОД. а – распределение точек гибридизации, характерное для штамма МБТ Beijing $\Delta 1-34$; б – подтип МБТ T1, с отсутствующим районом с 33 по 36 спейсер, обозначаемым F; в – штамм МБТ $\Delta 7-17$ и E (делеция 31 спейсера и F); г – подтип МБТ $\Delta 7-19$ и F.

Характеристика штаммов МБТ, выявленных в клинических образцах детей больных туберкулезом, была выполнена методом сполиготипирования (от англ. spacer oligonucleotide typing), основанного на ПЦР и последующей гибридизации ПЦР-продуктов с зондами, соответствующими спейсерным участкам локуса прямых повторов (DR) генома микобактерий [6]. Преимуществом метода сполиготипирования является возможность одновременной детекции возбудителя, причем анализ может выполняться непосредственно на клиническом образце без предварительного

подращивания культуры, а также способность дискриминировать штаммы микобактерий туберкулезного комплекса *M. tuberculosis* и *M. bovis*, что представляет серьезные трудности при использовании традиционных культуральных методов, особенно, при диагностике детского туберкулеза.

Локус DR представляет собой многократно повторяющиеся идентичные участки длиной 36 п.н., между которыми расположены уникальные спейсерные последовательности длиной от 24 до 41 н.п. Различные штаммы характеризуются наличием разного числа таких спейсерных последовательностей, что позволяет определять происхождение штамма и проводить эпидемиологические исследования. Метод был изначально предложен для внутривидового типирования *M. tuberculosis* [7], а впоследствии успешно распространен на штаммы *M. bovis*. Проведенные исследования позволили создать в разных странах обширные локальные коллекции и базы данных сполиготипов штаммов МБТ. Несмотря на меньшую дискриминирующую способность по сравнению с другими общепринятыми методами типирования [8, 9], дешевизна метода, простота его выполнения и интерпретации получаемых гибридационных профилей являются несомненными преимуществами. Для увеличения дискриминирующей способности существующего теста, включающего 43 спейсерные последовательности, был разработан расширенный вариант, содержащий 94 олигонуклеотида [10]. Существует также возможность проведения типирования в лаборатории без использования коммерческого теста, что уменьшает стоимость, но увеличивает время проведения анализа. Кроме того, чувствительность такого варианта на сегодня уже недостаточна. Применение новых технологий микрочипов позволяет при высокой чувствительности максимально сократить время проведения анализа, автоматизировать его и минимизировать расход материалов.

Методом сполиготипирования на микрочипе были определены штаммы МБТ для 12 образцов, из которых 50% составлял тип Beijing (Пекинский). Для сполиготипа данного семейства характерным является отсутствие спейсеров с 1 по 34 ($\Delta 1-34$) (Рис 1. а). Среди штаммов "не-Пекинского" типа были выявлены штаммы T1, а также один уникальный штамм (Рис 1. б, в, г). Известно, что среди больных, которые выделяют МБТ семейства Beijing, достоверно чаще встречается резистентность к АМБП, эти штаммы неблагоприятно влияют на ход туберкулезного процесса, нормализацию интоксикационного синдрома и прекращение бактериовыделения. Полученные в результате исследования сполиготипы пополняют базу данных генотипов, которые распространены на территории Украины [9].

Увеличение количества штаммов МБТ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-МБТ), а также появление экстремально-устойчивых штаммов делает остро необходимой быструю диагностику лекарственной резистентности. Фторхинолоны являются эффективными антимикробными препаратами второго ряда противотуберкулезной терапии. Устойчивость к фторхинолонам у микобактерий чаще всего вызвана мутациями гена *gyrA*, хотя возможны мутации и в других районах, вызывающие низкую степень устойчивости. Ранее микрочипы были эффективно применены для выявления устойчивости к антибиотикам первого ряда [5, 11]. Проанализированные образцы клинического материала детей больных туберкулезом не выявили устойчивых штаммов, в отличие от контрольных изолятов взрослых больных с известной устойчивостью к фторхинолонам, выявившим мутации в позициях 90 и 94 аминокислот гена *gyrA*. По результатам определения чувствительности МБТ к фторхинолонам на микрочипах, а также с учётом анамнестических и клинкорентгенологических данных детей, больных туберкулезом лёгких, была назначена адекватная схема противотуберкулезной химиотерапии.

Выявление *M. tuberculosis* ПЦР-методами помогает диагностировать специфический процесс особенно в случаях, когда подтверждение этиологии болезни микроскопическими и микробиологическими методами невозможно. Тем не менее, чувствительность ПЦР-теста у детей ниже, чем у взрослых. Целесообразным является

продолжение поиска путей повышения информативности ПЦР с целью использования ее результатов в качестве контроля критерия бактериовыделения у детей. Также целесообразным является расширение базы данных генотипов МБТ, распространенных на территории Украины путем скрининга изолятов.

Литература

1. *Marais B.J., Gie R.P., Schaaf H.S., et al.* Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2006 – vol. 173, № 10. – P. 1078-1090.
2. *Marais B.J., Pai M.* Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis // *Arch. Dis. Child.* – 2007 – vol. 92. – P 446-452.
3. *Wolf H., Mendez M., Gilman R.H.* Diagnosis of pediatric pulmonary tuberculosis by stool PCR // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2008 – vol. 79, № 6 – P. 893-898.
4. *Kulkarni S.P., Jaleel M.A., Kadival G.V.* Evaluation of an in-house-developed PCR for the diagnosis of tuberculous meningitis in Indian children // *J. Med. Microbiol.* – 2005 – vol. 54 – P. 369-373.
5. *Gryadunov, V. Mikhailovich, S. Lapa, et al.* Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *Clin Microbiol Infect.* – 2005 – vol. 11 – P. 531-539.
6. *Hermans P.W., van Soolingen D., Bik E.M., et al.* Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains // *Infect Immun.* – 1991 – vol. 59, № 8 – P. 2695-7025.
7. *J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology // *J. Clin. Microbiol.* 1997. – vol. 35. – P. 907-914.
8. *Kremer K., van Soolingen D., Frothingham R., et al.* Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – vol. 37, № 8 – P. 2607-2618.
9. *Чередник Ю.А., Аноприенко О.В., Феценко Ю.И.* Молекулярно-генетическое типирование клинических изолятов *Mycobacterium tuberculosis* в Украине // *Український пульмонологічний журнал* – 2005 – № 4 – С. 66-68.
10. *Van der Zanden A. G. M., Kremer K., Schouls L. M., et al.* Improvement of Differentiation and Interpretability of Spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by Introduction of New Spacer Oligonucleotides // *J. Clin. Microbiol.* – 2002 – vol. 40 – P. 4628-4639.
11. *Denkin S., Volokhov D., Chizhikov V., Zhang Y.* Microarray-based *pncA* genotyping of pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Med. Microbiol.* – 2005 – vol. 54 – P. 1127-1131.

Резюме

Проведена оценка возможности быстрого выявления МБТ в клиническом материале и определение генотипических характеристик *M.tuberculosis* у детей с легочной формой туберкулеза молекулярно-биологическими PCR-диагностическими и методами микрочип-детекции на протяжении комплексной антимикобактериальной терапии.

Проведена оцінка можливості швидкого виявлення МБТ в клінічному матеріалі і визначення генотипових характеристик *M.tuberculosis* у дітей з легеневою формою туберкульозу молекулярно-біологічними PCR-діагностичними і методами мікрочіп-детекції впродовж комплексної антимікобактеріальної терапії.

Capability of fast TB pathogen detection in clinical specimens and genotypic characteristics of *M.tuberculosis* from children suffering from lung tuberculosis by PCR-diagnostic method and microchip-detection method during the course of complex antimycobacterial therapy is presented.

ШАПОШНИКОВА В. М.

*ДУ “Науковий центр радіаційної медицини АМН України”,
040050, Київ, вул. Мельникова, 53*

ЧАСТОТА ВРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ЧЕРКАСЬКОЇ ОБЛАСТІ

Питання вроджених вад розвитку та спадкової патології є на сьогодні досить актуальним та проблематичним в медицині та в суспільстві в цілому. За даними ряду авторів, фактори довкілля є причиною від 30 до 50% вроджених вад розвитку [3-5]. В Україні це питання постало особливо актуально після Чорнобильської катастрофи, внаслідок забруднення радіонуклідами значної території країни. В світовій та вітчизняній літературі, фіксуються різні статистичні показники частоти вроджених вад розвитку (12,6–40 на 1000 новонароджених). За висновками міжнародних та європейських організацій, які досліджують тенденції щодо вродженої та спадкової патології (International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring systems, EUROCAT) розбіжності у частоті та структурі цих вад можуть бути пов’язані з різними підходами до діагностики, різними стандартами дослідження, недостатнім фаховим рівнем лікарів з даного питання [2, 8]. За даними європейських дослідників (Франція, Іспанія, Угорщина, Польща) частота вроджених вад розвитку у новонароджених дітей в середньому становить 16–20:1000, хоча очікувана їх частота мала б бути значно вищою – 60:1000 [1-3, 8].

В Україні загальна поширеність вроджених вад розвитку у новонароджених має виражені регіональні відмінності, які пояснюють, переважно, різним рівнем забруднення довкілля [6-11]. Територія Черкаської області частково забруднена внаслідок аварії на ЧАЕС, насичена хімічними відходами та промисловими викидами. Метою роботи було проаналізувати динаміку частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007 рр., виявити регіональні відмінності в частоті цих патологій та взаємоз’язки з екологічним станом довкілля.

Матеріали і методи

В процесі дослідження використані дані медичної статистики закладів охорони здоров’я області, обласного центру медичної статистики, матеріали медико-генетичних консультацій, пологових будинків. Об’єктом дослідження були новонароджені в Черкаській області за 1997-2007 рр. Проаналізовано 3198 сповіщень про реєстрацію вроджених вад розвитку у пологових стаціонарах за 1997-2007 рр., розраховано частоту вроджених вад розвитку на 1000 народжених живими як по області в цілому, так і в радіаційно-забруднених та умовно «чистих» районах.

Результати та обговорення

Динаміка частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007рр. представлена в таблиці 1. Середня частота вроджених вад розвитку за досліджуваний період дорівнює 27,5 випадків на 1 000 н/н і є порівнюваною з рівнем, який спостерігається в Україні, а також в європейських популяціях [1, 2, 11].

Таблиця 1

Частота вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007рр.

Рік	Частота вроджених вад розвитку (на 1000 н/н)
1997	27,4

1998	29,7
1999	34,5
2000	30,0
2001	27,2
2002	25,7
2003	24,9
2004	29,4
2005	24,8
2006	22,4
2007	24,3
У середньому за 1997-2007 рр.	27,3

Порівняльний аналіз частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області, свідчить, що дані показники значною мірою коливаються і мають регіональні відмінності. Найвища частота вроджених вад розвитку спостерігалась у Канівському (55,8:1000 н/н) та Корсунь-Шевченківському (52,5:1000 н/н) районах. В той же час частота вроджених вад розвитку в Чернобаївському районі майже в чотири рази нижча і дорівнює 13,2 на 1 000 н/н. Якщо аналізувати райони, де цей показник не перевищує 20 випадків на 1 000 н/н, то такими районами є: Чигиринський, Кам'янський, Драбівський. Найбільша поширеність вроджених аномалій спостерігалась в Звенигородському, Канівському, Корсунь-Шевченківському, Маньківському, Уманському, Тальнівському районах. Такий діапазон розбіжностей може бути обумовлений різним рівнем забруднення, кількісною різницею у контингенті населення охопленого медико-генетичною допомогою (певне значення можуть мати відмінності ефективності пренатальної діагностики і своєчасного переривання вагітності у випадках наявності вроджених вад розвитку у плода).

Було проведено аналіз частоти вроджених вад розвитку та на рівні районів з різним ступенем забруднення (табл. 2). Найбільша кількість дітей по області з вродженими вадами розвитку народжується в містах: Умань (42,5:1000 н/н), Черкаси (37,4:1000 н/н), Сміла (36,7:1000 н/н) та в радіаційно-забруднених районах. Середній показник цієї патології на радіаційно-забруднених територіях Черкаської області складає – 33,2:1000 н/н, по умовно «чистих» районах – 21,9:1000 н/н.

Для з'ясування можливих причин регіональних відмінностей в частоті вроджених вад розвитку, було проаналізовано екологічний стан території Черкаської області. Найбільші рівні забруднення сформувалися в Канівському, Лисянському та Корсунь-Шевченківському районах. Результати дослідження свідчать про залежність між підвищеним рівнем забруднення району та збільшенням частоти вроджених вад розвитку.

Разом з тим, спостерігається динаміка зменшення частоти цих патологій по області за досліджуваний період (з 1997 по 2007 роки). Найбільша частота вроджених вад розвитку зареєстрована в 1999 році і дорівнювала 34,5 на 1000 н/н, найменша – в 2006 році (22,4 випадки на 1000 н/н).

Таблиця 2

Частота вроджених вад розвитку в районах Черкаської області з різним рівнем радіаційного забруднення

Райони області	В середньому за 1997-2007 рр.		
	кількість новонароджених	Кількість В ВР	Частота ВВР на 1000 н/н
Райони, які зазнали радіаційного забруднення:			
Городищенський*	3644	82	22,5
Жашківський*	3985	96	24,1

Звенигородський **	5088	229	45,0
К-Шевченківський **	5218	234	52,5
Канівський **	2096	117	55,8
Катеринопольський *	3675	86	23,4
Лисянський *	3875	93	24,0
Маньківський **	3436	158	46,0
Тальнівський *	4224	147	34,8
Уманський *	6062	154	25,4
Христинівський*	4071	103	25,3
Черкаський *	4960	185	37,3
Шполянський *	3881	92	23,7
Райони, які не зазнали радіаційного забруднення:			
Драбівський	3316	65	19,6
Золотоніський	4968	159	32,0
Кам'янський	4717	92	19,5
Монастирищенський	3905	91	23,3
Чорнобаївський	4015	53	13,2
Чигиринський	2690	46	17,1
Міста області:			
м.Черкаси	18342	686	37,4
м.Сміла	5122	188	36,7
м.Умань*	8285	348	42,0

** - рівень забруднення високий

* - рівень забруднення низький

Висновки

Частота вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007 рр. є аналогічною середньому значенню цього показника по Україні (27,3 та 26,0 на 1000 н/н відповідно). За досліджуваний період спостерігається динаміка зменшення частоти вроджених вад розвитку в області. Виявлені значні регіональні відмінності частоти вроджених вад розвитку в Черкаській області (13,2 - 55,8 на 1000 н/н). Середній показник цієї патології в радіаційно-забруднених районах більший (33,2:1000 н/н) ніж в умовно «чистих» (21,9:1000 н/н). Найбільша частота вроджених вад розвитку спостерігається в районах з підвищеним рівнем хімічного забруднення. В умовах підвищеного рівня вродженої патології в ряді районів області особливого значення набуває необхідність впровадження комплексних заходів ефективної профілактики: захисту населення від дії додаткових антропогенних чинників, вчасному медико-генетичному консультуванні і пренатальній діагностиці з використанням сучасних методів дослідження.

Література

1. *Klinberg M.A., Papier C.M., Jacob H.* Birth defects monitoring // *Am. J. Indust. Medicine.* – 1983. – № 4. – Р. 309-328.
2. *Congenital Malformations Worldwide: A Report from the International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring systems.* – Amsterdam, 1991. – 150 p.
3. Мониторинг врожденных пороков развития / Н.П. Бочков, Н.А. Жученко, Е.А. Кириллова и др. // *Рос. вестн. перинатологии и педиатрии.* – 1996. – № 2. – С. 20-24.
4. *Барияк І.Р.* Генетичний моніторинг і його роль у профілактиці спадкової патології та природжених вад розвитку у дітей // *Педіатрія, акушерство та гінекол.* – 1999. – № 4. – С. 147.

5. Лазюк Г.И. Облучение населения Беларуси вследствие аварии на Чернобыльской АЭС и динамика врожденных пороков развития. // Междунар. журн. радиац. медицины. – 1999. – № 1. – С. 63-70.
6. Барияк І.Р., Неумержицька Л.В., Свтушок Л.Є., Шкарупа В.М. Оцінка вроджених вад розвитку в північно-західному регіоні України // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць. – Київ. – 2008. – Т.4 – С. 358-362.
7. Волкова Г.С. Світовий дослід ведення реєстрів уроджених вад розвитку // Вісн. стоматології. – 1999. – № 2. – С. 59-61.
8. EUROCAT Report 7 / Scientific Institute of Public Health – Louis Pasteur – Brussels, 1997. – 181 p.
9. Кирилова Е.А., Никифорова О.К., Жученко Н.А. Мониторинг врожденных пороков развития у новорожденных // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии – 2000. – № 1. – С.18-21.
10. Минков И.П. Мониторинг врожденных пороков развития, их пренатальная диагностика, роль в патологии у детей и пути профилактики // Перинатология та педіатрія. – 2000. – №1. – С. 8-13.
11. Населення України, 2000 р. Статистичний щорічник. – К.: Держкомстат України, 2004. – 208 с.

Резюме

Частота вроджених вад розвитку в Черкаській області за період 1997-2007 рр. аналогічна середньому значенню цього показника по Україні (27,3 та 26,0 на 1000 н/н відповідно). Спостерігається динаміка зменшення частоти вроджених вад розвитку в області за досліджуваний період. Виявлені значні регіональні відмінності частоти вроджених вад розвитку в області (13,2 - 55,8 на 1000 н/н). Середній показник цієї патології в радіаційно-забруднених районах (33,2:1000 н/н) більший ніж в умовно «чистих» (21,9:1000 н/н). Найбільша частота вроджених вад розвитку виявлена в районах з підвищеним рівнем хімічного забруднення.

Частота врожденных пороков развития в Черкаской области за период 1997-2007 гг. аналогична среднему значению этого показателя по Украине (27,3 и 26,0 на 1000 н/р соответственно). Наблюдается динамика уменьшения частоты врожденных пороков развития в области за исследуемый период. Выявлены значительные региональные отличия частоты врожденных пороков развития в области (13,2 - 55,8 на 1000 н/р). Средний показатель этой патологии в радиационно загрязненных районах больше, чем в условно «чистых» (21,9:1000 н/р). Наибольшая частота врожденных пороков развития выявлена в районах с повышенным уровнем химического загрязнения.

Frequency of congenital developmental anomalies in the Cherkassy region for the period 1997-2007 is similar to average value of this parameter across Ukraine (27,3 and 26,0 on 1000 n/b accordingly). Dynamics of reduction of frequency of congenital developmental anomalies in the field of for the investigated period is observed. Significant regional differences of frequency of congenital developmental anomalies in the field of (13,2 - 55,8 on 1000 n/b) are revealed. The average indice of this pathology in radiation polluted areas is more, than in conditionally "pure" (21,9:1000 n/b). The greatest frequency of congenital developmental anomalies is revealed in areas with the raised level of chemical pollution.

ШВАЧКО Л.П., ТЕЛЕГЕЕВ Г.Д.

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины

Украина 03143, Киев, ул. Заболотного, 150. l.p.shvachko@imbg.org.ua

АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ДНК – МЕТИЛТРАНСФЕРАЗНЫХ ГЕНОВ В ДИНАМИКЕ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

В неопластических клетках существенным образом изменяется паттерн ДНК-метилирования, по сравнению с нормальными соматическими клетками [1]. При этом, глобальное геномное гипометилирование парадоксально сопровождается увеличением ДНК-метилтрансферазной активности и локальным гиперметилированием CpG-островков, как правило, в 5'-промоторных участках генов [2]. Доказано, что aberrантное метилирование de novo CpG-островков, в норме не метилированных, является особенностью иммортализованных и трансформированных клеток, и связано в большинстве случаев с инактивацией генов - супрессоров опухолевого роста [3]. Считается, что aberrантное метилирование CpG-островков является ранним событием в процессе возникновения опухоли [4]. Таким образом, становится очевидным исследование характера экспрессии альтернативных генетических вариантов ДНК-метилтрансферазной активности, парадоксально ассоциирующейся с геномным гипометилированием в неопластических клетках [5]. Также, вопрос о происхождении самой ДНК- метилирующей активности, коррелирующей с промоторным CpG-метилированием, в литературе неоднозначен [6]. Поэтому, изменение экспрессии разных вариантов ДНК-метилтрансферазных генов может подчеркивать их дифференцированную роль в механизме опухолевой прогрессии и в эпигенетике рака, в частности.

Методом RT-PCR нами исследована альтернативная экспрессия ДНК метилтрансферазных генов DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, кодирующих функционально различные ДНК метилтрансферазы, в генезисе миелопролиферативного заболевания истинная полицитемия - хронический миелолейкоз (СМЛ).

Материалы и методы.

Лимфоциты из 10 мл цельной крови пациента выделяли в градиенте фиколюверографина ($\rho = 1,078$), собирали центрифугированием и промывали 2 раза в PBS буфере. Клеточность фракции лимфоцитов подсчитывали с помощью камеры Горяева. Для выделения РНК клеточность лимфоцитов не превышала 5×10^6 в 1 мл. Тотальную РНК из лимфоцитов крови выделяли используя гуанидинтиоцианат как описано [7]. Контроль препаратов РНК проводили электрофорезом в 1,8 % агарозном геле в $1 \times$ Трис-ацетатном буфере, рН 7,6. Синтез кДНК проводили с помощью обратной транскриптазы (40 ед. фермента, 37° С, 60 мин.). В RT-PCR использовались синтезированные праймеры для 3-х альтернативных вариантов - DNMT1, DNMT3A, DNMT3B генов. Оптимизированными условиями RT-PCR амплификации был горячий отжиг праймеров (Perkin-Elmer Applied Biosystems).

Результаты и их обсуждение.

У млекопитающих, в том числе у человека, известны три фермента, осуществляющие метилирование геномной ДНК: паттерн ДНК-метилтрансфераза DNMT1 и две de novo ДНК-метилтрансферазы DNMT 3A и 3B (Рисунок 1) [8].

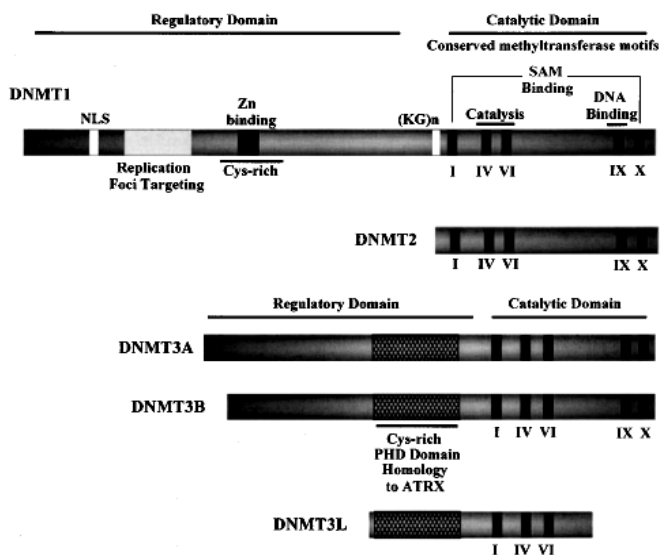


Рисунок 1. Структура известных ДНК метилтрансфераз DNMT1, DNMT3A, DNMT3B (K.D. Robertson, DNA methylation, methyltransferases, and cancer. - Oncogene – 2001, - 20. -P. 3139–3155)

DNMT1 – основной фермент пострепликативного метилирования геномной ДНК [8, 9]. Активность фермента резко возрастает с началом синтеза ДНК и в первые минуты после репликации профиль метилирования дочерней нити воссоздается по образцу материнской (геми-метилирование ДНК) [9].

ДНК-метилтрансферазы DNMT 3A и DNMT 3B необходимы для метилирования ДНК de novo и экспрессируются только на ранних эмбриональных стадиях развития [9]. Тем не менее, экспрессия de novo вариантов DNMT 3A и DNMT 3B в соматических клетках взрослого организма очень низка [10]. Роль данных генов в канцерогенезе связывают с de novo метилированием в неметилированных CpG-островках [10, 11].

Нами исследован характер экспрессии трех ДНК-метилтрансферазных генов DNMT1, DNMT3A, DNMT3B с помощью обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (RT-PCR) на фоне миелопролиферативного процесса у 4-х пациентов: трех с клиническим диагнозом хронический миелолейкоз (СМЛ) и одного с истинной полицитемией.

Истинная полицитемия – хроническое заболевание системы крови, характеризующееся эритропенией, которое может рассматриваться промаллигнизирующей стадией миелопролиферативного синдрома. Хронический миелолейкоз – онкологическое заболевание лимфатической ткани, при котором опухолевые лимфоциты накапливаются в периферической крови, костном мозге и лимфатических узлах. В отличие от острых лейкозов, процесс идет достаточно медленно, вследствие чего нарушения кроветворения развиваются лишь на поздних стадиях болезни.

Как показано на рисунке 2, при истинной полицитемии имеет место доминирующая экспрессия паттерн DNMT1 метилтрансферазы, которая сочеталась с экспрессией de novo ДНК метилтрансферазы DNMT3A. В то же время, вариант de novo метилирования DNMT3B не экспрессировался у пациента с истинной полицитемией. У троих пациентов с хроническим миелолейкозом (СМЛ) паттерн экспрессии мРНК исследуемых ДНК-метилтрансферазных генов существенным образом меняется. По

результату RT-PCR у пациентов с CML выявлено резкое снижение уровня экспрессии паттерн ДНК-метилтрансферазы DNMT1, отсутствие de novo варианта DNMT3A и доминирующая суперэкспрессия de novo DNMT3B ДНК-метилтрансферазного гена. Как показано, уровень экспрессии de novo DNMT3B варианта может коррелировать с клинической отягощенностью течения хронического лейкоза у индивидуальных пациентов (рисунок2).

Таким образом, данное исследование может свидетельствовать о диагностически значимом подходе в изучении контроля экспрессии ДНК-метилтрансферазных генов DNMT1, DNMT3A и DNMT3B, кодирующих функционально различные ДНК метилтрансферазы, в патогенезе миелопролиферативного заболевания, в частности, патологической роли de novo DNMT3B варианта ДНК-метилования в динамике онкологической прогрессии.

DNMT1/ DNMT3A/ DNMT3B

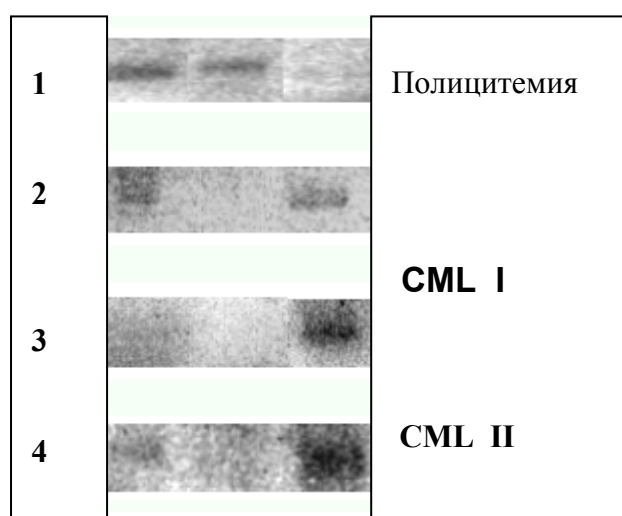


Рисунок 2. Дифференцированная экспрессия ДНК метилтрансферазных генов в динамике миелопролиферативного заболевания у разных пациентов.

Выводы. Методом RT-PCR показано, что в генезисе миелопролиферативного заболевания истинная полицитемия – хронический миелолейкоз имеет место существенное изменение паттерна экспрессии ДНК-метилтрансферазных генов и вклад de novo метилирования в клинику онкологической прогрессии. Суперэкспрессия мРНК de novo варианта DNMT3B сопровождает прогрессию миелопролиферативного заболевания, при резком снижении уровня экспрессии DNMT1, ключевого фермента метилирования соматического генома.

Показана прогностическая оценка статуса экспрессии DNMT3B у исследованных пациентов.

Литература.

1. Baylin S. B., Herman J. G., Graff J. R., Vertino P. M., Issa J. P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. - *Adv. Cancer Res.* -1998.- **72**, - P. 141-196.
2. Szif M. Targeting DNA methylation in cancer. – *Bull. Cancer* – 2006. – **93**. – P. 5358-5360.
3. Esteller M., Corn P. G., Baylin S. B., Herman J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. - *Cancer Res.* -2001. – **61**. – P. 3225-3229.
4. Herman J.G., Baylin S.B. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. –*Cur. Top. Microbiol. Immunol.* – 2000. -**16**. –P. 168-174.

5. Eads C. A., Danenberg K. D., Kawakami K., Saltz L. B., Danenberg P. V., Laird P. W. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. - *Cancer Res.* – 1999. – V.59. – P. 2302-2306.
6. Rhee I., Bachman K. E., Park B. H., Jair K. W., Yen R. W., Schuebel K. E., Cui H., Feinberg A. P., Lengauer C., Kinzler K. W., Baylin S. B., Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.- *Nature (Lond.)* -2002. – **416**. –P. 552-556.
7. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. - *Anal. Biochem.* – 1987.-**162**.–P.156-159.
8. Robertson K.D., DNA methylation, methyltransferases, and cancer. – *Oncogene* – 2001. – **20**. – P. 3139–3155.
9. Li E., Bestor T.H., Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. – *Cell* – 1992. –**62**. - P.915-926.
10. Robertson K. D., Uzvolgyi E., Liang G., Talmadge C., Sumegi J., Gonzales F. A., Jones P. A. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. -*Nucleic Acids Res.* – 1999. – **27**. – P. 2291-2298.
11. Mizuno S., Chijiwa T., Okamura T., Akashi K., Fukumaki Y., Niho Y., Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia.- *Blood* – 2001. – **97**. – P. 1172-1179.

Резюме

Внимание уделено изучению альтернативной экспрессии ДНК- метилтрансферазных генов, методом RT-PCR, в динамике миелопролиферативного заболевания на примере истинной полицитемии и хронического миелолейкоза. Показано, что в генезисе миелопролиферативного заболевания имеет место существенное изменение паттерна экспрессии ДНК- метилтрансферазных генов и вклад de novo метилирования в клинику онкологической прогрессии. Суперэкспрессия мРНК de novo варианта DNMT3B сопровождает прогрессию миелопролиферативного заболевания при резком снижении уровня экспрессии DNMT1, ключевого фермента метилирования соматического генома. Показана прогностическая оценка статуса экспрессии DNMT3B у исследованных пациентов.

Увага зосереджена на альтернативній експресії ДНК-метилтрансферазних генів в динаміці міелопроліферативного захворювання на прикладі істинної поліцитемії та хронічного міелолейкозу. Показано, що в генезисі міелопроліферативного захворювання має місце суттєва зміна паттерну експресії мРНК ДНК-метилтрансферазних генів та вклад аномального de novo метилювання ДНК в клініци онкологічної прогресії. Показана прогностична оцінка статусу експресії DNMT3B у досліджених пацієнтів.

The same stage-specific alterations of DNA Methyltransferase Expression have been presented. There was analyzed expression of DNA methyltransferase (DNMTs) genes by RT-PCR and shown the different DNA methyltransferase patterns expression during four pathogenetic myeloproliferative stages. We found that DNMT1, 3A, and 3B mRNA levels have diversity positive correlation with polycythemia and CML as the stage-specific myeloproliferation syndromes. DNMT1, and 3A showed the highest expression for polycythemia patient and thought to did not correlate with CML cancer progression. In contrast, de novo DNMT3B showed the highest expression for three CML patients with insignificant DNMT1, and without DNMT3A expression. In summary we have resumed that de novo DNMT3B overexpression mRNA commonly correlated with stage-specific myeloproliferation pathogenesis in CML patients. Have been shown the prognosis value of DNMT3B Expression Status for the patients were investigated.

ШЕМЕТУН О.В., ТАЛАН О.О.

ДУ „Науковий Центр радіаційної медицини АМН України”

Україна, 040050, Київ, вул. Мельникова, 53, e-mail: lshem@ukr.net

ІНДУКЦІЯ ЕФЕКТУ СВІДКА ЛІМФОЦИТАМИ КРОВІ ЛІКВІДАТОРІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС, ОПРОМІНЕНИМИ В МАЛИХ ДОЗАХ

Широкий спектр соматичної патології в осіб, які зазнали дії радіації, може бути обумовлений не лише прямим радіаційним ушкодженням клітин-мішеней, а й вторинними змінами в неопромінених клітинах – ефектом свідка. Внаслідок його індукції підсилюється біологічна ефективність отриманої дози радіації та виникає можливість дестабілізації геному неопромінених клітин. Тому дослідження цитогенетичних аспектів цього явища є актуальним і дозволить підійти до розкриття механізмів хромосомної нестабільності та канцерогенезу в організмі, який зазнав дії радіації.

До теперішнього часу немає точних даних стосовно тривалості ефекту свідка і його здатності передаватись наступним поколінням клітин [1]. Проте показано, що персистенція геномної нестабільності може індукувати ефект свідка. І. Emerit зареєструвала кластогенну активність плазми крові у персоналу Чорнобильської атомної електростанції, що була спричинена утворенням продуктів перекисного окислення ліпідів, супероксидів та зсувом прооксидантного і антиоксидантного балансу в опромінену організм [2]. В наших попередніх дослідженнях з використанням власної моделі для виявлення радіаційно індукованого ефекту свідка на цитогенетичному рівні (зі змішаної культури опромінених та неопромінених лімфоцитів крові людини, що розрізнялись маркерами статі) було показано підвищення хромосомної нестабільності в неопромінених клітинах-свідках, що культивувались з лімфоцитами ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС, опромінених у дозах від 1,01 до 2,37 Гр [3-5].

Враховуючи викладене, метою представленої роботи було встановлення можливості індукції ефекту свідка в неопромінених лімфоцитах крові людини при їх сумісному культивуванні в змішаних культурах з лімфоцитами ліквідаторів аварії на ЧАЕС, опромінених в малих дозах.

Матеріали і методи

При виконанні роботи проведено дослідження радіаційно-індукованого ефекту свідка в неопромінених лімфоцитах трьох донорів жіночої статі при культивуванні в змішаних культурах з лімфоцитами шести ліквідаторів наслідків аварії на ЧАЕС, які зазнали опромінення в дозах 0,35-0,69 Гр.

Матеріалом цитогенетичного дослідження були лімфоцити периферичної крові.

Кров культивували за загальноприйнятим напівмікрометодом D.A. Hungerford. При постановці змішаних культур до культуральної суміші в пробірку додавали по 0,3 мл крові від двох осіб різної статі, що розрізнялись за наявністю опромінення *in vivo*.

Цитогенетичний аналіз виконували з застосуванням диференційного G-збарвлення метафазних хромосом з використанням барвника Гімза та трипсину за методом M.Seabright.

Хромосомний аналіз проводили на зашифрованих препаратах. Для розрізнення лімфоцитів периферичної крові, що культивувались в змішаних культурах, використовували статеві хромосоми Y та XX (як головні маркери) та морфологічні варіанти деяких соматичних хромосом (9qh⁺⁺; 9qh⁺; 13ps⁺, 15cenh⁺) як допоміжні ознаки. Реєстрували аберації хроматидного (хроматидні розриви, обміни) і хромосомного (дицентричні, кільцеві хромосоми, транслокації, пара- та перичентричні інверсії, інсерції, термінальні та інтерстиціальні делеції) типів. Під час аналізу

реєстрували пошкоджені хромосоми та точки розривів згідно з міжнародною номенклатурою ISCN- 2005 [6].

Отримані дані опрацьовували з використанням методу порівняння середніх величин за Ст'юдентом-Фішером.

Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що рівень аберацій хромосом ($1,73 \pm 0,65$ на 100 метафаз) в неопромінених лімфоцитах донорів (контроль) знаходився на популяційному рівні.

Цитогенетичне обстеження ліквідаторів аварії на ЧАЕС показало, що у віддалені терміни після дії радіації рівень аберацій хромосом в їх лімфоцитах (клітинах-мішенях) статистично достовірно перевищував показники неопроміненого контролю і становив $4,11 \pm 0,66$ на 100 метафаз ($p < 0,01$) (рис.1).

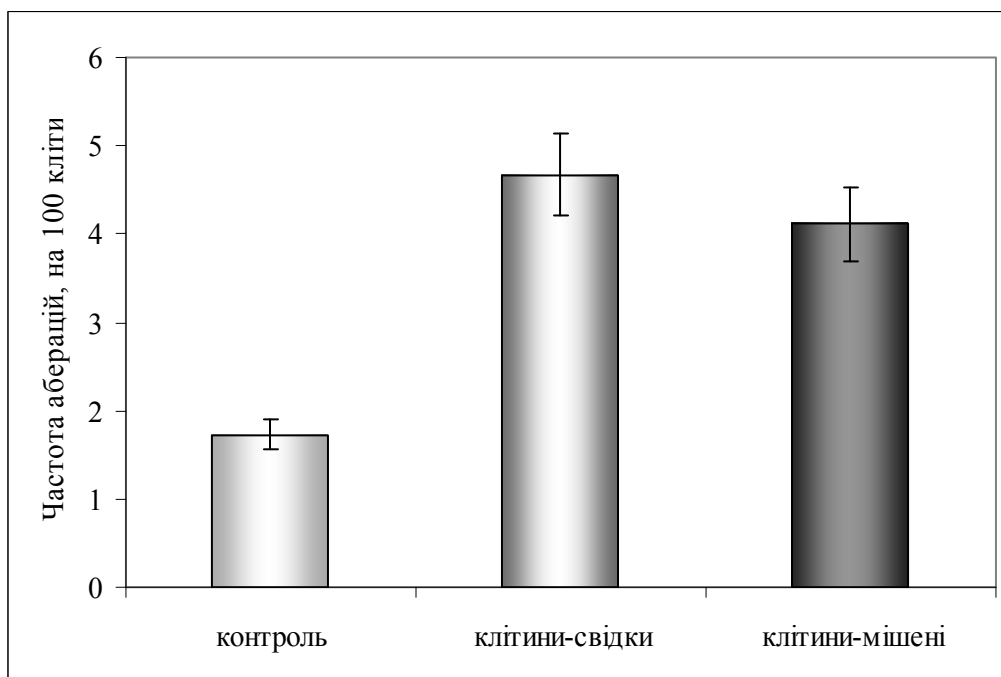


Рис. 1 Частота аберацій хромосом в неопромінених клітинах-свідках та опромінених *in vivo* клітинах-мішенях

В неопромінених лімфоцитах, що культивувались в змішаних культурах з кров'ю ліквідаторів аварії на ЧАЕС (клітинах-свідках), частота аберацій хромосом складала $4,67 \pm 0,56$ на 100 метафаз і статистично перевищувала рівень аберацій в контрольних культурах неопромінених лімфоцитів ($p < 0,01$) та не мала істотної різниці з частотою пошкоджених хромосом в клітинах-мішенях ($p > 0,05$).

Разом з тим, аналіз спектру виявлених пошкоджень засвідчив різницю в типах аберацій, зареєстрованих в клітинах-свідках та клітинах мішенях. В неопромінених клітинах, що культивувались з опроміненими, 73% всіх пошкоджень склали аберації хроматидного типу. Вони зустрічались з частотою $3,42 \pm 0,48$ на 100 клітин, що статистично перевищувала їх рівень як в контролі ($0,25\% \pm 0,25$ на 100 метафаз), так і в клітинах-мішенях ($1,89 \pm 0,45$ на 100 клітин) ($p < 0,01$) (рис. 2). Вони були представлені хроматидними розривами (96 % від загальної кількості) та хроматидними обмінами (4 %). Рівень аберацій хромосомного типу в клітинах-свідках істотно не відрізнявся від контрольного ($p > 0,05$).

У ліквідаторів аварії на ЧАЕС частка аберацій хромосомного типу становила 54 % від зареєстрованих у них пошкоджень хромосом. Їх частота також не мала

істотної різниці з контролем ($p > 0,05$). В клітинах-мішенях спостерігали нормалізацію рівня маркерів дії радіації за час, що минув після аварії.

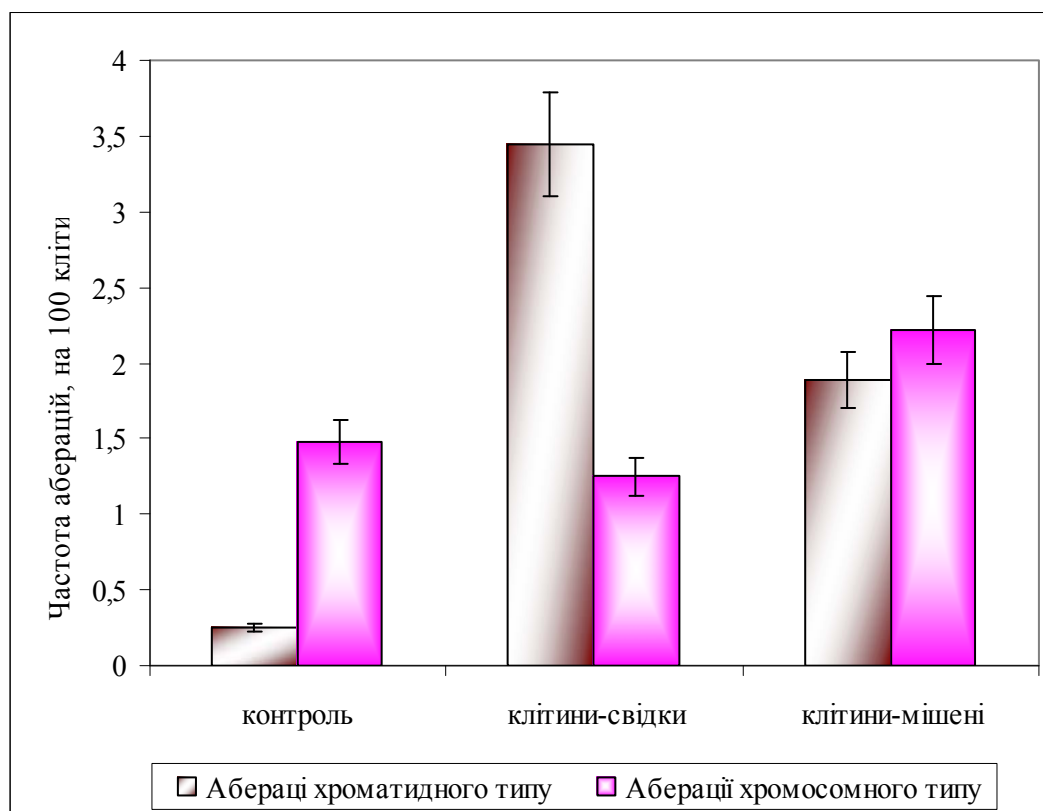


Рис. 2 Частота аберацій хроматидного та хромосомного типів в неопромінених клітинах-свідках та опромінених *in vivo* клітинах-мішенях

Наведені дані щодо рівня і спектру аберацій хромосом в клітинах-свідках (зростання частоти пошкоджень хроматидного типу) узгоджуються з результатами наших попередніх дослідів, отриманих при моделюванні ефекту свідка з використанням лімфоцитів крові, опромінених *in vitro* та дослідженнях індукції ефекту свідка при культивуванні з лімфоцитами ліквідаторів аварії на ЧАЕС, опромінених у високих дозах [4, 5, 7].

Висновки. Проведеними дослідженнями встановлено можливість індукції ефекту свідка в неопромінених лімфоцитах крові людини при їх сумісному культивуванні в змішаних культурах з лімфоцитами ліквідаторів аварії на ЧАЕС, опромінених в дозах 0,35-0,69 Гр.

Література

1. Литтл Д.Б. Немишеневые эффекты ионизирующих излучений: выводы применительно к низкодозовым воздействиям // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2007. – Т. 47, № 3. – С. 262-272.
2. Emerit I. Transferable clastogenic activity in plasma from persons exposed as salvage personnel of the Chernobyl reactor // J. Cancer Res. Clin. Oncol. – 1994. – Vol. 120. – P. 558–561.
3. Шеметун О.В., Пілінська М.А., Талан О.О. Підходи до виявлення радіаційно індукованого „ефекту свідка” в соматичних клітинах людини на цитогенетичному рівні // Українські медичні вісті. – 2005. – Т. 6, № 1-2. – С. 427.
4. Шеметун О.В., Талан О.О., Пілінська М.А. Дослідження радіаційно індукваного ефекту свідка на цитогенетичному рівні // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – К.: Логос, 2007. – С. 551-554.

5. Шеметун О.В., Талан О.О. Моделирование радиационно индуцированного эффекта свидетеля в условиях *in vitro* // Факторы экспериментальной эволюции организмов. – 2008.- Т. 5. –С. 450-454.
6. An International system for human cytogenetic nomenclature: high-resolution banding (2005) // Standing committee on Human Cytogenetic nomenclature. – Basel: Karger, 2005. – 130 p.
7. Шеметун О.В., Талан О.О., Пілінська М.А. Дослідження радіаційно-індукованого «ефекту свідка» з використанням моделі з лімфоцитів крові людини при опроміненні *in vitro* // Журнал АМН України”. – 2007. - Т.13, № 3. - С. 592-599.

Приведены результаты исследования радиационно индуцированного эффекта свидетеля с использованием модели из лимфоцитов крови человека. Показано, что в результате этого феномена уровень аберраций хромосом в необлученных клетках при культивировании в смешанных культурах с облученными *in vivo* в дозах 0,35-0,69 Гр лимфоцитами достоверно превышал контрольный.

Наведені результати дослідження радіаційно індукованого ефекту свідка з використанням моделі з лімфоцитів крові людини. Показано, що внаслідок цього феномену рівень аберацій хромосом в неопромінених клітинах при культивуванні в змішаних культурах з опроміненими *in vivo* в дозах 0,35-0,69 Гр лімфоцитами достовірно перевищував контрольний.

The results of cytogenetic investigation of radioinduced bystander effect with the help of human blood lymphocytes had been presented. It had been shown that as the result of this phenomenon the level of chromosome aberrations in bystander cells cultivated jointly with irradiated *in vivo* in dose 0,35-0,69 Gy was significantly higher, than control level.

ШТАНДЕЛЬ С.А.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я.Данилевского АМН Украины», Украина, 61002, г. Харьков, ул. Артема, 10, e-mail: shtandel@mail.ru

ПОДВЕРЖЕННОСТЬ УЗЛОВОМУ НЕТОКСИЧЕСКОМУ ЗОБУ ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА ХАРЬКОВА

Известно, что структура популяции влияет на распространенность наследственных заболеваний [1, 2]. Во многом благодаря увеличению "генетического груза популяции" возрастает и распространенность множества хронических заболеваний человека [3]. Это то, чем популяция платит за адаптацию к окружающей среде. Генетический груз состоит из двух компонент. Одна из них - мутационный груз, открытый Г.Меллером. Вторая компонента - так называемый сегрегационный груз (от лат. *segregation* - расщепление) - связан с полиморфизмом генов. При оптимальной среде разные генотипы не отличаются по жизнеспособности по полиморфной части генома (они как бы равновелики). При субоптимальной, стрессирующей среде разные генотипы начинают вести себя по-разному. Гетерозиготы, у которых ген представлен разными аллелями, лучше приспособляются к изменениям окружающей среды, чем гомозиготы, поэтому гетерозиготность популяции возрастает, сегрегационный груз накапливается. И этот груз может быть ощутимо велик. Сегрегационный груз способствует увеличению распространенности хронических заболеваний и, таким образом влияет на изменения смертности в популяции [1]. К факторам, изменяющим генные частоты в популяции относят наряду с вновь возникающими мутациями и отбором миграцию, изоляцию и аутбридинг [4]. Под аутбридингом в современных популяциях человека подразумевается расширение круга брачных связей (увеличение

среднего расстояния между местами рождения мужа и жены), широкое распространение межнациональных браков [5]. Генетическим параметром, отражающим степень генетических различий между брачными партнерами, а, следовательно, и уровень аутбридинга, является расстояние между местами рождения супругов. В популяционной генетике миграция рассматривается как один из основных факторов популяционной динамики, изменяющих уровень генетического разнообразия популяций [5]. Миграционные потоки могут изменять частоты не только обычных генных маркеров и моногенных патологий, но и генов, предрасполагающих к развитию заболеваний, наследующихся полигенно [4].

Узловой (многоузловой) эутиреоидный зоб – клиническое понятие, объединяющее все пальпируемые образования в щитовидной железе, имеющие разные морфологические характеристики и протекающие на фоне нормальной тиреоидной функции [6, 7]. УзЗ чаще встречается у женщин и у лиц пожилого возраста и к нему прослеживается некоторая генетическая предрасположенность [8]. В последние годы развивается научная концепция многофакторной природы УзЗ, в развитии которого принимают участие не только средовые (природные), но и генетические факторы. Многими эпидемиологическими и близнецовыми исследованиями установлена вероятность генетической предрасположенности к УзЗ [9, 10]. Учитывая многофакторность природы УзЗ, актуально было бы изучить влияние структуры популяции на подверженность к УзЗ.

Целью данной работы было изучить влияние степени метизации и миграции пробанда на подверженность УзЗ.

Материалы и методы

Сбор генеалогического материала проводился методом единичной регистрации, согласно требованиям Комитета экспертов ВОЗ [11]. Были обследованы 149 пробандов с УзЗ. Изучалось распределение больных и здоровых родственников 1 и 2 степени родства в родословной пациента (родители, сибсы, деды и бабки, дяди и тети). Больные были разделены на четыре группы согласно сведениям о месте рождения и национальности родителей и прародителей. Первую группу составили индивиды, родители которых были одной национальности и происходили из одного небольшого населенного пункта (села). Во второй группе родители пробандов были одной национальности, но родились в разных населенных пунктах, либо одном большом городе. Третью группу составили лица, родители которых были разных, но этнически близких национальностей (русские и украинцы). В четвертую группу вошли больные, родители и прародители которых были разных этнически отдаленных национальностей (например, русские и казахи). Оценка влияния степени метизации на подверженность УзЗ и возраст начала заболевания оценивалась при помощи однофакторного дисперсионного анализа [12].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований было показано достоверное влияние степени метизации на подверженность УзЗ (таблица 1). Увеличение метизации пробанда сопровождалось увеличением доли больных УзЗ родственников со 2-й по 4-ю группу, при этом максимальный процент больных родственников был отмечен у пробандов минимальной метизации: $6,55 \pm 1,85$ – 1-я группа; $1,75 \pm 0,61$; $2,15 \pm 0,80$ и $4,17 \pm 1,64$ % – 2-я – 4-я группы, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о том, что потомкам эндогамных браков (1 группа) свойственна высокая устойчивость заболеванию.

Таблица 1. Результаты однофакторного дисперсионного анализа взаимосвязи степени метизации пробанда и количества родственников, больных УзЗ

Разнообразие	Дисперсия С	Число степеней	Вариансы δ^2	$\eta^2_x = 0,0104 \pm 0,0027$ F=3,84
--------------	-------------	----------------	---------------------	--

		свободы ν		$F_{st}=\{2,6-3,78\}$ $p<0,001$
Факториальное	0,32	3	0,11	
Случайное	30,74	1090	0,03	
Общее	31,06	1093	0,03	

Примечание: η^2_x – сила влияния, F – критерий Фишера, F_{st} – стандартные значения критерия Фишера для данных степеней свободы, p - достоверность различий в сравниваемых группах.

Анализ взаимосвязи степени метизации и возраста начала УЗ не выявил влияния метизации пробанда и возраста начала заболевания (таблица 2).

Таблица 2. Результаты однофакторного дисперсионного анализа взаимосвязи степени метизации и возраста начала УЗ у пробанда

Разнообразие	Дисперсия С	Число степеней свободы ν	Вариансы δ^2	$F=0,13$ $F_{st}=\{2,6-3,78\}$ $p>0,005$
Факториальное	6,79	3	2,26	
Случайное	2438,92	143	17,06	
Общее	2445,71	147	17,05	

Примечание: η^2_x – сила влияния, F – критерий Фишера, F_{st} – стандартные значения критерия Фишера для данных степеней свободы, p - достоверность различий в сравниваемых группах.

Изучение влияния миграции на подверженность УЗ показало, что миграция не влияет на подверженность УЗ, процент больных УЗ родственников, как в группе коренных жителей, так и у мигрантов достоверно не отличался (таблица 3).

Таблица 3. Взаимосвязь миграции пробанда и количества больных УЗ родственников

Степень метизации пробанда	Больные УЗ родственники, %		Критерий χ^2	p
	Коренные жители	Мигранты		
I	6,80	6,47	0,108	0,742
II	1,44	1,89	0,002	0,962
III	1,64	3,01	0,120	0,719
IV	7,25	1,33	1,840	0,175
Всего	3,06	3,01	0,021	0,886

Примечание: p – достоверность различий в сравниваемых группах.

Таким образом, можно утверждать, что при любой степени миграции пробанда, и в целом миграция не влияет на подверженность УЗ.

Следует отметить, что в патогенезе УЗ йододефицит играет большую роль [13]. В связи с этим оценивалась выраженность йододефицита в месте проживания либо рождения пробанда. Среди обследованных 82 % проживали в областях с незначительным йододефицитом, а 17,89 % проживали в областях с умеренным йододефицитом [14] и 74 % были рождены в областях с незначительным йододефицитом, а 26 % происходили из областей с умеренным йододефицитом. Также следует отметить, что как в группах, проживающих в областях с незначительным, так и умеренным йододефицитом процент родственников с УЗ достоверно не отличался - $\chi^2=$

0,954, $p=0,329$. Аналогичные данные были получены и при сравнении больных УЗ, рожденных в областях с умеренным и незначительным йододефицитом - $\chi^2=0,066$, $p=0,797$.

Выводы

- Показано влияние степени метизации пробанда на подверженность УЗ.
- Наиболее устойчивыми к развитию УЗ являются потомки эндогамных браков, родители и прародители которых происходят из одного небольшого населенного пункта.
- Степень метизации пробанда не влияет на возраст начала УЗ.
- Миграция пробанда не влияет на его подверженность УЗ.

Литература

1. *Алтухов Ю.П.* Генетические процессы в популяциях. М.: ИКЦ «Академкнига». - 2003. - 431 с.
2. *Гинтер Е.К., Ревазов А.А., Петрин А.Н.* Влияние урбанизации на груз наследственных болезней в популяциях // Наследственность человека и окружающая среда / Ред. Ю.П. Алтухов. М.: Наука. - 1992. - Вып. 2. - С. 22–35.
3. *Курбатова О.Л.* Демографическая генетика мегапопуляций: изменчивость параметров отбора // «Экология и демография человека в прошлом и настоящем» Материалы Третьих антропологических чтений к 75-летию со дня рождения академика В.П.Алексеева, Москва 15-17 ноября 2004 г.: Москва, 2004. – С.259-262.
4. *Фогель Ф., Мотульски А.* Генетика человека. М.: Мир. – Т. 2. – 1990. – 378 с.
5. *О.Л. Курбатова, Е.Ю. Победоносцева* Городские популяции: возможности генетической демографии (миграция, подразделенность, аутбридинг). - Вестник ВОГиС, 2006. – Т. 10. - № 1. – С.155-188.
6. *Анциферов М.Б., Плавунов Н.Ф., Степанова В.В.* Организация помощи больным с заболеваниями щитовидной железы в г. Москве. - В кн.: Лечение и профилактика эутиреоидного зоба. - М. - 1997. - С. 3 - 7.
7. *Ветшев П.С., Шкроб О.С., Чилингариди К.Е., Кузнецов Н.С., Ванушко В.Э., Габидзе Д.И.* Возможности предоперационной морфологической верификации при узловых эутиреоидных образованиях щитовидной железы // Хирургия. - 1998. - №2. - С. 4 - 8.
8. *Лаурберг П., Ольборг М.* Многоузловой зоб.- http://www.rusmedserv.com/thyronet/th_spec/thyronet-1-4.htm
9. The genetics of euthyroid familial goiter / *Böttcher Y., Eszlinger M., Tönjes A., Paschke R.* // Trends in Endocrinology and Metabolism. – 2005. – Vol. 16, № 9. – P. 314-319.
10. *Штандель С.А., Караченцев Ю.И., Хазиев В.В., Дубовик В.Н., Светлова-Коваленко Е.А.* Генетический анализ узлового зоба // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2007. – Т. 5, № 1-2. – С. 120-125.
11. Методология семейных исследований генетических факторов.// Доклад научной группы ВОЗ. Серия техн. докл. ВОЗ № 466.-1972.-С.5-11.
12. *Плохинский Н.А.* Биометрия. – М.: МГУ. – 1970. – 468 с.
13. Частота випадків зоба та йодна забезпеченість у південно-східних областях України на початку виконання державної програми йодної профілактики / *Тананакіна Н.В., Кравченко В.І., Лузанчук І.А., Лубянова І.П., Каракашьян А.Н., Калачева І.В.* // International Journal of Endocrinology. – 2005. - № 1. - <http://endocrinology.mif-ua.com/archive/issue-2265/article-2276/>.
14. *Тимченко А.М., Козаков О.В., Кравчун Н.О.* Сучасні аспекти профілактики йододефіцитних захворювань // Ваше здоров'я. Медична газета України. – 2008. - № 734. - <http://www.vz.kiev.ua/med/734/1.shtml>.

Резюме

Изучено влияние степени метизации и миграции на особенности семейного накопления у 149 больных узловым зобом. Показано влияние степени метизации на

подверженность заболеванию, при этом наиболее устойчивыми к развитию заболевания были потомки эндогамных браков. Влияния миграции на развитие патологии не выявлено.

У 149 больных на узловый зоб досліджено вплив ступеня метизації та міграції на особливості родинного накопичення. Показано вплив ступеня метизації на схильність до захворювання, при цьому найбільш схильними до розвитку захворювання були нащадки ендегамних шлюбів. Вплив міграції на розвиток патології не визначено.

Crossbreeding degree and migration influences on the family accumulations particularities at 149 Nodular Goiter patients were studied. It has been shown the crossbreeding degree influence on the susceptibility to disease, for all that most the steady for disease were endogamy marriage offspring. It is not revealed influences of migration on the pathology development.

ШУСТИКОВА М.В.

Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

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

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ ПО УРОВНЮ АГРЕССИВНОГО РЕАГИРОВАНИЯ У ПОТОМКОВ СЕМЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ

Агрессивное поведение является одной из архаичных, биологически обусловленных форм социального взаимодействия. Как коммуникативный паттерн, агрессия представляет собой иерархически организованную мотивационную систему взаимосвязанных элементов, структура которой включает инстинкты, аффекты и психические влечения, в различной степени представленные в филогенетически более древних (физическая агрессия) и возникших на более поздних стадиях развития исторического развития человеческих сообществ (косвенная, вербальная агрессия) формах агрессивных реакций.

В настоящей работе предпринята попытка исследования генетических и средовых причин формирования вариабельности уровня агрессивного реагирования среди потомков семей с различной брачной структурой и половой конфигурацией сибства. Актуальность первой задачи обусловлена усложнением генетической и средовой структуры популяций современных больших городов и продолжает тему изучения влияния эффектов аутбридинга на состояние здоровья человека. Теоретической основой для постановки второй задачи являются положения концептуальной базы психиатрии Э. Кендела [1], принцип генотип-средовой детерминации психических особенностей Р. Пломина [2].

Материалы и методы

Сбор первичной информации проводили среди студенческой молодежи, жителей г. Харькова (Украина). У потомков различных типов браков (394 юношей и 487 девушек, средний возраст соответственно $20 \pm 0,4$; $21 \pm 0,5$ лет) определяли уровень физической (ФА), косвенной (КА), вербальной (ВА) агрессивности с помощью теста Басса-Дарки [3] и градиент экзогамии на основании информации об этнической принадлежности и брачном расстоянии родителей. Группы Eg1, Eg2, Eg3 составили потомки родителей одной национальности, выходцев соответственно из небольшого населенности пункта; большого города или разных населенных пунктов в пределах одной области; разных областей. Группу Eg4 - потомки межнациональных браков. Для оценки влияния степени экзогамии на уровень агрессивных реакций проводили дисперсионный анализ с помощью критериев Фишера и Крускала-Уоллиса в

зависимости от предварительных результатов оценки характера распределения и теста на гомогенность дисперсий в группах различной степени экзогамии с помощью критерия Бартлетта. Для сравнения групповых средних применяли метод Шеффе, показатель силы влияния определяли по методу Снедекора [4,5]. Для 89 пробандов, членов однополых sibств из двух человек (40 юношей и 49 девушек, средний возраст $21,1 \pm 1,2$ и $21,1 \pm 0,7$ лет), было проведено психологическое тестирование отцов, матерей и старших sibлингов. Факт биологического родства устанавливали с помощью анкеты. Вклад генетических и средовых факторов в формирование фенотипического разнообразия оценивали с помощью компонентного разложения фенотипической дисперсии на основе межклассовых и внутриклассовых коэффициентов корреляции [6]. Статистический анализ данных выполнен с применением программ SPSS 13.0 for Windows, Excel 2003, MATLAB.

Результаты и обсуждение

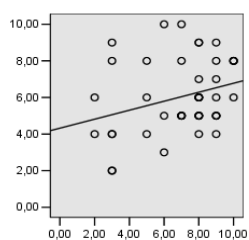
В ходе проведенного исследования [7,8] было установлено равенство дисперсий показателей всех форм агрессивных реакций в группах различной степени экзогамии, что свидетельствует о независимости характера варьирования уровня агрессивности от данного фактора. Дисперсионный анализ выявил незначительное влияние степени экзогамии на вариабельность уровня агрессивного реагирования: 1,9% ($p < 0,05$) для физической и вербальной агрессивности у юношей, 2,2% ($p < 0,05$) для косвенной агрессивности у девушек. Показаны статистически значимые различия средних значений. У юношей: между группами Eg3 - Eg4 (6,0 и 6,7; $F=2,86$; $p < 0,05$) по ФА; Eg2 - Eg3 (8,15 и 7,17; $F=3,61$; $p < 0,01$) и Eg3 - Eg4 (7,17 и 8,7; $F=4,09$; $p < 0,01$) по ВА. У девушек: между группами Eg3 - Eg4 (5,03 и 5,72; $F=3,2$; $p < 0,05$) по КА. Связь между степенью экзогамии и уровнем агрессивности носит криволинейный характер, максимальные значения получены для группы Eg4. Для объяснения результатов, подробности которого изложены ранее [8], автор обратился к концепции адаптивного фенотипа человека, предложенной Н.Г. Делоне и В.Г. Солониченко [9], и данным о влиянии уровня суммарной гетерозиготности на продольные размеры тела [10], уровень основного обмена [11]. Некоторые из результатов воспроизведены в процессе сравнительного анализа уровня агрессивности у двух групп индивидов с умеренной и повышенной степенью экзогамии, проведенном О.В. Филипцовой и др., который не свидетельствует о достоверности межгрупповых различий, однако указывает на тенденцию к зависимости уровня агрессивных реакций от исследуемого фактора у мужчин [12].

На первом этапе изучения корреляционных взаимосвязей между членами ядерных семей по ФА было показано [13], что между родителями sibсов мужского и женского пола сила связи неодинакова и составляет соответственно $r=0,343$ ($p < 0,05$) и $r=0,038$. Выявлена слабая положительная связь между родителями и потомками ($r=0,161$ ($p < 0,05$) в семьях с sibсами мужского пола, $r=0,173$ ($p < 0,05$) в семьях с sibсами женского пола) и умеренная положительная связь между братьями: $r=0,314$ ($p < 0,05$). Проведенный далее анализ указал на отсутствие взаимосвязей между родителями по КА и ВА как в семьях с sibсами мужского, так и в семьях с sibсами женского пола. Интересно отметить, что в семьях с сыновьями не было выявлено также и взаимосвязей в парах «родитель-потомок» и «sibлинги», тогда как в семьях с дочерьми статистически значимые коэффициенты составили: $r=0,206$ ($p < 0,05$) по КА в парах «родитель-потомок» и $r=0,409$ ($p < 0,01$) по ВА между sibлингами (относительно высокий коэффициент корреляции между сестрами по ВА может быть обусловлен спецификой общения в женских sibлинговых диадах [14]). На основании результатов компонентного разложения фенотипической дисперсии были вычислены показатели наследуемости в узком (h^2) и широком (H^2) смысле и, с целью объяснения результатов, полученных для семей с sibсами мужского пола, проведен корреляционный анализ между родителями и потомками с учетом порядка рождения сыновей. Наследуемость ФА у мужчин составила $h^2=24\%$, $H^2=84\%$; у женщин величина показателя

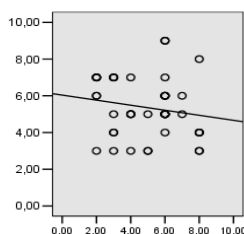
наследуемости (h^2) ФА и КА достигла 35% и 41%. Средовая компонента, как обобщенный количественный показатель, составила менее 20% для ФА у мужчин и более 50% для ФА и КА у женщин. Различие в силе корреляционной взаимосвязи по показателям КА и ВА в парах «отец–старший сын» и «отец–младший сын» (рис.1) свидетельствует о тенденции к влиянию обусловленной порядком рождения индивидуальной среды на вариабельность уровня данных форм агрессивного реагирования среди мужчин.

Согласно результатам, количественный и качественный вклад генотипа и среды в формирование индивидуальных различий по уровню исследуемых форм агрессивности у мужчин и женщин неравнозначен. Влияние степени экзогамии и связанного с ней повышения уровня суммарной гетерозиготности на физическую агрессивность у мужчин и косвенную агрессивность у женщин опосредовано, по всей вероятности, на различных уровнях организации индивида, тогда как причины межгрупповых различий по вербальной агрессивности могут носить социокультурный характер. Относительно высокий показатель H^2 физической агрессивности у мужчин позволяет высказать предположение о неаддитивном взаимодействии, наследование физической и

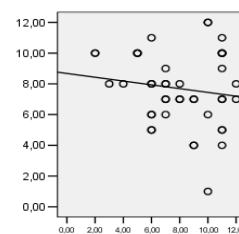
Отец - старший сын



$r=0,288$; $p=0,058$

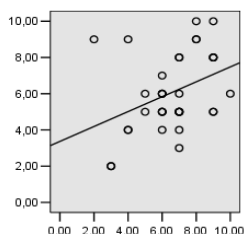


$r=-0,170$; $p=0,271$



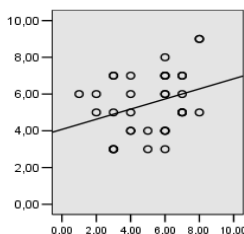
$r=-0,143$; $p=0,355$

Отец-младший сын



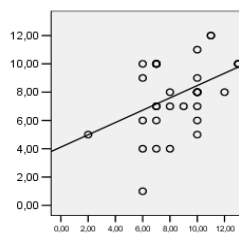
$r=0,374$; $p=0,027$

ФА



$r=0,312$; $p=0,069$

КА



$r=0,427$; $p=0,011$

ВА

Рис.1. Корреляционная взаимосвязь в парах «отец-старший сын» и «отец-младший сын».

косвенной агрессивности у женщин объясняется аддитивной моделью. Вероятно, и в качестве дополнительного аргумента выступает обнаруженное в настоящей работе различие дисперсий показателей физической агрессивности (2,42 у мужчин и 4,26 у женщин), у мужчин в процессе отбора происходило формирование адаптивно значимых ассоциаций между генами в полилокусных системах, обеспечивающих активность нейрохимических систем мозга, вовлеченных в процессы физической агрессии, что значительно уменьшило изменчивость признака [15]. Предположение согласуется с результатами некоторых исследований [16], однако нуждается в дополнительном изучении. Ответ на вопрос почему формирование индивидуальных различий по филогенетически более молодым формам агрессивного взаимодействия у мужчин, в отличие от женщин, зависит от порядка рождения и какова в данном случае психологическая природа индивидуальной среды – задача дальнейших исследований.

Выводы. Среди мужчин различия по уровню физической агрессивности в значительной степени обусловлены генотипом, вариабельность уровня косвенной и вербальной агрессивности зависит от sibлинговой позиции. Изменчивость физической и косвенной агрессивности у женщин в умеренной степени определяется генотипом, вербальной агрессивности – особенностями sibлинговой среды. Таким образом, установлены гендер-специфичные факторы формирования фенотипического разнообразия по уровню физической, косвенной и вербальной агрессивности у потомков семей с различной структурой.

Литература

1. *Kandel E.R.* A new intellectual framework for psychiatry. – Am. J. Psychiatry. – 1998. – №155. – P.457-469.
2. *Plomin R.* Nature and nurture: genetic and environmental influences on behavior // The Annals of the Amer. Acad. of Polit. and Soc. Science. – 2005. – Vol. 600, №1. – P. 86-98.
3. *Иванова Е.Ф., Мельник И.М.* Учебно-методические рекомендации по психодиагностике личности (часть I). – Харьков: ХГУ, 1993. – С. 15-19.
4. *Лакин Г.Ф.* Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп.– М.: Высшая школа, 1990. – 351 с.
5. *Иглин С.П.* Теория вероятностей и математическая статистика на базе MATLAB. – Харьков: НТУ «ХПИ», 2006. – 612 с.
6. *Falconer D.S.* Introduction to Quantitative Genetics. – Edinburgh: Oliver and Boyd, 1960. – 368 p.
7. *Шустикова М.В., Шахбазов В.Г.* Агресивність та характеристики системи генотипу // Матеріали Всеукраїнської наук. практич. конф. «Довкілля і здоров'я». – Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. – С.74-75.
8. *Шустикова М.В., Иглин С.П.* Роль степени экзогамии в формировании индивидуальных различий по уровню агрессивных реакций у представителей украинской популяции // Вісник проблем біології і медицини. – 2008. – Вип.3. – С. 50-56.
9. *Делоне Н.Л., Солониченко В.Г.* Адаптивные фенотипы человека в физиологии и медицине // Успехи физиологических наук. – 1999. – Т. 30, № 2. – С. 50-62.
10. *Алтухов Ю.П., Шереметьева В.А., Рычков Ю.Г.* Гетерозис как причина акселерации у человека // Докл. РАН. – 2000. – Т. 370, № 1. – С.130-133.
11. *Алтухов Ю.П.* Гетерозиготность генома, интенсивность метаболизма и продолжительность жизни // Докл. РАН. – 1999. – Т. 369, № 5. – С. 704-707.
12. *Філіпцова О.В., Зубрицька Л.В., Беляєва Л.В. та ін.* Роль ефекту екзогамії у прояві фізичної, непрямой та вербальної агресивності // Матеріали II Междунар. науч.-практ. конф. «Стратегические вопросы мировой науки-2007». Т.10. Биологические науки. – Днепропетровск: Наука и образование, 2007. – С. 56-58.
13. *Шустикова М.В.* Наследуемость физической агрессивности: гендерные отличия // Нейронаука для психологии и медицины: Сб. тр. 4-й Междунар. междисциплинар. конгр. – Судак, 2008. – М.: МАКС Пресс, 2008. – С. 337-338.
14. *Gerdi W., Rice T., Knox S. et al.* Familial resemblance for hostility: the national heart, lung and blood institute family heart study // Psychosomatic Medicine. – 2000. – №62. – P.197-204.
15. *Животовский Л.А.* Динамика полигенных систем под действием отбора // Математические модели в экологии и генетике. – М.: Наука, 1981. – С.120-141.
16. *Finkel D., McGue M.* Sex differences and nonadditivity in heritability of the Multidimensional personality Questionnaire scales. // J. Personal. Social Psychol. – 1997. – №72. – P. 929-938.

Резюме

Представлены результаты изучения роли генетических и средовых факторов в формировании индивидуальных различий по уровню физической, косвенной и

вербальной агрессивности у потомков семей с различной брачной структурой и половой конфигурацией сибства.

Наведено результати вивчення ролі факторів генотипу та середовища у формуванні індивідуальних відмінностей за рівнем фізичної, непрямой та вербальной агресивності у нащадків сімей з різною структурою шлюбу та статевою конфігурацією сибства.

The role of genetic and environmental factors in formation of individual differences of physical, indirect and verbal aggressiveness among offspring from families with various marriage structure and sib sexual configuration is studied.

ЩЕРБАКОВА О.В., МАТІЙЦІВ Н.П., МАКСИМІВ Д.В.

Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, Львів, вул. Грушевського, 4, e-mail: oksana_kysla@yahoo.com

ВИЯВЛЕННЯ МЕХАНІЗМІВ КЛІТИННОЇ СМЕРТІ У НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ МУТАНТІВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Швидкий прогрес останніх років у розумінні молекулярних основ нейродегенерації тісно пов'язаний з відкриттями на ниві програмованої клітинної смерті. Відомо два основних механізми клітинної смерті [2]: програмована, до якої відносять апоптоз та автофагію, і некротична клітинна смерть. Апоптоз є локальним процесом і не охоплює велику кількість клітин одночасно. Некроз, зазвичай, веде до розвитку запалення і відмирання тканин. В тканинах організму під дією однакових чинників можуть запускатись відмінні механізми клітинної смерті і часто лише сила стимулу є вирішальною у проходженні апоптозу чи некрозу. Проте при нейродегенеративних захворюваннях більшість клітин мозку підлягають апоптозу, як більш безпечному для організму процесу.

Матеріали та методи.

В роботі були використані лінії нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster*, контролем слугувала лінія дикого типу *Oregon*.

Гістологічні препарати зрізів головного мозку для світлової та електронної мікроскопії готували за стандартною методикою [1]. Фарбування тканини мозку антитілами проводили згідно протоколів [6].

Результати та обговорення.

Нейродегенеративні мутанти *D. melanogaster* були отримані внаслідок хімічного мутагенезу при дії етилметансульфонату. Було показано, що патологічні зміни в мозку досліджуваних ліній характеризувалися розвитком вакуолей в різних відділах. Поява вакуолей зумовлювалася відмиранням тіл нейронів (у ділянках кортексу) чи клітин глії та відростків нейронів (у ділянках нейропілю). У деяких ліній нейродегенерація виявлялась у центральній частині мозку, у інших – в оптичних долях.

Застосовуючи ряд гістохімічних методів було досліджено тканину мозку нейродегенеративних мутантів.

Для ідентифікації апоптичних клітин у досліджуваних мутантів ми виявляли каспазу Drice, шляхом фарбування мозку антитілами до активної форми цього ферменту і аналізували препарати тотального мозку на конфокальному мікроскопі. Каспаза Drice дрозофіли відповідає каспазі 3 ссавців і бере участь у апоптозі протягом ембріогенезу, у відмиранні клітин внаслідок дії радіоактивного опромінення або інгібування синтезу білків, а також в процесі індивідуалізації сперматид (неапоптичний процес) [3]. Позитивне фарбування цими антитілами було виявлено у 20-денних особин лінії 3.5.8 (Рис.1). Наявність клітин з морфологічними ознаками апоптозу у мутантів

3.5.8 була підтверджена і за допомогою електронно-мікроскопічних досліджень (Рис.2В). У мозку цих мух також було виявлено гіперзакручування клітин глії навколо тіл нейронів (Рис.2Б). Відомо [5], що порушення гліальних функцій може вести до пошкодження аксонів та нейронального апоптозу. Описана мутація дрозофіли *repo* внаслідок пошкодження білка специфічного для глії, зумовлює апоптоз нейронів і лише на пізніх етапах, відмирання гліальних клітин.

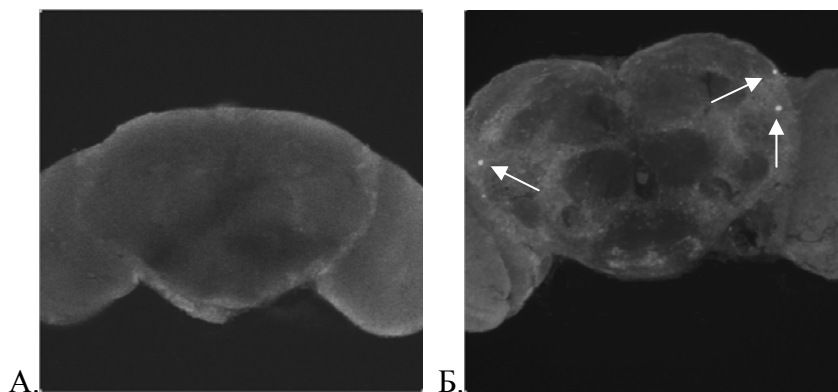


Рис. 1. Тотальний мозок фарбований антитілами до активної форми каспази 3: А. Особина лінії дикого типу, Б. Мутант 3.5.8. Стрілками показано позитивно зафарбовані клітини. Збільшення x20, zoom 0,9

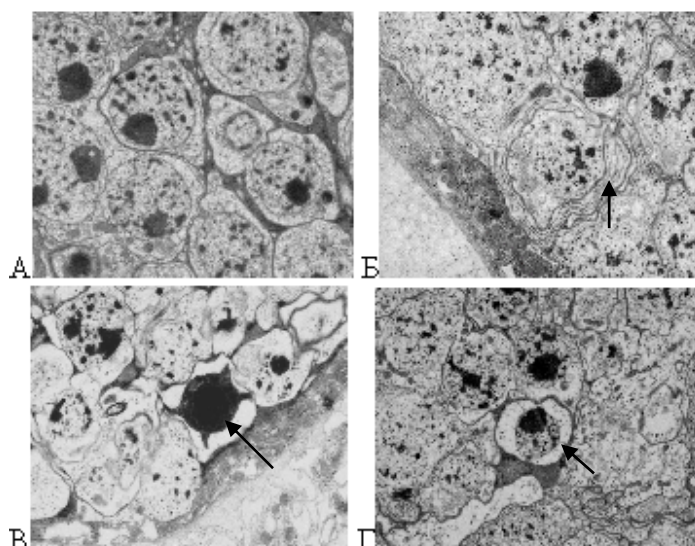


Рис. 2. Електронно-мікроскопічні фотографії зрізів мозку особин дикого типу (А), мутанта 3.5.8 (Б, В) та мутанта 65-10 (Г). Стрілками показано гіперзакручування мембран глії навколо нейронів (Б), клітини з морфологічними ознаками апоптозу (В) та некрозу (Г). Збільшення x6300 (А, Б); x4000 (В, Г).

Апоптична загибель нейронів разом із гіперзакручуванням глії були описані у мутанта *sws* [4]. Ми здійснили якісний і кількісний аналіз дофамінергічних нейронів у мозку нейродегенеративних мутантів групи *sws* нашої колекції. Для імунологічної детекції дофамінергічних нейронів було використано антитіла *anta-TN*. У 23-денних особин ліній 2-14, 72-7 та *sws^{ofE}* було зафіксовано (Рис.3) статистично достовірне зменшення кількості нейронів у кластері PPL.

Інший механізм відмирання нейронів – некроз був виявлений у мутантів 65-10 під час електронно-мікроскопічних досліджень (Рис.2Г). На відміну від апоптозу, некроз вважають пасивним і хаотичним шляхом загибелі клітин [2]. Він відбувається з мінімальними затратами енергії і не потребує наявності специфічних білків. Некроз супроводжує вакуолізацію мозку мутанта дрозофіли *loechrig* [7]. Процес

нейродегенерації при цьому характеризувався лізисом тіл зрілих, синаптично-активних нейронів, тоді як гліальні клітини залишалися нормальними.

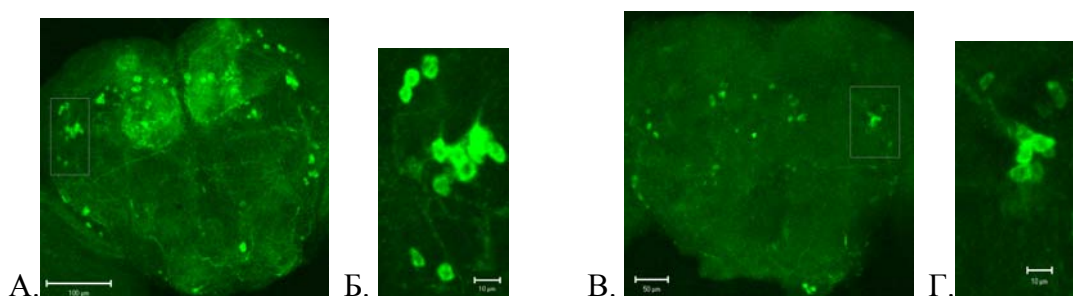


Рис. 3. Z- проекція серії зображень тканини мозку 23-денних особин після імунологічної детекції антитілами anti-TN, одержаних на конфокальному мікроскопі: А. Дикий тип, x20, zoom 0,9; Б. Дикий тип, x40, zoom 0,9 В. Мутант 2-14, x20, zoom 0,9; Г. Мутант 2-14, x40, zoom 0,9.

Таким чином, ми дослідили механізми розвитку нейродегенеративних змін в мутантів *D. melanogaster*. Серед досліджуваних ліній виявили мутантів, в яких дегенерація розвивалася внаслідок апоптозу (у ліній групи sws та 3.5.8) та некрозу (у лінії 65-10).

Література

1. Ashburner M. *Drosophila: a laboratory manual* // Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. – 1989. – P. 179-189.
2. Breseden D.E. Toward a mechanistic taxonomy for cell death programs // *Stroke*. – 2007. – Vol. 38. – P. 652-660.
3. Kornbluth S. and White K. Apoptosis in *Drosophila*: neither fish nor fowl (nor man, nor worm) // *J. Cell Sci*. – 2005. – Vol. 118. – P. 1779-1787.
4. Kretschmar D., Hasan G., Sharma S., Heisenberg M. The swiss cheese mutant cause glial hyperwrapping and brain degeneration in *Drosophila* // *J.Neurosci*. – 1997. – Vol.17, N 19. – P.7425-7432.
5. Kretschmar D. and Pflugfelder G. O. Glia in development, function, and neurodegeneration of the adult insect brain // *Brain Research Bulletin*. – 2002. – Vol. 57. – P. 121-131.
6. Sullivan W., Ashburner M., Hawley R.S. *Drosophila Protocols* // Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 2000. – 697p.
7. Tschaepe J-A., Hammershmid C., Muehlig-Versen M., Daum G., Kretschmar D. The neurodegeneration mutant *loechrig* interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing // *The EMBO Journal*. – 2002. – Vol.23. – P.6367-6376.

Резюме

Показано, що серед досліджуваних нейродегенеративних мутантів *D. melanogaster* є лінії з апоптичним та некротичним шляхом розвитку дегенерацій. Вакуолізація мозку мутантів виявлялася у різних відділах і спричинялася відмиранням нейронів чи їх відростків або порушенням функціонування гліальних клітин.

Показано, що среди исследованных нейродегенеративных мутантов *D. melanogaster* выявлены линии с апоптическим и некротическим путем развития дегенераций. Вакуолизация мозга мутантов наблюдалась в различных отделах и являлась следствием отмирания нейронов или их отростков, либо нарушением функционирования глиальных клеток.

We have shown that among the investigated neurodegenerative mutants of *D. melanogaster* there were lines with apoptotic and necrotic cell death. Vacuolization of brain tissue in mutants was observed in different parts and caused by neurons death or degeneration of their branches or derangements of glial function.

ЗМІСТ

МОЛЕКУЛЯРНА СТРУКТУРА ТА ОРГАНІЗАЦІЯ ГЕНОМІВ

БОРХЕРТ Е.В., КУДРЯВЦЕВ А.М., ОКУНЕВА И.Б., РЕБРИКОВ Д.В. TY1-COPIA-LIKE РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ (SYRINGA VULGARIS L.)	3
ВИНИЧЕНКО Н.А., КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В. ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ ЭПИМУТАГЕНОМ «ТРИТОН X-100» НА ОРГАНИЗАЦИЮ ЛОКУСА <i>Adh1</i> САХАРНОЙ СВЕКЛЫ.....	5
ГЕРАЩЕНКОВ Г.А., ЭЛЬКОНИН Л.А., ГОРБУНОВА В.Ю. МАРКИРОВАНИЕ ДИПЛОСПОРИЧЕСКОГО АПОМИКСИСА У СЕВЕРОАМЕРИКАНСКИХ ЭНДЕМИКОВ <i>VOESCHERA</i> МЕТОДОМ ТРАНСПОЗОН ДИСПЛЕЯ.....	8
КАРПОВ П.А., ЕМЕЦ А.И., МАТУСОВ В.Г., НЫПОРКО А.Ю., НАДЕЖДИНА Е.С., БЛЮМ Я.Б. БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ ПОИСК РАСТИТЕЛЬНЫХ ГОМОЛОГОВ STE20-ПОДОБНЫХ СЕРИН/ТРЕОНИН ПРОТЕИНКИНАЗ	12
КОЖУХОВА Н.Э. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ КУКУРУЗЫ	17
КОЦЬ С.Я., МАЛЧЕНКО С.М., ДАЦЕНКО В.К., МАМЕНКО П.М., ЯКИМЧУК Р.А. Tn5-МУТАНТИ <i>BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM</i> : ОТРИМАННЯ ТА ВИВЧЕННЯ ЇХНІХ ВЛАСТИВОСТЕЙ	23
КУЗЬМЕНКО О.Л., НЕГРУЦЬКА В.В., ПАЛЬЧИКОВСЬКА Л.Г., КАРПОВА І.С., ЛУКАШ Л.Л. ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ ГЕНОМНОГО ФІНГЕРПРИНТИНГУ (REP-ПЛР) ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ІНСЕРЦІЙНИХ МУТАНТІВ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	26
МУРАТОВА Е.Н., КАРШОК Т.В., ВЛАДИМИРОВА О.С., СЕДЕЛЬНИКОВА Т.С., КВИТКО О.В. В-ХРОМОСОМЫ У ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>PICEA</i> : РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ВОЗМОЖНОЕ ЗНАЧЕНИЕ.....	30
ПІДПАЛА О.В., ЯЦИШИНА А.П., ЛУКАШ Л.Л. ПОТЕНЦІЙНІ ЦИС-ЕЛЕМЕНТИ <i>AluSp</i> -ПОВТОРУ В ПРОМОТОРІ ГЕНА <i>MGMT</i>	43
ПІРКО Я.В., ТАРАНЕЦЬ Л. П., ШАКУЛА О.О., КОРШИКОВ І.І., БЛЮМ Я.Б. ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ МІНЛИВОСТІ <i>ACHILLEA GLABERRIMA</i> КЛОК. ТА <i>ACHILLEA LEPTOPHILLA</i> ВІЕВ. ЗА ДОПОМОГОЮ RAPD МАРКЕРІВ	34
ПОЛЩУК Л.В., ЛУКЯНЧУК В.В., МАРІЄВСЬКИЙ В.Ф., РУБАН Н.М. ПЛАЗМІДИ ТРЬОХ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ <i>ESCHERICHIA COLI</i>	36
ПОТОПАЛЬСЬКИЙ А.І., ЮРКЕВИЧ Л.Н., КАЦАН В.А. ГОМЕОБОКСНІ ГЕНИ, ЯК МОЖЛИВІ МІШЕНІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ ОТРИМАННІ НОВИХ ФОРМ ЖИТА.2.ЗАКОНОМІРНОСТІ ДІЇ ЕКЗОГЕННИХ ДНК ПРИ СЕЛЕКЦІЇ КОРОТКОСТЕБЛОВИХ ФОРМ ДИПЛОЇДНОГО ЖИТА	39

РОМАНЮК Л.В., ЖУМИНСКАЯ А.И., МУКВИЧ Н.С., ТОВКАЧ Ф.И. ОБЩАЯ ТРАНСДУКЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ И ПЛАЗМИДНЫХ МАРКЕРОВ ЭРВИНИОФАГОМ ZF40	48
САМАТАДЗЕ Т.Е., ЗЕЛЕНИНА Д.А., ШОСТАК Н.Г., ВОЛКОВ А.В., ПОПОВ К.В., РАЧИНСКАЯ О.А., БОРИСОВ А.Ю., ТИХОНОВИЧ И.А., ЗЕЛЕНИН А.В., МУРАВЕНКО О.В. ХРОМОСОМНО-МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ИЗУЧЕНИИ ГЕНОМА ГОРОХА ПОСЕВНОГО (<i>PISUM SATIVUM</i> L.)	52
ТИТОК М.А., ЧЕРНОВА А.И., ПУНТУС И.Ф., ВАСИЛЕНКО С.Л., ХАМЗА Ф.Д. ОРГАНИЗАЦИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ-ДЕСТРУКТОРОВ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ.....	55
ЦИГАНКОВА В.А., ІУТИНСЬКА Г.О. ДОСЛІДЖЕННЯ СТУПЕНЮ ГОМОЛОГІЇ мРНК ПРИ НОРМАЛЬНОМУ І СТИМУЛЬОВАНОМУ РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТУ РОСЛИН	59
KURCINI V.A. THE MOLECULAR MECHANISM OF HYDROGEN BOND FORMATION BETWEEN T-A BASE PAIRS WITHIN A PROMOTER AND A SIGMA FACTOR.....	63

МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ ТА ЕКСПРЕСІЇ ГЕНЕТИЧНИХ СИСТЕМ

БАВОЛ А.В., ДУБРОВНАЯ О.В., ЛЯЛЬКО И.И., ЗЛАЦКАЯ А.В. ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОМА ПШЕНИЦЫ ПРИ КЛЕТОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КУЛЬТУРАЛЬНОМУ ФИЛЬТРАТУ <i>GAEUMANNOMYCES</i> <i>GRAMINIS VAR. TRITICI</i>	67
ВЛАСЕНКО В.А. ОСОБЛИВОСТІ ГЕНОМ-ПЛАЗМОННОГО ВПЛИВУ НА МІНЛИВІСТЬ ВИСОТИ РОСЛИН У АЛОПЛАЗМАТИЧНИХ ФОРМ ТА ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ.....	72
КИРИКОВИЧ С.С., ЛЕВИТЕС Е.В. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У САХАРНОЙ СВЕКЛЫ (<i>Beta vulgaris</i> L.), ИНДУЦИРОВАННАЯ ТРИТОНОМ X-100	76
КРИНИЦЫНА А.А., СПЕРАНСКАЯ А.С., ПОЛЬТРОНИЕРИ П., САНТИНО А., ШЕВЕЛЕВ А.Б. ГЕНЫ БЕЛКОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ ТИПА КУНИТЦА ГРУППЫ А (PKP1-A) ИЗ <i>SOLANUM BREVIDENS</i> PHIL.....	80
ПРОКОПІВ Т. М., ФАЮРА Л.Р., ПРОТЧЕНКО О.В., ФЕДОРОВИЧ Д.В., БОРЕЦЬКИЙ Ю.Р., СИБІРНИЙ А.А. ВПЛИВ ІОНІВ ПЕРЕХІДНИХ МЕТАЛІВ НА ФЛАВІНОГЕНЕЗ І АСИМІЛЯЦІЮ ЗАЛІЗА ДРІЖДЖАМИ <i>PICCHIA GUILLIERMONDII</i>	83
СОКОЛОВА Е.И. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ <i>VP</i> И <i>TFL1</i> <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ПО ПРИЗНАКУ «ЧИСЛО ЛИСТЬЕВ НА СТЕБЛЕ» В РАЗНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ	87

ТЕХНОЛОГІЇ IN VITRO, ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

БЕЛОКУРОВА В.Б. РАЗМНОЖЕНИЕ <i>IN VITRO</i> ОХРАНЯЕМОГО ВИДА <i>BELLEVALIA SARMATICA</i> (PALL. EX GEORGI) WORONOW (HYACINTHACEAE)	91
---	----

БЛИНСЬКА О.В., КУЩЕНКО О.О. ВПЛИВ ГАМЕТНОГО ДОБОРУ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ <i>IN VITRO</i> НА МІНЛИВІСТЬ ОЗНАК ПРОДУКТИВНОСТІ ЛІНІЙ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОІДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ	94
ГУЗЕВАТИЙ О.Є., ТРОЦЬКИЙ П.А. ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ ЗАРОДКІВ, ОТРИМАНИХ <i>IN VITRO</i> З ДЕКОНСЕРВОВАНИХ ООЦИТІВ	98
КИЩЕНКО Е.М., БЕЛОКУРОВА В.Б., ПАТОН Е.Б., КУЧУК Н.В. ПРОСТРЕЛ ЧЕРНЕЮЩИЙ (<i>PULSATILLA NIGRICANS</i> STORCK) КАК ОБЪЕКТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	101
КОВАЛЕВА Л.В., ЗАХАРОВА Е.В., МИНКИНА Ю.В., ТИМОФЕЕВА Г.В. ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОРАСТАНИЯ И РОСТА МУЖСКОГО ГАМЕТОФИТА <i>IN VITRO</i>	106
КОВБАСЕНКО Р.В., ДЯЧЕНКО А.І., ДМИТРИЄВ О.П. ІНДУКЦІЯ СОМАКЛОНАЛЬНОЇ ВАРІАБЕЛЬНОСТІ У РОСЛИН ТОМАТУ	109
КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., БУЦЕНКО Л.М. КУЛЬТИВУВАННЯ <i>ALOE VERA</i> В УМОВАХ <i>IN VITRO</i> ТА ВИВЧЕННЯ ЇЇ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ	113
КОРНЯ Т. М., ИГНАТОВА С. А. МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В УСЛОВИЯХ ОТБОРА <i>IN VITRO</i> ТОЛЕРАНТНЫХ К ФИЛЬТАТУ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ГРИБА <i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> SCHWABE ОБРАЗЦОВ	116
КРУГЛОВА Н.Н. К ПРОБЛЕМЕ УНИФИКАЦИИ ТЕРМИНОЛОГИИ ПРИ РАЗРАБОТКЕ БИОТЕХНОЛОГИИ АНДРОКЛИННОЙ ГАПЛОИДИИ <i>IN VITRO</i>	120
ЛЬОШИНА Л.Г., БУЛКО О.В., ГАЛКІН А.П. ОТРИМАННЯ І ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛУСНОЇ І СУСПЕНЗІЙНОЇ КУЛЬТУРИ БАРВІНКА МАЛОГО <i>VINCA MINOR L</i>	124
МИТРОФАНОВА И.В., МИТРОФАНОВА О.В., РАБОТЯГОВ В.Д. РОЛЬ АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В СИСТЕМЕ ПРЯМОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ ИССОПА (<i>HYSSOPUS OFFICINALIS L.</i>) И КОТОВНИКА (<i>NEPETA CATARIA VAR. CITRIODORA</i> ВЕСК.) <i>IN VITRO</i>	128
МИХАЛЬСКАЯ С.И., КОМИСАРЕНКО А.Г., МАЛИНА А.Э., БРОННИКОВА Л.И., ТИЩЕНКО Е.Н. ВЛИЯНИЕ ТИОСУЛЬФАТА НАТРИЯ НА ИНДУКЦИЮ РЕГЕНЕРАЦИИ <i>IN VITRO</i> ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА	132
ОВЧАРЕНКО О.О., РУДАС В.А., КУЧУК М.В. РОЗРОБКА УМОВ ВИДІЛЕННЯ ТА КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ РОСЛИН РОДУ <i>RHALAENOPSIS</i>	135
СЕЛЬДИМИРОВА О.А. ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА МИКРОСПОР В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i> ПЫЛЬНИКОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ	139
СТРАШНЮК Н.М., КРАВЕЦЬ Н.Б., КОНВАЛЮК І.І., МЕЛЬНИК В.М. ОРГАНОГЕНЕЗ У КУЛЬТУРІ ТКАНИН ВИДІВ РОДУ ТИРЛИЧ (<i>GENTIANA L.</i>)	143
ТРЕТЬЯКОВА И.Н., БАРСУКОВА А.В., ИЖБОЛДИНА М.В. ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ХВОЙНЫХ: ИНИЦИАЦИЯ, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, ВЫЗРЕВАНИЕ	147
ЯРУЛЛИНА Л.Г., ТРОШИНА Н.Б., СУРИНА О.Б.	

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОВМЕСТНЫХ КУЛЬТУР РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ИЗУЧЕНИИ МЕХАНИЗМОВ ФОРМИРОВАНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ.....	150
--	-----

БІОТЕХНОЛОГІЇ У МЕДИЦИНІ ТА СІЛЬСЬКОМУ ГОСПОДАРСТВІ

БЕЛОКУРОВА В.Б., КИЩЕНКО Е.М., ЛИСТВАН Е.В., КУЧУК Н.В. КУЛЬТУРА <i>IN VITRO</i> И ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ КОРНЕЙ <i>PSORALEA DRUPACEA</i> BUNGE (LEGUMINOSAE)	155
БЕРДИЧЕВЕЦ И.Н., ГОРДУКОВА М.А., ШИМШИЛАШВИЛИ Х.Р., СИНДАРОВСКАЯ Я.Р., ШЕЛУДЬКО Ю.В., ФАДЕЕВ В.С., ГОЛДЕНКОВА- ПАВЛОВА И.В. ДИЗАЙН СИСТЕМЫ ПРАЙМЕРОВ И УСЛОВИЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ОТБОРА И АНАЛИЗА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ	159
БУБЛИК О.М., АНДРЕЄВ І.О., СПІРІДОНОВА К.В., КУНАХ В.А. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РОСЛИН-РЕГЕНЕРАНТІВ <i>UNGERNIA VICTORIS</i>	162
ВОЛЫНКИН В.А., ЗЛЕНКО В.А., ПОЛУЛЯХ А.А., ЛИХОВСКОЙ В.В. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АЛЛОПОЛИПЛОИДИИ И КУЛЬТУРЫ ЗАРОДЫШЕЙ <i>IN VITRO</i> ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ У ВИНОГРАДА (СЕМЕЙСТВО <i>VITACEAE</i>).....	166
ЗЮЗЮН А.Б., КОВТУН С.І., ЩЕРБАК О.В., ПОРХУН М.Г. ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ <i>IN VITRO</i> ЯК СПОСІБ ОЦІНКИ ЗАПЛІДНЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ БУГАЇВ.....	170
КОЛОДЯЖНАЯ Я.С. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	173
КОМАХИН Р.А., КОМАХИНА В.В., МИЛЮКОВА Н.А., ТРАЧУК Л.А., ЖУЧЕНКО А.А. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕЙОТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕН <i>NLS-recA-licBM3</i>	176
МАЙДАНЮК Д.Н., АНДРЕЄВ І.О., СПІРІДОНОВА Е.В., КУНАХ В.А. RAPD-ФРАГМЕНТ, ВАРИАБЕЛЬНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ КУКУРУЗЫ	180
МАТВЄЄВА Н.А., ШАХОВСЬКИЙ А.М., КВАСКО О.Ю., ВАСИЛЕНКО М.Ю., ГЕРАСИМЕНКО І.М., КУЧУК Н.В. <i>SICHHORIUM INTYBUS</i> L. ЯК ПЕРСПЕКТИВНИЙ ОБ'ЄКТ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ.....	184
МИХАЛЬСЬКА С.І., СЕРГЄЄВА Л.Є., ТИЩЕНКО О.М. МІНЛИВІСТЬ ГЕНОМУ КЛІТИННОЇ ЛІНІЇ СОЇ, СТІЙКОЇ ДО ОКСІАНІОНІВ ВОЛЬФРАМУ	188
САХНО Л.А., МОРГУН Б.В., КИЩЕНКО Е.М., КУЧУК Н.В. НАСЛЕДОВАНИЕ ВВЕДЕННЫХ ГЕНОВ <i>VAR</i> И <i>CYP11A1</i> ЦИТОХРОМА P450 _{SCC} ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В T ₁ ПОКОЛЕНИИ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА И РАПСА.....	196
СЕРГЕЄВА Л.Е., ПОРЕЦКАЯ Е.И., ГАМАЛЕЙ В.И. ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ У СОЛЕУСТОЙЧИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ТАБАКА,	

ОТОБРАННИХ НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ, СОДЕРЖАЩИХ ИОНЫ БАРИЯ.....	200
СУПРУН С. М., ДОНЧЕНКО Г. В., ПАРХОМЕНКО Ю.Ф., КУРЧЕНКО И. Н., ХАРКЕВИЧ Е.С., КУЧМЕРОВСКАЯ Т.М.	
БИОТЕХНОЛОГИИ НА ОСНОВЕ МИКРОМИЦЕТОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВИТАМИНОВ, ПИЩЕВОЙ И КОРМОВОЙ ДОБАВКИ	205
ШИМШИЛАШВИЛИ Х.Р, ЮРЬЕВА Н.О, БЕРДИЧЕВЕЦ И.Н. , ГОРДУКОВА М.А., ЦЫДЕНДАМБАЕВ В.Д. , НОСОВ А.М., ГОЛДЕНКОВА-ПАВЛОВА И.В.	
СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К СТРЕССОВЫМ ФАКТОРАМ, ЗА СЧЕТ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ДЕСАТУРАЗ С РАЗЛИЧНОЙ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ.....	209
ЯЦИШИН В.Ю., ФЕДОРОВИЧ Д.В., ВОРОНОВСЬКИЙ А.Я., СИБИРНИЙ А.А.	
ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ СИНТЕЗУ ФЛАВІНМОНОНУКЛЕОТИДУ РЕКОМБІНАНТНИМИ ШТАМАМИ ДРІЖДЖІВ <i>CANDIDA FAMATA</i>	213
GERASYMENKO I.M., LYPOVA N.M., SAKHNO L.A., SHCHERBAK N.L., SINDAROVSKA Y.R., BANNIKOVA M.A., SHELUDKO Y.V., KUCHUK N.V.	
OBTAINING AND ANALYSIS OF TOBACCO, LETTUCE AND RAPE PLANTS TRANSFORMED WITH HUMAN INTERFERON ALFA 2B GENE.....	217

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

БАБІЙ І.П., ПОБЕРЕЖНИК О.В., ГОЛУБ Н.Я., ЧЕРНИК Я.І.	
ВПЛИВ ЛАЗЕРНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ І ФАРМОКОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ЦЕРЕБРАЛУ НА ДЕГЕНЕРАТИВНІ ТА РЕГЕНЕРАТИВНІ ПРОЦЕСИ У СТРУКТУРІ ГОЛОВНОГО МОЗКУ МУТАНТІВ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	222
БАГАЦКАЯ Н.В., НЕФИДОВА В.Е.	
ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ХРОМОСОМНОГО АППАРАТА ПОДРОСТКОВ, БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ, ДО И ПОСЛЕ МУТАГЕННОЙ НАГРУЗКИ МИТОМИЦИНОМ С IN VITRO	226
БАРИЛЯК І.Р., ШКАРУПА В.М., НЕУМЕРЖИЦЬКА Л.В.	
МОДИФІКУЮЧІЙ ВПЛИВ ГУМАТУ НАТРІЮ НА ГЕНОТОКСИЧНІСТЬ ТІОФОСФАМІДУ.....	230
БАРХАШ А.В., ПЕРЕЛЫГИН А.А., КОБЗЕВ В.Ф., ПИЛИПЕНКО П.И., МЯСНИКОВА Н.Г., МОРОЗОВА О.В., БРИНТОН М.А., РОМАЩЕНКО А.Г., ВОЕВОДА М.И.	
ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ 2'-5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТСИНТЕТАЗ ЧЕЛОВЕКА И ИХ СВЯЗЬ С ТЯЖЕЛЫМИ ФОРМАМИ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА.....	233
БІЛОШИЦЬКА А.В., ПІСКУН Р.П., ГОРБАТЮК С.М., МРИХ Н.М., БІЛОШИЦЬКИЙ В.В., ПІСКУН І.І., РОМАШКІНА О.А., ЦИБА Л.О., ШЕВЧУК Т.І.	
МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ГЕННОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ	236
БОДНАР Л.С., ГОРБУЛІНСЬКА С.М., ЩЕРБАКОВ С.М., БОДНАР І.В.	
ДОЦІЛЬНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ ПРИРОДНИХ СОРБЕНТІВ ДЛЯ ЗНЯТТЯ МУТАГЕННИХ ФОНІВ ВОДНИХ ЗРАЗКІВ, ВІДБРАНИХ ПОБЛИЗУ СМТ.СОСНІВКА ЛЬВІВСЬКОЇ ОБЛАСТІ	241
ГЕНИК-БЕРЕЗОВСЬКА С.О.	
ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ ДІЇ РАДІАЦІЇ ДЛЯ СІМЕЙ ЛІКВІДАТОРІВ АВАРІЇ НА	

ЧАЕС, ЯКІ ПРОЖИВАЮТЬ В ЕКОЛОГІЧНО СПРИЯТЛИВОМУ РЕГІОНІ	244
ГОРОВА А.І., ПАВЛИЧЕНКО А.В. ЦИТОГЕНЕТИЧНІ НАСЛІДКИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ГІРНИЧОДОБУВНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ ДНІПРОПЕТРОВСЬКОЇ ОБЛАСТІ	248
ГРА О.А., КОЖЕКБАЕВА Ж.М., ГРА Д.В., ФЕДОРОВА М.Д., СКОТНИКОВА О.И., КИСЕЛЕВА Н.П., КИСЕЛЕВ Ф.Л., НАСЕДКИНА Т.В., ГОЛДЕНКОВА- ПАВЛОВА И.В. РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СИСТЕМИ БИОТРАНСФОРМАЦІИ В ЭТИОЛОГИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	255
ГУЛЕЮК Н.Л. МОЗАЙЦИЗМ В КУЛЬТУРАХ АМНІОЦИТІВ: АНАЛІЗ ВИПАДКІВ У ЛЬВІВСЬКОМУ ММГЦ	259
ГУЛЬКО Т.П., КОВАЛЬЧУК М.В. ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЫШЕЙ, ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К СПОНТАННЫМ НОВООБРАЗОВАНИЯМ	263
ГУЛЬКО Т.П., ЛИХАЧЕВА Л.И., МАЦЕВИЧ Л.Л., КОРДЮМ В.А. ВЛИЯНИЕ СКАРМЛИВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ СМЕСИ (БАС) НА ЧАСТОТУ СПОНТАННЫХ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У МЫШЕЙ	268
ДЬОМІНА Е. А., ДЕМЧЕНКО О. М., САВКІНА М. Ю ХАРАКТЕР КАЛІБРУВАЛЬНИХ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ КРИВИХ В ЗАЛЕЖНОСТІ ВІД ІНДИВІДУАЛЬНОЇ РАДІОЧУТЛИВОСТІ ЛЮДИНИ	272
ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЕСЬ Г.Д. МУТАЦІЯ V617F ГЕНА <i>jak2</i> ЯК МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МАРКЕР У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ	275
ДИБСЬКИЙ С.С. ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ FISH ДЛЯ ВЕРИФІКАЦІЇ ДОЗ ОПРОМІНЕННЯ У 180 ЛІКВІДАТОРІВ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ	279
ЗАГАНЯЧ Я.Ю., ТЕРПИЛЯК О.І., ЗАСТАВНА Д.В. ІМУНОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РАННІХ РЕПРОДУКТИВНИХ ВТРАТ У ЖІНОК ІЗ СХИЛЬНІСТЮ ДО УРОГЕНІТАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ	282
КРАСНОВ М.С., СМУТОВА В.А., МАРГАСЮК Д.В., БЕРЕЗИН Б.Б., БИТКО С.А., ЯМСКОВА В.П., ЯМСКОВ И.А. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И АКТИВНОСТЬ В СВЕРХМАЛОЙ ДОЗЕ БИОРЕГУЛЯТОРА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СЕМЕННИКОВ КРЫС	286
ПЛІНСЬКА М.А., ДИБСЬКИЙ С.С., ДИБСЬКА О.Б., ПЕДАН Л.Р. РЕАЛІЗАЦІЯ ПРИХОВАНОЇ ХРОМОСОМНОЇ НЕСТАБІЛЬНОСТІ В СОМАТИЧНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ У ВІДДАЛЕНІ СТРОКИ ПІСЛЯ ЧОРНОБИЛЬСЬКОЇ АВАРІЇ	290
ПИЛИПЕНКО И.В., ЧЕРДЫНЦЕВА Н.В., КОБЗЕВ В.Ф., ВОЕВОДА М.И., РОМАЩЕНКО А.Г. АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА P53 С ФОРМИРОВАНИЕМ И РАЗВИТИЕМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГОРМОНАЛЬНОГО СТАТУСА ОПУХОЛИ	294
СТЕФАНОВИЧ Г.В., БАРИЛЯК І.Р., БУДЕРАЦЬКА Н.О. ВПЛИВ ВІКУ ЖІНКИ НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ООЦИТІВ ТА РАННІХ ЕМБРІОНІВ, ОТРИМАНИХ В ПРОГРАМАХ ЗАПЛІДНЕННЯ <i>IN VITRO</i>	296
СУСЛИНА С.Н., САМАТАДЗЕ Т.Е., НИКИТИНА З.К., ЛИВШИЦ В.А.,	

БЫКОВ В.А.	
ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРЕПОДАВАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ВРАЧЕЙ И ПРОВИЗОРОВ НА МЕДИЦИНСКОМ ФАКУЛЬТЕТЕ РОССИЙСКОГО УНИВЕРСИТЕТА ДРУЖБЫ НАРОДОВ	300
ТЕЛЕГЄЄВ Г.Д., МІРОШНИЧЕНКО Д.О., МАЛЮТА О.В., КРАВЧУК І.В., ЛИСЕЦЬКА Т.Ю., ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С.	
ВИВЧЕННЯ <i>VCR</i> ЧАСТИНИ ГІБРИДНОГО ГЕНА <i>VCR-ABL</i> ЯК ШЛЯХ ДО РОЗУМІННЯ ПАТОГЕНЕЗУ ЛЕЙКЕМІЙ ПРИ ТРАНСЛОКАЦІЇ (9:22).....	302
ТИРКУС М. Я.	
ЧАСТОТА І СПЕКТР МІКРОДЕЛЕЦІЇ Y-ХРОМОСОМИ У ЧОЛОВІКІВ З РІЗНИМИ ФОРМАМИ ПОРУШЕННЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗУ	307
ТКАЧОВА Д.Л., ДУГАН О.М.	
ПОТЕНЦІЙНА МУТАГЕННА ДІЯ КОПЧЕНИХ М'ЯСОПРОДУКТІВ	310
ТРЕТЯК Б.І., ЗАСТАВНА Д. В., МАКУХ Г. В.	
ДЕЛЕЦІЙНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ <i>SMN</i> ТА <i>NAIP</i> У ПАЦІЄНТІВ З РІЗНИМИ ТИПАМИ СПІНАЛЬНОЇ М'ЯЗОВОЇ АТРОФІЇ ІЗ ЗАХІДНОГО РЕГІОНУ УКРАЇНИ	316
ТЫЖНЕНКО Т.В., КАРАЧЕНЦЕВ Ю.И., ПОЧЕРНЯЕВ А.К., ГОРШУНСКАЯ М.Ю., АТРАМЕНТОВА Л.А., КРАВЧУН Н.А. ПОЛТОРАК В.В.	
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТИПОВ ПО ЛОКУСАМ <i>PON1</i> И <i>ARM1B</i> В ГРУППЕ ДОНОРОВ НАСЕЛЕНИЯ ХАРЬКОВА	319
ЧЕРЕДНИК Ю.А., КУЗЬМИН А.В., ЧЕРНОУСОВА Л.Н., АНОПРИЕНКО О.В., ГОРОВЕНКО Н.Г., КОСТРОМИНА В.П., БЕЛОГОРЦЕВА О.И.	
ДНК-ДИАГНОСТИКА И ГЕНОТИПИРОВАНИЕ <i>M.tuberculosis</i> У ДЕТЕЙ С ЛЕГОЧНОЙ ФОРМОЙ ТУБЕРКУЛЕЗА.....	323
ШАПОШНИКОВА В. М.	
ЧАСТОТА ВРОДЖЕНИХ ВАД РОЗВИТКУ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ЧЕРКАСЬКОЇ ОБЛАСТІ	327
ШВАЧКО Л.П., ТЕЛЕГЕЕВ Г.Д.	
АЛЬТЕРНАТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ДНК – МЕТИЛТРАНСФЕРАЗНЫХ ГЕНОВ В ДИНАМИКЕ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ.....	330
ШЕМЕТУН О.В., ТАЛАН О.О.	
ІНДУКЦІЯ ЕФЕКТУ СВДКА ЛІМФОЦИТАМИ КРОВІ ЛІКВІДАТОРІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС, ОПРОМІНЕНИМИ В МАЛИХ ДОЗАХ	335
ШТАНДЕЛЬ С.А.	
ПОДВЕРЖЕННОСТЬ УЗЛОВОМУ НЕТОКСИЧЕСКОМУ ЗОБУ ЖИТЕЛЕЙ ГОРОДА ХАРЬКОВА	338
ШУСТИКОВА М.В.	
ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ РАЗЛИЧИЙ ПО УРОВНЮ АГРЕССИВНОГО РЕАГИРОВАНИЯ У ПОТОМКОВ СЕМЕЙ С РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРОЙ	342
ЩЕРБАКОВА О.В., МАТІЙЦІВ Н.П., МАКСИМІВ Д.В.	
ВИЯВЛЕННЯ МЕХАНІЗМІВ КЛІТИННОЇ СМЕРТІ У НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНИХ МУТАНТІВ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	346